LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

MEDICINOS AKADEMIJA

**Raimondas Raudonis**

**SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS POKOLONĖLINIŲ METODŲ OPTIMIZAVIMAS AUGALINIŲ ANTIOKSIDANTŲ TYRIMAMS**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai,

farmacija (08B)

Kaunas, 2012

Disertacija rengta 2008-2012 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijoje.

Mokslinis vadovas

prof. dr. Valdas Jakštas (Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medici­nos akademija, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

**TURINYS**

[ĮVADAS 6](#_Toc328467998)

[1. LITERATŪROS APŽVALGA 10](#_Toc328467999)

[1.1. Laisvieji radikalai biologinėse sistemose 10](#_Toc328468000)

[1.2. Antioksidantai. Klasifikacija ir apsauginės jų savybės 16](#_Toc328468001)

[1.3. Fenoliniai junginiai – augaliniai antioksidantai 19](#_Toc328468002)

[1.4. Antioksidantinio poveikio mechanizmai 23](#_Toc328468003)

[1.5. Antioksidantinio aktyvumo įvertinimo metodai pagrįsti elektronų perdavimo reakcija 25](#_Toc328468004)

[1.6. ESC pokolonėliniai antioksidantų tyrimo metodai 32](#_Toc328468005)

[2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI 37](#_Toc328468006)

[2.1. Tyrimų objektai 37](#_Toc328468007)

[2.2. Tyrimų metodai 38](#_Toc328468008)

[3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 46](#_Toc328468009)

[3.1. Reakcijos kilpos parinkimas antioksidantinio aktyvumo tyrimams ESC pokolonėlinėje sistemoje 46](#_Toc328468010)

[3.2. ESC pokolonėlinių metodų optimizavimas ir validacija augalinių antioksidantų tyrimams 48](#_Toc328468011)

[3.2.1. ESC–DPPH pokolonėlinis metodas 48](#_Toc328468012)

[3.2.2. ESC–ABTS pokolonėlinis metodas 54](#_Toc328468013)

[3.2.3. ESC-FRAP pokolonėlinis metodas 61](#_Toc328468014)

[3.3. Fenolinių junginių antioksidantinių savybių įvertinimas ESC pokolonėliniais metodais 66](#_Toc328468015)

[3.4. ESC pokolonėlinių metodų taikymas augalinių žaliavų bei jų preparatų antioksidantų sudėties ir aktyvumo įvertinimui 69](#_Toc328468016)

[3.4.1. Gudobelių augalinių žaliavų ir preparatų tyrimas 69](#_Toc328468017)

[3.4.2. Paprastųjų raudonėlių augalinių žaliavų tyrimas 72](#_Toc328468018)

[3.4.3. Kraujažolės genties rūšių augalinių žaliavų tyrimas 75](#_Toc328468019)

[3.4.4. Perilės genties rūšių augalinių žaliavų ir preparatų tyrimas 81](#_Toc328468020)

[3.4.5. Žemuogės genties rūšių augalinių žaliavų tyrimas 86](#_Toc328468021)

[3.4.6. Augalinių antioksidantų tyrimų apibendrinimas 91](#_Toc328468022)

[IŠVADOS 94](#_Toc328468023)

[LITERATŪROS SĄRAŠAS 96](#_Toc328468024)

[DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS 115](#_Toc328468025)

**SANTRUMPOS**

|  |  |
| --- | --- |
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfono rūgštis) (angl. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)*) |
| AV | Absorbcijos vienetai |
| BMR | Branduolio magnetinis rezonansas |
| CUPRAC | Vario redukcijos antioksidantinė galia (angl. *Cupric reducing antioxidant capacity*) |
| DMD | Diodų matricos detektorius (angl. *Diode array detector*) |
| DPPH | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (angl. *2,2-diphenyl-1-picrylhy-drazyl*) |
| EP | Elektronų perdavimas |
| ESC | Efektyvioji skysčių chromatografija |
| FRAP | Geležies redukcijos antioksidantinė galia (angl. *Ferric redu-cing antioxidant power*) |
| IS | Išorinis skersmuo |
| KFE | Kietos fazės ekstrakcija |
| LoD | Aptikimo riba (angl. *Limit of detection*) |
| LoQ | Nustatymo riba (angl. *Limit of quantitation*) |
| MS | Masių spektrometrija |
| PEEK | Polietereterketonas (angl. *Polyetheretherketone*) |
| R2 | Determinacijos koeficientas |
| RNS | Reaktyvios azoto formos (angl. *Reactive nitrogen species*) |
| ROS | Reaktyvios deguonies formos (angl. *Reactive oxygen species*) |
| RSD | Radikalų surišimo detekcija |
| RSE | Radikalų surišimo efektyvumas |
| S/N | Signalo ir bazinės linijos triukšmo santykis (angl. *Signal to noise ratio*) |
| SSN | Santykinis standartinis nuokrypis |
| TEAC | Troloksui ekvivalentiška antioksidantinė galia (angl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*) |
| TEACS | Santykinė troloksui ekvivalentiška antioksidantinė galia |
| TFA | Trifluoracto rūgštis |
| TFE | Politetrafluoretilenas (angl. *Teflon*) |
| TPTZ | 2,4,6-tripyridyl-s-triazinas (angl. 2,4,6-tripyridyl-s- triazine) |
| VAP | Vandenilio atomo perdavimas |
| VCEAC | Vitaminui C ekvivalentiška antioksidantinė galia (angl. *Vitamin C equivalent antioxidant capacity*) |
| VS | Vidinis skersmuo |

ĮVADAS

Antioksidantai įvairiais veikimo mechanizmais geba neutralizuoti žalin­gas reaktyvias deguonies ir azoto formas. Jų vartojimas sustiprina ląstelės antioksidantinės apsaugos sistemas bei padeda atkurti pažeistas struktūras [57]. Epidemiologiniais tyrimais įrodytas antioksidantų gebėjimas mažinti ar visai sustabdyti daugelio lėtinių ligų progresavimą [222]. Didėja susido­mėjimas augaluose aptinkamų fenolinių junginių kaip natūralių antioksi­dantų apsauginėmis savybėmis ir jų taikymu profilaktiniams tikslams [102]. Paskaičiuota, kad išlaidos skirtos lėtinių ligų prevencijai yra žymiai mažes­nės nei reikalingos jų gydymui [59, 228].

Preliminarūs augalinių žaliavų antioksidantinio aktyvumo tyrimai atlie­kami *in vitro* analitiniais metodais. *In vitro* modelinėse sistemose fenolinių junginių kaip potencialių antioksidantų savybės įvertinamos sąlyginai pa­prastose ir kontroliuojamų parametrų sąlygose [84], tik po to jie tiriami rea­liose organizmo terpėse *in vivo* [83]. Taikomi įvairūs antioksidantinio akty­vumo įvertinimo metodai pagrįsti skirtingais veikimo mechanizmais [151]. Šiuose metoduose tiriami augaliniai antioksidantai konkuruojančios ar nekonkuruojančios reakcijos principu inaktyvuoja žinomą oksidantą dviem pagrindiniais būdais: vandenilio atomo perdavimo arba elektronų perdavimo reakcijomis [151].

Populiariausi elektronų perdavimu pagrįsti antioksidantinio aktyvumo tyrimo metodai yra DPPH radikalų ir ABTS radikalų-katijonų surišimo įvertinimas bei geležies (FRAP) ir vario (CUPRAC) jonų redukcijos anti­oksidantinės galios nustatymas [12, 242, 245]. Šiuose metoduose vyksta nekonkuruojanti reakcija tarp tiriamo antioksidanto ir žinomo prooksidanto, kurios metu kinta tirpalo absorbcijos spektras regimosios šviesos srityje. Dažniausiai taikomas spektrofotometrinis absorbcijos pokyčio detekcijos būdas [100, 225, 239]. Jo privalumai yra greita, paprasta ir patikima analizė. Tačiau, spektrofotometriniu metodu įvertinamas suminis visų sudėtiniuose mišiniuose esančių aktyvių junginių antioksidantinis aktyvumas [239]. Kartu apimamos sąveikos (įvairios priemaišos, skatinantys ar slopinantys efektai) tarp skirtingų antioksidantų. Kiekvieno junginio atskyrimas ir jo individualus tyrimas yra brangus ir neefektyvus dėl didelio antioksidantų skaičiaus, įvairovės ir kompleksiškumo augalinėse žaliavose ir biologi­niuose pavyzdžiuose.

Didelės skiriamosios gebos tiesioginiai (*on-line*) metodai atlieka greitą antioksidantiniu aktyvumu pasižyminčių junginių atranką [167]. Šiuose metoduose apjungiamas ESC skirstymas ir pokolonėlinės reakcijos detek­cija. ESC pokolonėliniai metodai įvertina atskirų junginių antioksidantines savybes bei jų indėlį į bendrą kompleksinių mišinių antioksidantinį akty­vumą [229]. Pokolonėlinei reakcijai dažniausiai naudojami stabilūs DPPH ir ABTSlaisvieji radikalai, išlaikant paplitusio spektrofotometrinio metodo principą [123, 124, 128, 189]. Didžiausi šių tiesioginių metodų privalumai yra atrankumas, trumpa analizės trukmė ir didelis jautrumas. ESC pokolo­nėliniai metodai tuo pačiu metu leidžia nustatyti tikslų junginio kiekį auga­linių žaliavų ekstraktuose bei įvertinti jo antioksidantinį aktyvumą [20].

Vaistinių augalinių žaliavų ir fitopreparatų antioksidantinio aktyvumo ty­rimams būtina taikyti optimizuotus ESC pokolonėlinius metodus bei vali­duoti jų metodikas, kurios leistų patikimai, tiksliai bei atkartojamai įvertinti antioksidantų sudėtį, pasiskirstymą ir stabilumą. Fenolinių junginių anti­oksidantinio aktyvumo kiekinė išraiška etalolinio antioksidanto ekvivalen­tais suteikia galimybę standartizuoti augalines žaliavas bei jos preparatus.

Nėra vieno universalaus metodo galinčio tiksliai įvertinti tiriamajame bandinyje esančių junginių antioksidantinį poveikį prieš visus *in vivo* aptin­kamus prooksidantus, atspindėti antioksidantų tarpusavio sąveikas ar jų elgesį kompleksinėse antioksidantinėse sistemose [187]. Įvairiapusiškam biologiškai aktyvių junginių antioksidantiniam poveikiui nusakyti, atliekami tyrimai dirbtinėse modelinėse sistemose *in vitro* skirtingais reakcijų mecha­nizmais su įvairiais prooksidantais ir jų taikiniais. Taip sudaromas vadina­masis antioksidantinis vaizdas, pagal kurį prognozuojamas tirtų junginių elgesys *in vivo* sistemose.

**Darbo tikslas** – nuodugniai ištirti ir pritaikyti ESC pokolonėlinius meto­dus augalinių antioksidantų tyrimams, augalinės žaliavos ekstraktų bei jų preparatų antioksidantų sudėties ir aktyvumo įvertinimui.

**Uždaviniai:**

1. Parinkti optimalių parametrų reakcijos kilpą antioksidantinio akty­vumo tyrimams ESC pokolonėliniu metodu, atsižvelgiant į chroma­tografinės eliucijos greitį.
2. Optimizuoti ir validuoti ESC-DPPH ir ESC-ABTS pokolonėlinius metodus laisvųjų radikalų surišimo aktyvumo nustatymui ir įvertini­mui.
3. Optimizuoti ir validuoti ESC-FRAP pokolonėlinį metodą redukcinių savybių tyrimams.
4. ESC pokolonėliniais metodais ištirti ir įvertinti standartinių fenolinių junginių antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą.
5. Pritaikyti ESC pokolonėlinius metodus augalinių žaliavų ekstraktų ir jų preparatų antioksidantų sudėties bei antioksidantinio aktyvumo įvertinimo tyrimams.

**Mokslinio darbo naujumas.** Pirmą kartą validuoti ESC pokolonėliniai antioksidantinio aktyvumo įvertinimo metodai pagal šiuos validacijos para­metrus: specifiškumas, glaudumas, aptikimo riba, nustatymo riba ir tiesiš­kumas. Augalinių antioksidantų tyrimai atlikti dviejose ESC pokolonėlinėse sistemose, taip pat naudotos kelios skirtingos augalinių žaliavų ekstraktų ir jų preparatų chromatografinio skirstymo metodikos.

Pirmą kartą ESC pokolonėlinei reakcijai atlikti panaudotas FRAP rea­gentas, kuris įvertina tiriamų junginių redukcines savybes pagal geležies jono redukcijos galią. Apskaičiuotas ABTS/FRAP TEACS santykis, nusa­kantis labiau išreikštą junginio savybę – gebėjimą surišti laisvuosius radi­kalus ar redukuoti geležies jonus.

Pirmą kartą skysčių chromatografijos pokolonėliniais metodais nustatyti *Perilla* ir *Fragaria* genties augalų pagrindiniai antioksidantinėmis savybė­mis pasižymintys junginiai. Kiekiniam antioksidantinio aktyvumo įvertini­mui apskaičiuotos troloksui ekvivalentiškos antioksidantinės galios (TEAC) reikšmės. Nustatyti atskirų junginių indėliai į suminį augalinės žaliavos ekstrakto ar jo preparato antioksidantinį aktyvumą. Atrinkti dominuojantys antioksidantai, kurie gali būti panaudoti kaip žymenys vertinant augalinės žaliavos ekstrakto ar jo preparato antioksidantinį aktyvumą.

**Praktinė ir teorinė reikšmė.** Validuoti ESC pokolonėliniai metodai pa­tikimai, tiksliai bei atkartojamai įvertina augalinių žaliavų ekstraktų ir jų preparatų kokybę, nustatant biologiškai aktyvių junginių antioksidantinio aktyvumo kokybinius ir kiekinius rodiklius. Leidžia kontroliuoti antioksi­dantų pasiskirstymą ir stabilumą, nustatyti optimalias žaliavos ar preparato saugojimo sąlygas. Antioksidantinio aktyvumo kiekinė išraiška standartinio antioksidanto ekvivalentais suteikia galimybę standartizuoti augalines žalia­vas bei jų preparatus.

Optimizuotais ir validuotais ESC pokolonėliniais metodais atlikti gudo­belių, paprastųjų raudonėlių, kraujažolės, perilės ir žemuogės genties augalų ekstraktų ir fitopreparatų antioksidantų sudėties tyrimai. Nustatytos būdin­gos augalinių žaliavų ir fitopreparatų antioksidantinio aktyvumo chromato­gramos, įvertinti stipriausiomis antioksidantinėmis savybėmis pasižymintys junginiai. ESC pokolonėliniai metodai yra veiksminga priemonė augalų atrankai tarp skirtingų rūšių, varietetų, fenologinio tarpsnio ir auginimo są­lygų tam, kad būtų užtikrinta gausi antioksidantų sudėtis.

**Darbo rezultatų aprobavimas.** Tyrimų rezultatai pristatyti 6 mokslinėse konferencijose:NoSSS 2009 – 5th Conference on separation and Related Techniques by Nordic separation Science Society (2009 m. rugpjūčio 26-29 d., Talinas, Estija); 5th International Conference on Polyphenols Applica­tions "Bridging Bioefficacy to Innovations & Applications" & 6th Interna­tional Conference on Skin-Ageing and Antioxidants (2009 m. spalio 29-30 d., Malta); 3-oji nacionalinė mokslinė konferencija "Mokslas – žmonių sveikatai" (2010 m. balandžio 7 d., Kaunas, Lietuva); 18th International Stu­dent Scientific Conference for Students and Young Doctors (2010 m. balan­džio 22-24 d., Gdanskas, Lenkija); 4th International Conference “The Vital Nature Sign” (2010 m. birželio 5-6 d., Kaunas, Lietuva); The 19th Interna­tional Student Scientific Conference for Students and Young Doctors (2011 m. gegužės 12-14 d., Gdanskas, Lenkija).

Tyrimų tematika paskelbtos 4 mokslinės publikacijos, iš kurių 3 išspaus­dintos leidiniuose, įtrauktuose į Mokslinės informacijos instituto duomenų bazę.

**Darbo apimtis ir struktūra.** Daktaro disertaciją sudaro įvadas, literatū­ros apžvalga, tyrimų objektai ir metodai, tyrimų rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas (249 literatūros šaltiniai), disertacijos tema pa­skelbtų publikacijų sąrašas. Darbe pateikta 14 lentelių ir 29 paveikslai. Di­sertacijos apimtis 114 puslapių.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

# 1.1. Laisvieji radikalai biologinėse sistemose

Elektronų pernaša yra vienas svarbiausių procesų chemijoje ir biologi­joje. Medžiaga, kuri geba prisijungti elektronus, yra oksidatorius ir cheminė reakcija vadinama redukcija. Priešingai, medžiaga atiduodanti elektronus – reduktorius, o cheminė reakcija apibrėžiama kaip oksidacija [122, 133]. Re­duktoriaus elektronų perdavimas oksidatoriui lemia tai, kad reduktorius yra oksiduojamas, o oksidatorius – redukuojamas.

Biologinėse sistemose elektronų pernaša nuo vienos molekulės ant kitos vykdoma keturiais skirtingais keliais [95, 186]:

1. Tiesioginis elektronų perdavimas. Pvz.: Fe2+ + Cu2+ → Fe3+ + Cu+;
2. Elektronų pernaša per vandenilio atomą. Vandenilio atomas turi pro­toną (H+) ir elektroną (e-). Pvz.: AH2 ↔ A +2e- +2H+;
3. Elektronų pernaša per hidrido joną (H-). Hidrido jonas turi du elektronus ir yra labai reaktyvus. Biologinėse sistemose jį tiesiogiai perneša su nikotinamido adenino dinukleotidu (NAD) susijusios dehidrogenazės. Pvz.: mitochondrijų kvėpavimo grandinė.
4. Elektronų pernaša per tiesioginį susijungimą su deguonimi. Molekulinis deguonis jungiasi su organinėmis molekulėmis ir oksiduoja angliavandenilius iki alkoholių, aldehidus iki rūgščių ir t.t. Pvz.: R–CH3 + 1/2O2 → R–CH2–OH.

Biologinėse sistemose reduktorius elgiasi kaip elektronų donoras daž­niausiai atiduodamas vandenilį arba prisijungdamas deguonį. Oksidatorius veikia kaip elektronų akceptorius t.y. prisijungia vandenilį arba praranda deguonį [186]. Oksidacija neįmanoma be kitos medžiagos redukcijos. Tai oksidacijos-redukcijos arba tiesiog redokso reakcijos [122].

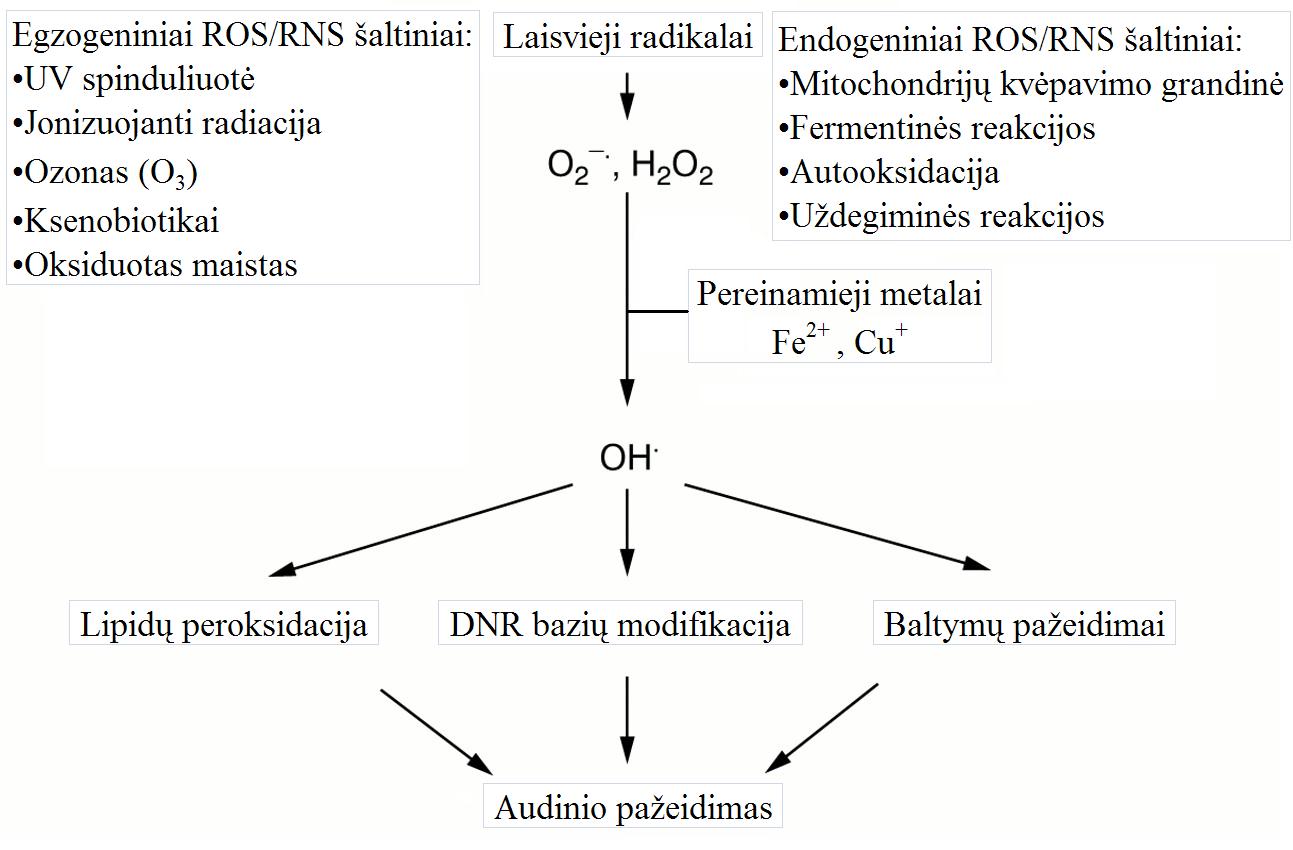
Redokso reakcijos yra pagrindas daugeliui biocheminių kelių ir ląstelėje vykstančių cheminių bei biosintezės procesų reguliavimui [122]. Jos taip pat svarbios oksidacinio streso fenomenui ir laisvojo radikalo/antioksidanto efektams suvokti. Reduktorius ir oksidatorius yra cheminiai terminai, biolo­ginėse sistemose jie vadinami atitinkamai antioksidantu ir prooksidantu [43, 122]. Prooksidantas – tai medžiaga, kuri gali sukelti svarbiausių ląstelės makromolekulių (lipidų, nukleorūgščių, baltymų) oksidacinius pažeidimus. Labai didelę prooksidantų dalį biologinėse sistemose sudaro reaktyvios de­guonies formos (ROS) ir reaktyvios azoto formos (RNS), kurios skirstomos į dvi grupes – radikalus ir neradikalus (1.1 lentelė). Visos šios formos pri­klausomai nuo susidarymo vietos ir koncentracijos gali būti ir naudingos, ir žalingos [230].

***1.1 lentelė.*** *Dažniausiai biologinėse sistemose sutinkami ROS/RNS radikalai ir neradikalai.*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Reaktyvios deguonies formos (ROS)** | | **Reaktyvios azoto formos (RNS)** | |
| **Radikalai** | Hidroksilo radikalas | HO• | Azoto monoksido radikalas | NO• |
| Superoksido radikalas | O2•- | Azoto dioksido radikalas | NO2• |
| Alkoksilo radikalas | RO• |  |  |
| Peroksilo radikalas | ROO• |  |  |
| **Neradikalai** | Vandenilio peroksidas | H2O2 | Diazoto trioksidas | N2O3 |
| Singletinis deguonis | 1O2 | Peroksinitrito anijonas | ONOO- |
| Ozonas | O3 | Peroksinitrito rūgštis | ONOOH |
| Hipochlorito rūgštis | HOCl | Nitrozoperoksikarbonatas | ONOOCO2- |
| Hipobromito rūgštis | HOBr |  |  |

Laisvuoju radikalu vadinama bet kuri atomų ar molekulių rūšis, kurios valentiniame sluoksnyje yra vienas ar daugiau nesuporuotų elektronų [105]. Tokiems dariniams būdingas ypatingai didelis cheminis reaktyvumas. Lai­svieji radikalai nestabilūs, linkę prisijungti arba atiduoti elektronus (redu­kuotis arba oksiduotis) ir įgauti stabilesnę būseną, kai elektronai yra supo­ruoti. Laisvieji radikalai gali tam tikrą laiką (10−6 sekundės arba mažiau) gyvuoti laisva forma [105]. Vienas svarbiausių parametrų įtakojančių radi­kalo veikimo mechanizmą (oksidatorius ar reduktorius) yra jo redokso po­tencialas, kuris apibūdina pajėgumą redukuoti kitą junginį. Neigiamą stan­dartinį redokso potencialą turinti sistema gali redukuoti sistemą, kuri turės mažiau neigiamą ar teigiamą standartinį redokso potencialą [151]. Iš žinomų laisvųjų radikalų hidroksilo radikalas (HO•) turi teigiamiausią standartinį redokso potencialą (2310 mV) ir yra laikomas stipriausiai oksiduojančiu radikalu susiformuojančiu biologinėje sistemoje [151]. Jis veikia visas bio­loginių molekulių rūšis ir lemia pagrindinę oksidacinių pažaidų dalį [80, 230]. Žinoma didelė neradikalinių junginių įvairovė, kai kurios iš jų nepa­prastai reaktyvios. Pavyzdžiui, protonizuota peroksinitrilo (ONOOH) forma yra stiprus prooksidantas. ONOOH sukeltos biologinių molekulių oksidaci­jos pažaidos labai panašios į HO• radikalo sukeltus pažeidimus [122].

Reaktyvios deguonies/azoto formos, jų radikalai ir neradikalai, biologi­nėse sistemose formuojasi nuolat. Jų susidarymas skatinamas išorinių (egzo­geninių) ir vidinių (endogeninių) veiksnių (1.1.1 pav.) [105, 122]. Egzoge­niniai ROS/RNS šaltiniai labai įvairūs ir apima platų aplinkos poveikių spektrą. Ultravioletiniai (UV) spinduliai ir didelės energijos (α, β, γ) spin­duliuotė sąlygoja daugelio radikalinių ir neradikalinių reaktyvių formų susi­darymą odoje, tokių kaip hidroksilo (HO•) radikalas, vandenilio peroksidas (H2O2), superoksido (O2•-) radikalas, singletinis deguonis (1O2) ir kt [147]. Ozonas (O3) apsaugo nuo kenksmingo UV spindulių poveikio, taip pat jis naudojamas kaip dezinfekuojanti priemonė prieš įvairius patogeninius mi­kroorganizmus. Tačiau O3 gali oksiduoti biologines molekules ir skatinti radikalų ir žalingų neradikalų formavimąsi [122]. Didelė įvairovė ksenobio­tikų (vaistai, toksinai, oro teršalai, pesticidai) ir jų metabolizmas *in vivo* są­lygomis didina reaktyvių deguonies/azoto formų produkciją [198]. Biologi­nių molekulių grandinines oksidacijos reakcijas gali sukelti ir oksiduoti maisto produktai dėl riebiųjų rūgščių ir/ar oksisterolių peroksidacijos [32].



***1.1.1 pav.*** *Pagrindiniai ROS/RNS šaltiniai ir laisvųjų radikalų sukeliami pažeidimai.* [105]

Endogeniniai ROS/RNS šaltiniai yra daug svarbesni nei egzogeniniai, kadangi vidiniai reaktyvių radikalinių ir neradikalinių deguonies/azoto formų gamybos procesai yra nenutrūkstantys ir reikalingi specifinėms funk­cijoms atlikti. Pagrindinis endogeninis ROS šaltinis ląstelėje fiziologinėmis sąlygomis susijęs su mitochondrijų kvėpavimo grandinės elektronų pernašos reakcijomis, kurių metu, „nukrypus“ elektronams nuo grandinės tarpinių komponentų link deguonies, susidaro O2•- radikalai [9, 110]. Kitas svarbus ROS/RNS šaltinis yra tam tikrų fermentų aktyvumo padidėjimas. Azoto oksido sintazė ir ksantino oksidazė atitinkamai skatina azoto monoksido radikalo (NO•) ir O2•- radikalo produkciją [213]. Kepenyse esanti citoch­romo P450 oksidazė taip pat gali produkuoti didelius kiekius O2•- radikalų. Reaktyvios deguonies/azoto formos yra daugelio fermentinių reakcijų (ant­inksčių hormonų sintezė) tarpiniai produktai [105]. Biologinių molekulių autooksidacija labai svarbus ROS/RNS šaltinis *in vivo*. Redukuoti anglies junginiai − lipidai, baltymai, sacharidai, nukleorūgštys − linkę savaime oksiduotis. Autooksidacijos metu sudaryti O2•- ir H2O2 gali hidrochinonai, katecholaminai, tioliai, redukuotas feredoksinas, hemoglobinas, mioglobi­nas. Laisvi pereinamieji metalai katalizuoja biologinių molekulių autooksi­daciją. Daugelio ligų patogenezei svarbiausi geležies (Fe2+) ir vario (Cu+) jonai [219]. O2•- ir H2O2 nėra labai aktyvūs, tačiau sąveikaudami su Fe2+ ar Cu+ jonais, jie kartu gali sudaryti labai aktyvų HO• radikalą.

H2O2 + Fe2+/Cu+ → HO• + OH– + Fe3+/Cu2+ (1)

H2O2 + O2•- + Fe2+/Cu+ → HO• + OH– + Fe3+/Cu2+ (2)

Šios reakcijos vadinamos Fentono (*Fenton*) (1) ir Haberio-Veiso (*Haber-Weiss*) (2) reakcijomis. Tai svarbiausias HO• radikalų šaltinis *in vivo*. Jei mažiau aktyvūs ROS/RNS gali būti fiziologiškai naudingi, tai HO• radikalai sukelia tik žalingą poveikį. Dėl šios priežasties labai svarbu, kad laisvi Fe2+ ir Cu+ jonai būtų surišti su baltymais [105]. Uždegiminių reakcijų metu aktyvuojami makrofagai ir limfocitai, kurie produkuoja uždegimo mediato­rius. Generuojami dideli kiekiai laisvųjų radikalų (oksidacinis „pliūpsnis“), įvyksta gretimų audinų ląstelių (lipidų, baltymų, nukleotidų) pažeidimai. Aktyvuotos fagocitinės ląstelės (neutrofilai, monocitai ir makrofagai) gamina reaktyvias deguonies, azoto, halogenų formas, kurios naudojamos įvairiuose mechanizmuose prieš infekciją [87, 130]. Endogeniniai ROS/RNS svarbūs ląstelių dauginimosi, tam tikrų signalų perdavimo valdymui, programuotos ląstelės mirties (apoptozės) mechanizmo regulia­vimui [65, 207, 208].

Įprastinėmis sąlygomis ROS/RNS koncentracija ląstelėje yra nedidelė. Išlaikomas atitinkamas prooksidantų/antioksidantų balansas. Ląstelės makromolekulės apsaugomos nuo žalingo laisvųjų radikalų poveikio. Tačiau šis balansas gali pasislinkti link prooksidantų dėl įvairių vidinių ir išorinių faktorių, tokių kaip liga, bloga mityba, gyvenimo būdas, nepalan­kios aplinkos sąlygos [122]. Generuojamas nevaldomas ROS/RNS radikalų ir neradikalų kiekio didėjimas ląstelėje. Išsekus antioksidantinės apsaugos sistemoms, sukeliami svarbiausių ląstelės struktūrų – lipidų [149], nukleo­rūgščių [23], baltymų [136] – oksidaciniai pažeidimai. Ši būsena vadinama oksidaciniu stresu.

Oksidacinio streso metu pažeidžiamos visos ląstelių membranos, kadangi jose yra didelė koncentracija oksidacijai jautrių fosfolipidų [2]. Oksidacinis lipidų pažeidimas vadinamas peroksidacija. Jautriausios yra polinesočiosios riebalų rūgštys dėl dvigubų jungčių angliavandenilių grandinėse, kurios palengvina vandenilio atomo atidavimą laisviesiems radikalams. Peroksida­cijai būdingos grandininės reakcijos. Išskiriamos trys jų stadijos: pradžia (angl. *initiation*), sklidimas (angl. *propagation*) ir baigtis (angl. *termination*) [122]. Pradžios stadijoje laisvieji radikalai inicijuoja vandenilio atomų „atėmimą“ iš polinesočiųjų riebalų rūgščių grandinių (RH) ir skatina lipidi­nių radikalų (R•) susidarymą (3):

OH• + RH → R• + H2O (3)

Sklidimo stadijoje R• reaguoja su O2 molekule ir susidaro peroksilo (ROO•) radikalas (4):

R• + O2 → ROO• (4)

ROO• radikalas atima vandenilio atomą iš kitos šalia esančios RH, paversdamas ją R• radikalu, o pats virsta hidroperoksilu (ROOH) (5):

ROO• + RH → ROOH + R• (5)

Katalizuojant pereinamiesiems metalams, ROOH gali skilti į alkoksilo (RO•) ir ROO• radikalus. Tolesnė reakcijų grandinė tęsiama, kol neįvyksta baigties stadija. Peroksidacija nutraukiama, jei du laisvieji radikalai susijun­gia ir sudaro produktus, kurie nėra radikalai (6):

ROO• + ROO• → neradikaliniai produktai (6)

„Neradikaliniai produktai“ dažniausiai yra didelės susiūtos riebalų rūgš­tys ar fosfolipidai, kurie būdingi peroksiduotoms ląstelių membranoms. Tokios membranos netenka lankstumo, praranda atrankaus barjero savybes, galiausiai ima irti. Lipidų peroksidacijos žalingas poveikis neapsiriboja membranų pažaida. Jos kenksmingumą ląstelei didina tai, kad vandenyje tirpūs peroksidacijos produktai difunduoja į kitas ląstelės dalis ir inicijuoja antrines pažaidas [111]. Sukelia baltymų agregaciją, slopina fermentų funk­cijas, sudaro tiltelius DNR molekulėse (tai lemia mutacijas ir pakitusią genų raišką) [149].

RNR ir DNR molekulių oksidaciniai pokyčiai gali sutrikdyti transkrip­ciją, transliaciją, replikaciją, lemti mutacijas, senėjimą ir mirtį. Dažniausiai sukeliamos šios oksidacinės pažaidos: DNR bazių modifikacijos arba jų pašalinimas, viengrandžiai ir dvigrandžiai DNR trūkiai, DNR-DNR ir DNR-baltymų sąsiuvos, dezoksiribozės pakitimas. Sutrikdoma DNR atstatymo sistema [2]. OH• gali modifikuoti visas heterociklines bazes. Guaninas ver­čiamas į 8-hidroksideoksi-guanoziną (8-OHdG), 8-hidroksiguaniną, adeni­nas – į 8 (arba 4-, 5-)-hidroksiadeniną [91]. Pirimidino bazių pažeidimų metu susidaro timino peroksidai, glikoliai, 5-(hidroksimetil) uracilai ir kt. [8, 23, 60]. Dar viena labai žalinga oksidacinė modifikacija yra apurininių ir apirimidininių sričių susidarymas (DNR sritys neturinčios heterociklinių bazių). Visi šie pokyčiai sudaro netipiškas komplementarias poras replika­cijos metu ir skatina dvigubos DNR spiralės suardymą [200].

Baltymai yra ląstelės membranos sudėtinė dalis, jų pagalba formuojami ląstelės griaučiai, reguliuojami ląstelės gyvybiniai procesai, atliekamos sudėtingos cheminės reakcijos. Oksidacinis stresas pažeidžia ir šias svarbias ląstelės makromolekules. Svarbiausi baltymų oksidaciniai pažeidimai yra: aminorūgščių šoninių funkcinių grupių oksidavimas, peptidinės grandinės skilimas (baltymų skaidymas į atkarpas) ir skersinės baltymų sąsiuvos [24, 55]. Laisvieji radikalai lengvai oksiduoja metionino ir aromatines grupes. Baltymų –SH grupės linkusios autooksidacijai, kurios metu susidaro disulfi­dinis -S-S- tiltelis. Toks susiuvimas pakeičia baltymo struktūrą, ji pasidaro nelanksti ir tai lemia didelių inaktyvintų baltymų kompleksų susidarymą [111]. Dėl oksidacinių pažeidimų fermentai praranda aktyvumą, pakinta vidiniai ląstelės procesai, tokie kaip energijos gamyba. Sutrikdomas ląstelės membraninis potencialas [76, 136]. Baltymų oksidacijos procesas yra sudė­tingas dėl cheminės sudėties ir struktūros įvairovės. Susidaro daug skirtin­gos cheminės struktūros oksiduotų produktų.

Oksidacinis stresas, pažeisdamas ląstelės lipidus, nukleorūgštis ir balty­mus, lemia svarbiausių su amžiumi susijusių ligų etiologiją, tokių kaip širdies ir kraujagyslių susirgimai, Parkinsono ir Alzheimerio ligos, kata­rakta, vėžiniai susirgimai [145, 194, 230, 235]. Bendras lipidų peroksidaci­jos ir antrinių efektų poveikis lemia aterosklerozę, kuriai būdingos arterijų pažaidos, sukeltos daug cholesterolio turinčių plokštelių kraujagyslių siene­lėse. Aterosklerozė yra pagrindinė širdies susirgimų, tokių kaip miokardo infarktas, priežastis. Išemijos metu yra sutrikdomas ląstelės aprūpinimas deguonimi, substratais, bei metabolitų šalinimas. Ląstelėje atsiranda funkci­niai bei struktūriniai pokyčiai, kurie, ilgėjant išemijos trukmei, tampa negrįžtami, ir ląstelė žūva. Atsistačiui kraujotakai ir deguonies koncentraci­jai, paradoksalu, bet prasideda antrinės pažaidos, dėl labai suaktyvėjusios ROS/RNS generacijos [211]. Nervinės ląstelės yra žymiai jautresnės oksi­daciniam stresui dėl didelio kiekio polinesočiųjų riebalų rūgščių membra­nose. Be to, smegenims būdingas didelis deguonies poreikis. Parkinsono ligos atveju ląstelės, kurios gamina dopaminą (juodojoje medžiagoje), yra pažeistos ir tai lemia nepakankamą dopamino kiekį. Patogenezė nėra iki galo aiški, tačiau manoma, kad laisvieji radikalai yra vienas iš pažeidžiančių faktorių. Parkinsono liga sergančiuose ligoniuose buvo nustatytos didesnės OH• ir Fe2+ koncentracijos (Fentono reakcija), lipidų peroksidacijos žyme­nys [109]. Alzheimerio ligos atveju stebimas amiloidinių plokštelių kaupi­masis, nervinių ląstelių pažaida bei neuromediatorių kiekio sumažėjimas. Manoma, kad netirpių baltyminių darinių susidarymui didelę įtaką turi ROS/RNS radikalai ir neradikalai. Organizmui senstant, neurodegeneracinių ligų atsiradimo rizika didėja [182]. Kataraktai būdinga nusilpusi rega ar net apakimas dėl akies lęšiuko drumstumo. Akies lęšiuke yra baltymų, vadi­namų kristalinais, kuriuos lengvai pažeidžia laisvieji radikalai. Kristalinų molekulėse atsiranda papildomų kovalentinių ryšių ir junginiai praranda skaidrumą [230]. Oksidacinių DNR pažeidimų sukeltos mutacijos įtakoja vėžinių susirgimų iniciaciją ir vystymąsi. Genetinės medžiagos pažaidos veikia ląstelių augimo ir dauginimosi reguliavimą. Sukeliamas nekontro­liuojamas pažeistų lastelių dauginimasis, kurios sugeba paveikti kitus audi­nius bei išplisti į kitas kūno vietas (metastazės) [7, 86, 114].

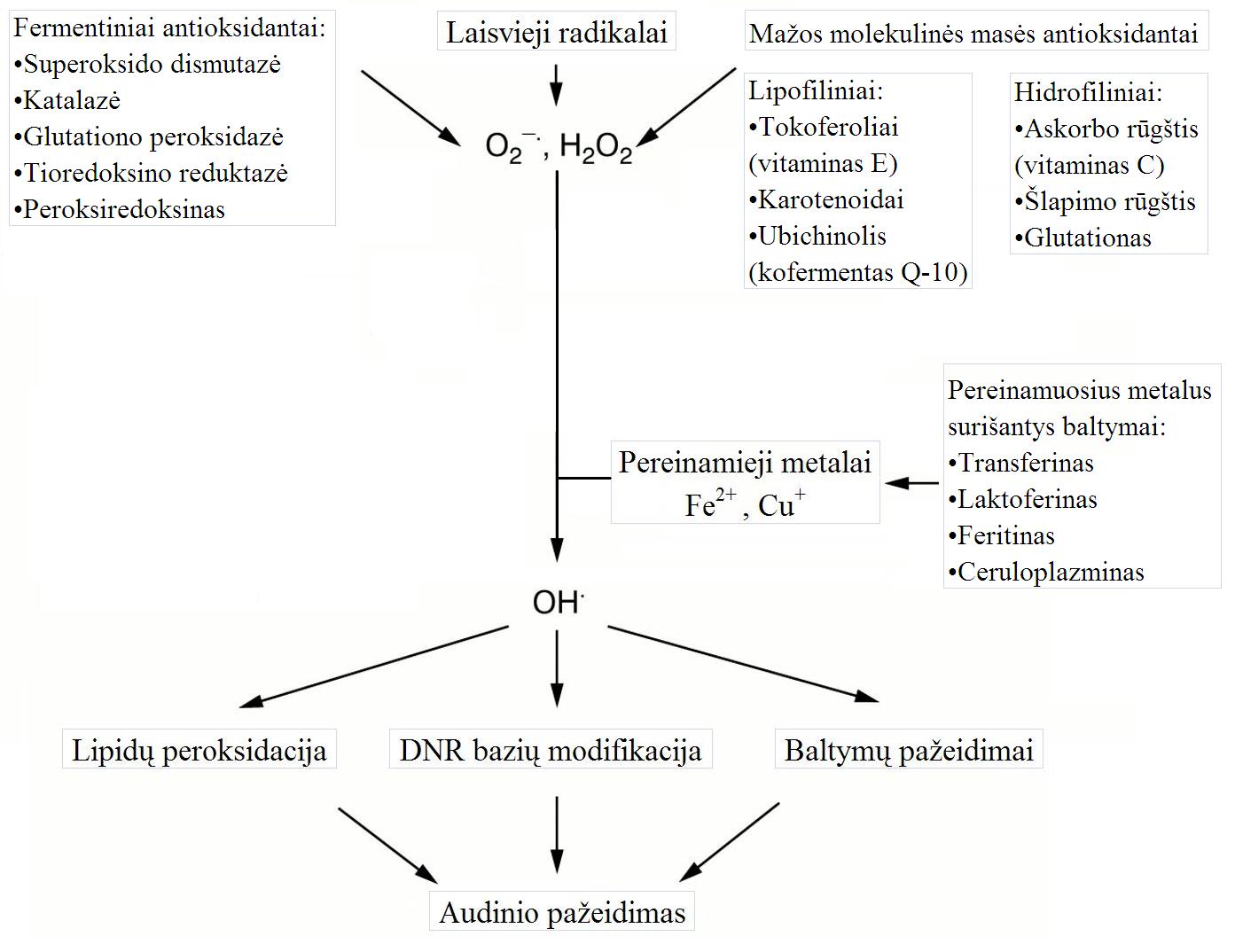
Epidemiologinių tyrimų metu nustatyta, kad antioksidantai apsaugo ląsteles nuo žalingo ROS/RNS radikalų ir neradikalų poveikio, tuo pačiu geba sumažinti anksčiau išvardintų ligų progresavimą [82, 205, 172].

# 1.2. Antioksidantai. Klasifikacija ir apsauginės jų savybės

Antioksidantas – tai medžiaga, kuri efektyviai redukuoja prooksidantą sudarydama netoksiškus arba mažai toksiškus junginius, taip išvengiami arba sumažinami biologinių taikinių oksidaciniai pažeidimai. Tikslesnį anti­oksidanto apibrėžimą pasiūlė Halliwell ir kt [81]. Jie teigia, kad antioksi­dantas tai tokia medžiaga, kurios net ir mažos koncentracijos, palyginus su oksiduojama medžiaga, geba reikšmingai sumažinti arba visiškai apsaugoti biologinius taikinius nuo oksidacijos. Taigi pagal šį apibrėžimą ne visi reduktoriai dalyvaujantys biocheminėse reakcijose yra antioksidantai. Tik tie junginiai, kurie geba apsaugoti biologinius taikinius, atitinka antioksi­dantui keliamus reikalavimus [215].

Antioksidantai žmogaus organizme sudaro sudėtingą daugiakomponen-tinę gynybinę sistemą, kuri užtikrina ROS/RNS radikalų ir neradikalų sujungimą, modifikaciją, slopinimą arba ardymą. Antioksidantinę ląstelės apsaugą sudaro: fermentiniai antioksidantai, pereinamuosius metalų jonus surišantys baltymai ir mažos molekulinės masės antioksidantai (1.2.1 pav.) [105].

Svarbiausi fermentiniai antioksidantai yra superoksido dismutazė (SOD), katalazė, glutationo peroksidazė, tioredoksino reduktazė ir peroksiredoksi-nas [146]. Šie fermentai lemia pirmos eilės antioksidantinę apsaugą prieš ROS/RNS perteklių. Superoksido dismutazės skirtingi izofermentai aptin­kami ląstelės citoplazmoje (SOD1), mitochondrijose (SOD2) ir ekstraląste­liniame skystyje (SOD3). Superoksido dismutazė detoksikuoja O2•- radikalą, vieną pagrindinių prooksidantų žmogaus organizme, sudarydama H2O2 ir deguonį [182]. Katalazė katalizuoja H2O2 skaidymą į vandenį ir deguonį. Šio fermento daugiausia yra peroksisomose ir šiek tiek mažiau – citoplaz­moje. Fagocitinės ląstelės turi daug katalazės, kuri saugo jas pačias nuo gaminamo H2O2 žalingo poveikio. Glutationo peroksidazė randama praktiš­kai visose ląstelėse ir jos funkcija yra suskaidyti ROOH į atitinkamą alko­holį bei H2O2, susidariusį mitochondrijose, paversti į vandenį. Glutationo peroksidazė kartu su kitais fermentais detoksikuoja oksidacijos pažeistas biologines molekules, baltymų ir pereinamųjų metalų chelatus [111, 200]. Mikroelementai, tokie kaip varis, selenas, cinkas, yra būtini fermentinės gynybos sistemai ir vadinami fermentinių antioksidantų kofaktoriais. Jie priklauso netiesioginiams antioksidantams. Netiesioginiai antioksidantai nesuriša laisvųjų radikalų, tačiau skatina ilgalaikį bendrą ląstelės antioksi­dantinį pajėgumą, didina veiklių antioksidantinės apsaugos fermentų kiekį [249]. Šiai grupei taip pat priskiriamos biomolekulės inaktyvuojančios oksi­dacinius fermentus, pavyzdžiui, ciklooksigenazę.



***1.2.1 pav.*** *Pagrindiniai ląstelės antioksidantinės apsaugos komponentai.* [105]

Transferinas, laktoferinas, feritinas ir ceruloplazminas suriša pereinamųjų metalų jonus ir nutraukia Fentono ir Haberio-Veiso reakcijas. Geležies jonus perneša transferinas ir laktoferinas. Kraujyje ir tarpląsteliniame skys­tyje Fe3+ jonai deponuojami drauge su feritinu. Pagrindinis vario jonus sujungiantis baltymas ceruloplazminas veikia kaip fermentinis antioksidan­tas, kuris katalizuoja Fe2+ virtimą į Fe3+. Greita Fe2+ oksidacija į mažiau reaktyvią Fe3+ formą laikoma antioksidantiniu efektu [15].

Daugelis ROS/RNS pažeidžia pačius fermentinius antioksidantus ir sutrikdo jų veiklą. Nėra žinoma fermentų, kurie inaktyvuotų HO•, ROO•, 1O2 ir ONOO-. Šie radikalai ir neradikalai kartu su O2•- ir H2O2 yra tarp šešių pagrindinių faktorių sukeliančių oksidacinius biologinių molekulių pažeidi­mus [97]. Mažos molekulinės masės antioksidantai geba priimti arba ati­duoti elektronus minėtoms ROS/RNS formoms ir sudaryti stabilius, neža­lingus bioproduktus. Tai labai svarbus antioksidantinės sistemos papildy­mas. Mažos molekulinės masės antioksidantai skirstomi į tirpius riebaluose (lipofilinius) ir tirpius vandenyje (hidrofilinius). Pagrindinis lipofilinis anti­oksidantas yra vitaminas E – tai 8 izomerų mišinys (4 tokoferoliai ir 4 toko­trienoliai), svarbiausias iš jų α-tokoferolis [85]. Vitaminas E apsaugo ląste­lių membranas nuo oksidacijos. Jis veiksmingai stabdo grandinines lipidų peroksidacijos reakcijas. Vitamino E molekulei būdingas aromatinis žiedas su hidroksi grupe ir šonine hidrofobine grandinėle, kurios dėka jis prisijun­gia prie membranos ir ją stabilizuoja. Hidroksi grupė geba atiduoti vandeni­lio atomą arba elektroną greičiau nei polinesočiosios riebalų rūgštys ir taip neutralizuoja žalingus 1O2 ir ROO• poveikius [80, 165]. Kitas žinomas riebaluose tirpus antioksidantas yra ubichinolis, redukuota kofermento Q-10 forma [210]. Ubichinolis svarbus mitochondrijų kvėpavimo grandinės elek­tronų pernašos komponentas, aptinkamas vidinėje mitochondrijų membra­noje. Tačiau jis gali tiesiogiai inaktyvuoti lipidų peroksidacijos produktus. Ubichinolis taip pat regeneruoja α-tokoferolio radikalą į aktyvią α-tokofero­lio formą [134]. Karotenoidai – tai grupė riebaluose tirpių antioksidantų. Svarbiausias iš jų yra β-karotenas. Karotenoidai efektyviai suriša 1O2, mažiau – ROO• radikalus [72]. Mažose deguonies koncentracijose jų akty­vumas panašus α-tokoferolio antioksidantinį aktyvumą. Tam tikri karote­noidai yra vitamino A (retinolio) pekursoriai. Vitaminas A taip pat turi anti­oksidantinių savybių, kurių efektyvumas nepriklauso nuo deguonies kon­centracijos ląstelėje [118].

Hidrofiliniai antioksidantai suriša laisvuosius radikalus vandeninėje ter­pėje. Svarbiausias šios grupės antioksidantas yra vitaminas C arba askorbo rūgštis. Vitaminas C žmogaus organizme katalizuoja keletą fermentinių reakcijų. Askorbo rūgštis gerai žinoma kaip prolilo ir lizilo oksidazių, sin­tetinančių kolageną, kofaktorius [105]. Vitaminas C taip pat pasižymi labai stipriomis antioksidantinėmis savybėmis. Jis suriša O2•-, H2O2, HO•, ROO•, 1O2 ir HOCl. Oksiduotas vitaminas C (dehidroaskorbo rūgštis) regeneruo­jamas dviem keliais: seleno turinčiu fermentu tioredoksino reduktaze [141] arba nefermentine reakcija, kurios metu naudojamas redukuotas glutationas [142]. Vitaminas C yra svarbiausias vitamino E izomerus regeneruojantis antioksidantas. Tarpląsteliniuose skysčiuose askorbo rūgšties koncentracija yra didesnė nei glutationo, todėl jis – pagrindinis tarpląstelinis antioksidan­tas. Be vitamino C plazmoje aptinkamos didelės koncentracijos kitų anti­oksidantų. Vienas tokių yra − šlapimo rūgštis. Šis galutinis purinų apykaitos produktas tiesiogiai suriša laisvuosius radikalus virsdamas alantoinu [75]. Taip pat šlapimo rūgštis sudaro chelatinius junginius su pereinamaisiais metalais. Svarbi šlapimo rūgšties savybė yra jos gebėjimas neutralizuoti O3 ir ONOO- [50]. Kiti svarbūs hidrofiliniai antioksidantai yra tiolo grupes turintys baltymai – albuminas ir glutationas [105]. Albuminas yra domi­nuojantis plazmos baltymas. Jis neutralizuoja ROO• radikalus [218]. Ši albumino savybė yra svarbi, kadangi jis kraujyje perneša laisvas riebiąsias rūgštis. Albuminas yra pagrindinis plazmos antioksidantas prieš fagocitinių ląstelių produkuojamą HOCl [96]. Glutationas svarbiausias ląstelinis tiolo grupių šaltinis [203]. Jis neutralizuoja 1O2, O2•- ir HO• radikalus. Glutationas stabilizuoja ląstelių membranas, pašalindamas lipidų peroksidacijos pro­duktus [203].

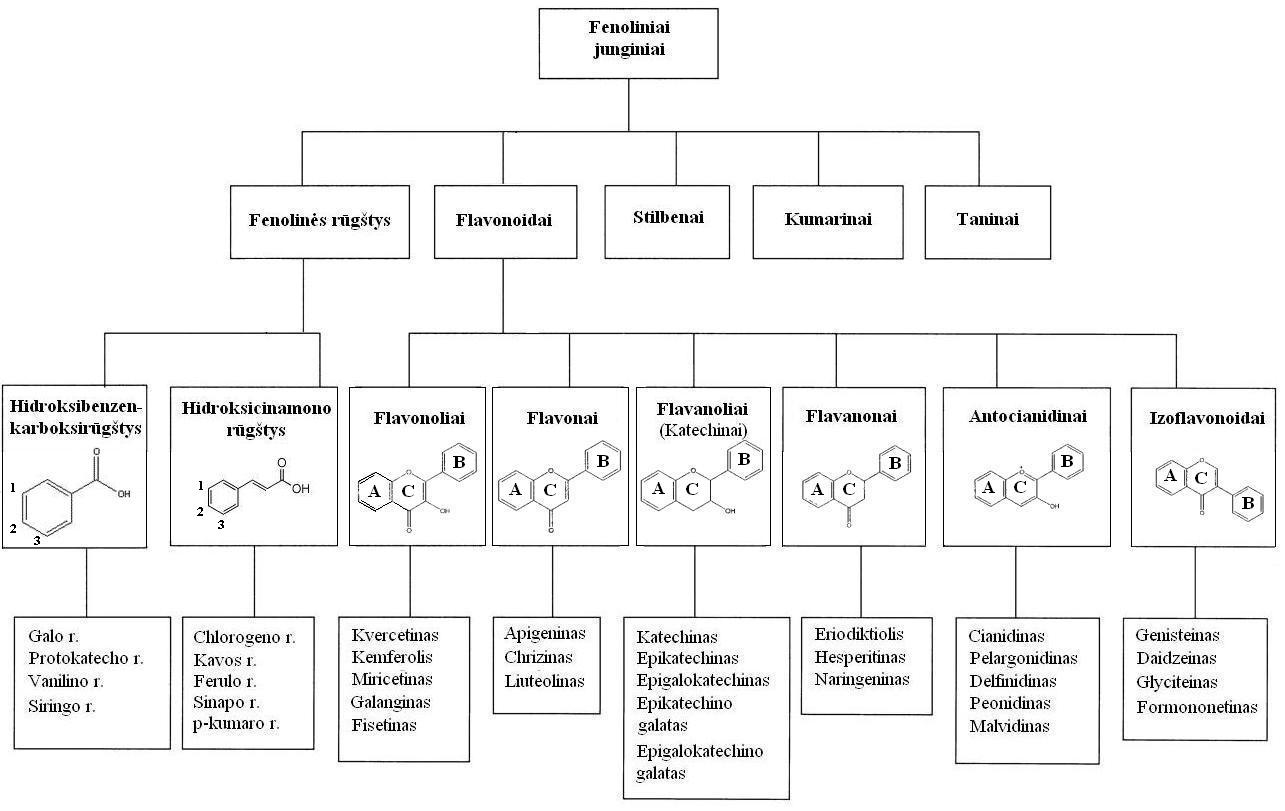
Daugelis mažos molekulinės masės antioksidantų (vitaminai E ir C, karotenoidai) žmogaus organizme nesintetinami. Jie gaunami su maistu. Augalinės kilmės maisto produktuose be minėtų antioksidantų gausu ir kitų biologiškai aktyvių medžiagų, kurių didžiausią dalį sudaro fenoliniai jungi­niai [139]. Pastaruoju metu didėja susidomėjimas fenolinių junginių anti­oksidantinėmis savybėmis. Kaip natūralūs priedai jie vis plačiau taikomi maisto ir kosmetikos pramonėje [33].

# 1.3. Fenoliniai junginiai – augaliniai antioksidantai

Fenoliniai junginiai arba polifenoliai yra augaluose vykstančių biochemi­nių procesų (pentozo fosfatų, šikimo rūgšties ir fenilpropanoidų metabolinių kelių) antriniai metabolitai [18, 195]. Juos taip pat sintetina kai kurios grybų, dumblių, bakterijų rūšys. Fenoliniai junginiai svarbūs augalų vysty­muisi ir dauginimuisi. Jie kaip cheminiai signalai dalyvauja ląstelinių ir tarpląstelinių fiziologinių procesų valdyme, o kaip vaizdiniai signalai privi­lioja apdulkinančius vabzdžius. Polifenoliai apsaugo augalus nuo įvairių patogeninių mikroorganizmų, žalingo UV-B spindulių poveikio ir oksidaci­nio streso [126].

Fenolinių junginių struktūrai būdinga nuo vieno iki kelių aromatinių žiedų, kurie turi vieną arba keletą funkcinių hidroksilo grupių. Augaluose polifenoliai dažniausiai sutinkami konjuguoti su įvairiais mono- ar polisa­charidais, prisijungę vieną ar kelias fenolines grupes, arba kaip funkciniai esterių ir metil esterių dariniai [18, 35]. Fenoliniai junginiai pagal molekulės struktūrą skirstomi į 5 klases: fenolinės rūgštys, flavonoidai, stilbenai, kumarinai ir taninai (1.3.1 pav.). Fenolinės rūgštys ir flavonoidai daugiausia junginių turinčios ir labiausiai ištyrinėtos klasės [35].

Fenolinės rūgštys skirstomos į du poklasius: hidroksibenzenkarboksi-rūgštys ir hidroksicinamono rūgštys. Pirmajam poklasiui būdinga C6-C1 struktūra, o individualius rūgščių skirtumus lemia aromatinio žiedo hidro­ksilo (OH-) ir metoksi (CH3O-) grupių pakaitai (1, 2, 3 padėtyse) (1.3.1 pav.). Hidroksibenzenkarboksirūgštis reprezentuoja galo, protokatecho, vanilino, siringo rūgštys. Hidroksicinamono rūgštys turi charakteringą C6-C3 struktūrą su trijų anglies atomų šonine grandinėle. Pagal benzeno žiedo funkcines OH- ir CH3O- grupes skiriamos p-kumaro, kavos, ferulo, sinapo rūgštys. Chlorogeno rūgštis yra kavos rūgšties esteris. Ji viena dažniausiai sutinkamų hidroksicinamono rūgščių augaluose [35].



***1.3.1 pav.*** *Fenolinių junginių klasifikacija.*

Flavonoidai sudaro didžiausią fenolinių junginių grupę. Jiems priski­riama daugiau kaip pusę visų žinomų polifenolių [18]. Tai yra mažos mole­kulinės masės junginiai, sudaryti iš 15 anglies atomų ir charakteringos C6-C3-C6 konfiguracijos. Flavonoido anglikono pagrindas susideda iš dviejų aromatinių žiedų A ir B sujungtų trijų anglies atomų tilteliu, kuris kartu su deguonies atomu sudaro heterociklinį žiedą C. Flavonoidai pagal įvairias C žiedo modifikacijas skirstomi į 6 poklasius: flavonoliai, flavonai, flavanoliai (katechinai), flavanonai, antocianidinai ir izoflavonoidai (1.3.1 pav.) [139, 144]. Labiausiai paplitę ir didele struktūros įvairove pasižymi flavonoliai ir flavonai. Individualius skirtumus tarp to paties poklasio junginių lemia įvai­rūs A ir B žiedų hidroksilo grupės pakaitai, kurie gali būti metilinti, acilinti, sulfatuoti, prenilinti ir glikozilinti. Gamtoje flavonoidai dažniausiai sutin­kami *O*-glikozidų, rečiau *C*-glikozidų forma [90]. Nustatyta daugiau kaip 80 skirtingų cukrų, su kuriais susijungia flavonoidai [93, 139]. Pagrindiniai monosacharidai yra gliukozė, galaktozė, ramnozė, ksilozė, arabinozė ir abiozė, disacharidai – rutinozė ir neohesperidozė, trisacharidai – soforo­triozė [51, 93].

Fenolinių junginių gausu vaisiuose, daržovėse, gėrimuose ir kituose augalinės kilmės maisto produktuose. Polifenoliai laikomi nemaistiniais bioaktyviais mitybos komponentais, kurie pasižymi priešuždegiminiu [150, 221, 238], antialerginiu [104], antibakteriniu [6, 192], priešvirusiniu [137, 237], antioksidantiniu [18, 90, 188], antitrombogeniniu [77], priešvėžiniu [61, 69, 139, 150], kardio- ir vazoprotekciniu [61, 143, 150, 161] poveikiu. Epidemiologiniais tyrimais įrodyta, kad didelis fenolinių junginių kiekis žmogaus mityboje mažina riziką susirgti lėtinėmis ligomis [94, 179]. Polife­nolių nauda sveikatai siejama su jų antioksidantinėmis savybėmis [90]. Daugelio fenolinių junginių antioksidantinis aktyvumas yra daug didesnis nei gerai žinomų antioksidantų askorbo rūgšties ir vitamino E [185]. Pavyz­džiui, epigalokatechino galato redokso potencialas standartinėmis sąlygomis yra 520 mV, tuo tarpu vitamino E ir vitamino C redokso potencialai atitin­kamai 480 mV ir 282 mV [151, 188].

Fenolinių junginių antioksidantinis aktyvumas įrodytas daugybe *in vitro* tyrimų. Jie geba tiesiogiai surišti biologinėse sistemose aptinkamus žalingus O2•-, HO•, ROO• ir NO• radikalus, neradikalinės prigimties ONOO-, 1O2, H2O2 ir HOCl rūgštį [4, 47, 82], taip pat nefiziologinius radikalus, tokius kaip DPPH• ir ABTS•+ [177, 244, 247]. Polifenolių gebėjimas sujungti pereinamųjų metalų jonus (ypatingai Fe2+ ir Cu+), apsaugo ląsteles nuo jų generuojamų laisvųjų radikalų sukelto oksidacinio streso [66, 160]. Fenoli­niai junginiai inhibuoja fermentus, tokius kaip lipooksigenazė ir ciklooksi­genazė, inicijuojančius uždegiminius procesus, kurių metu didėja laisvųjų radikalų gamyba [171, 199]. Jie taip pat slopina oksidacinių fermentų, kaip ksantino oksidazės ir proteino kinazės C, generuojančių O2•- radikalus, NO sintazės, gaminančios NO• radikalus, mieloperoksidazės, atsakingos už HOCl susidarymą, aktyvumą [49, 119, 188]. Flavonoidai gali indukuoti II fazės detoksifikuojančius fermentus (NAD(P)H-kvinono oksidoreduktazė, glutationo S-transferazė ir UDP-gliukuronozil transferazė) prieš oksidacinio streso sukeltas pažaidas [168]. Fenoliniams junginiams būdingos tarpusavio sąveikos su kitais mažos molekulinės masės antioksidantinės sistemos kom­ponentais. Lotito ir Frei [140] nustatė, kad daug flavonoidų turintis maistas didina svarbaus antioksidanto šlapimo rūgšties koncentraciją plazmoje. Kai kurie flavonoidai (kvercetinas, rutinas) apsaugo vitaminą C nuo oksidacijos, bei redukuoja askorbilo radikalą [31, 150]. Fenoliniai junginiai regeneruoja α-tokoferolio radikalą į aktyvią α-tokoferolio formą. Kavos rūgštis, mirice­tinas, kvercetinas, surišdami laisvuosius radikalus, tiesiogiai apsaugo vita­miną E, esantį mažo tankio lipoproteinuose [166, 246]. Nustatyta sinergis­tinė kavos rūgšties ir β-karoteno sąveika [166].

Fenolinių junginių molekulinė struktūra įtakoja laisvųjų radikalų suri­šimo ir pereinamųjų metalų jonų sujungimo aktyvumą. Ši priklausomybė įvardijama kaip struktūros-aktyvumo ryšys. Fenolinių rūgščių antioksidan­tinį aktyvumą lemia funkcinių hidroksi (-OH) grupių skaičius ir pozicija lyginant su karboksi (-COOH) grupe [38, 197, 212]. Monohidroksibenzen-karboksirūgštys turinčios vieną -OH grupę *orto-* ar *para-* padėtyje nepasi­žymi laisvuosius radikalus surišančiu poveikiu, priešingai nei *meta-* padė­tyje [197]. Didėjant -OH grupių skaičiui fenolinių rūgščių molekulėje, didėja ir jų antioksidantinis aktyvumas. Galo rūgštis turinti tris -OH grupes pasižymi stipriomis laisvuosius radikalus surišančiomis savybėmis. Siringo rūgšties molekulėje 3- ir 5- pozicijoje esančios funkcinės metoksi grupės mažina antioksidantinį aktyvumą [197]. Hidroksicinamono rūgščių anti­oksidantinės savybės yra stipresnės nei hidroksibenzenkarboksirūgščių. Didesnį laisvųjų radikalų surišimo aktyvumą lemia CH=CH–COOH grupė hidroksicinamono rūgščių molekulinėje struktūroje, kuri geba lengviau atiduoti vandenilio atomą bei stabilizuoti radikalą nei –COOH grupė hidro­ksibenzenkarboksirūgščių atveju [38, 197, 212].

Flavonoidų molekulių struktūros-aktyvumo ryšys daug sudėtingesnis nei fenolinių rūgščių. Stipriomis antioksidantinėmis savybėmis pasižymi flavo­noidai, kurių molekulėse aptinkamos šios struktūros ypatybės: 1) dvi funk­cinės –OH grupės B žiedo *orto-* padėtyje; 2) C2-C3 dviguba jungtis konjū­guota su funkcine okso- grupe C žiedo 4- pozicijoje; 3) funkcinės –OH gru­pės C žiedo 3- ir A žiedo 5- padėtyse [18, 38, 197]. Visus šiuos reikalavi­mus atitinkančių flavonoidų molekulėse konjūguota dvigubos jungties sistema delokalizuoja elektroną, stabilizuoja susidariusį aroksilo radikalą ir padidina antioksidantinį aktyvumą [197].

Fenolinių junginių struktūros-aktyvumo ryšys biologinėse sistemose tampa daug sudėtingesnis, kadangi antioksidantinis aktyvumas labai priklauso nuo jų pačių fizikocheminių savybių, tokių kaip lipofiliškumas, tirpumas, pasiskirstymas tarp lipofilinės ir hidrofilinės terpės. Polifenolių struktūros-aktyvumo ryšys priklauso ne vien tik nuo naudojamų modelinių sistemų ir biologinių taikinių, bet ir nuo taikomų priemonių oksidacijai sukelti bei metodo oksidacijos mastui įvertinti [71]. Augalinėse žaliavose aptinkama fenolinių junginių įvairovė pasižymi skirtingu antioksidantinio poveikio stiprumu ir įvairiais veikimo mechanizmais.

# 1.4. Antioksidantinio poveikio mechanizmai

Antioksidantai ROS/RNS radikalus ir neradikalus inaktyvuoja dviem pagrindiniais mechanizmais: vandenilio atomo perdavimo (VAP) ir elek­tronų perdavimo (EP) reakcijomis. Galutinis rezultatas vienodas (neutrali­zuotas prooksidantas), tačiau skiriasi reakcijos kinetika ir potencialios šalu­tinės reakcijos [187]. VAP ir EP reakcijos dažnai vyksta vienu metu ir dominuojantis mechanizmas priklauso nuo antioksidanto struktūros ir jo savybių (tirpumo, pasiskirstymo koeficiento) bei terpės (tirpiklio tipo, pH). Jungties disociacijos energija ir jonizacijos potencialas yra du pagrindiniai faktoriai, kurie lemia antioksidantinio poveikio mechanizmą ir antioksidantų efektyvumą [243]. Antioksidantai prieš įvairius prooksidantus elgiasi skir­tingai. Pavyzdžiui, karotenoidai, skirtingai nuo fenolinių junginių, mažai inaktyvuoja ROO• radikalus, tačiau yra išskirtiniai 1O2 surišėjai. Nėra vieno universalaus metodo galinčio tiksliai įvertinti tiriamajame bandinyje esančių junginių suminį antioksidantinį poveikį prieš visus *in vivo* aptinkamus pro­oksidantus, atspindėti antioksidantų tarpusavio sąveikas ar jų elgesį kom­pleksinėse antioksidantinėse sistemose [187]. Suminis antioksidantinis aktyvumas yra sudėtinis parametras, kuris apima: 1) ROS/RNS generacijos slopinimą ir jų surišimo gebėjimą; 2) redukcinę galią; 3) pereinamųjų metalų sujungimo gebėjimą; 4) antioksidantinių fermentų aktyvavimą; 5) oksidacinių fermentų slopinimą. Įvairiapusiškam fenolinių junginių anti­oksidantiniam poveikiui nusakyti, atliekami tyrimai dirbtinėse modelinėse sistemose *in vitro* skirtingais reakcijų mechanizmais su įvairiais oksidantais ir jų taikiniais [151]. Taip sudaromas vadinamasis antioksidantinis vaizdas, pagal kurį prognozuojamas tirtų junginių elgesys *in vivo* sistemose.

VAP reakcijomis pagrįstuose antioksidantinio aktyvumo nustatymo metoduose antioksidantas suriša laisvąjį radikalą atiduodamas vandenilio atomą ir sudarydamas stabilius junginius (AH + X• → XH + A•). Potencialių antioksidantų santykinis reaktyvumas šiuose metoduose priklauso nuo van­denilio donorinių grupių jungties disociacijos energijos (≈ −10 kcal/mol) ir jonizacijos potencialo (< −36 kcal/mol). VAP reakcijų neįtakoja tirpiklio rūšis ir terpės pH. Jos yra labai greitos, trunka nuo kelių sekundžių iki minutės. Redukuojančių priemaišų (pvz.: metalų jonų) buvimas VAP reak­cijomis pagrįstuose metoduose įtakoja klaidingai didesnį antioksidantinį aktyvumą [187].

Plačiausiai taikomi šie VAP reakcijomis pagrįsti antioksidantinio akty­vumo nustatymo metodai: indukuotos mažo tankio lipoproteinų oksidacijos inhibavimas [125], deguonies radikalų absorbcijos galia (angl. *oxygen radi­cal absorbance capacity* – ORAC) [73], antioksidanto sugaudytų radikalų suminis matas (angl. *total radical trapping antioxidant parameter* – TRAP) ir krocino išblukinimo metodas [97]. Šie metodai vertina konkuruojančios reakcijos kinetiką ir antioksidantinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal kinetines kreives. VAP reakcijomis pagrįsti antioksidantinio aktyvumo nustatymo metodai susideda iš sintetinio laisvuosius radikalus generuojan­čio reagento (2,2′-azobis-(2-amidino-propano) hidrochloridas (ABAP), 2,2′-azobis-(2,4-dimetilvaleronitrilas) (AMVN), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenztiazo­lin-6-sulfono rūgštis) (ABTS)) [231, 240], standartinių oksiduojamų mole­kulių (fluorescuojančio substrato) (dichlorofluoresceinas [3], fluoresceinas [164], fluorescuojantis baltymas (R-fikoeritrinas) [187]) ir antioksidanto, kuris su fluorescuojančiu substratu konkuruoja dėl laisvųjų radikalų. Fluo­rescuojančio substrato oksidacija imituoja lipidų peroksidaciją *in vivo*. Metodo sąlygomis dažnai standartinių oksiduojamų molekulių koncentracija yra mažesnė nei antioksidanto koncentracija. Tai prieštarauja realiai situa­cijai *in vivo*. Biologinėse sistemose antioksidantų kiekis žymiai mažesnis nei substrato (pvz.: lipidų) koncentracija. Abejojama, ar tiriamo junginio antioksidantinis aktyvumas nustatytas VAP reakcijomis pagrįstais metodais atitinka realų aktyvumą biologinėse sistemose [97].

Antioksidantinio aktyvumo nustatymo metodai, priklausantys EP reak­cijoms, matuoja antioksidanto gebėjimą atiduoti vieną elektroną ir redukuoti oksidantą, kuris yra stabilus laisvasis radikalas arba kintamo valentingumo metalo jonas [151]:

X• + AH → X– + AH•+

AH•+ + H2O ↔ A• + H3O+

X– + H3O+ → XH + H2O

M(III) + AH → AH+ + M(II)

EP reakcijomis pagrįstuose antioksidantinio aktyvumo nustatymo meto­duose tiriamio junginio reaktyvumas priklauso nuo jo reaktyvių funkcinių grupių jonizacijos potencialo ir deprotonizacijos prie tam tikrų pH sąlygų [187]. Antioksidantinio poveikio mechanizmas paremtas EP reakcijomis dominuoja, kai tiriamo junginio jonizacijos potencialas yra didesnis nei −45 kcal/mol. Šios reakcijos yra priklausomos nuo pH. Didėjanti terpės pH reikšmė, mažina jonizacijos potencialą bei didina deprotonizaciją. Todėl, tiriamasis junginys lengviau atiduoda savo elektronus. EP reakcijomis pagrįstuose metoduose pH reikšmingai įtakoja tiriamų junginių redukcinę galią. Rūgštinėmis sąlygomis antioksidanto redukcinė galia gali drastiškai sumažėti, kai tuo tarpu bazinėmis sąlygomis – išaugti [70, 97, 135]. EP reakcijos santykinai lėtos, reikalaujančios daug laiko kol pasiekiama pusiausvyros būsena.

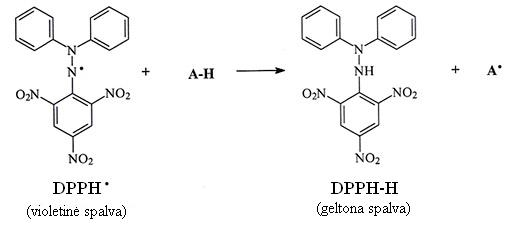
EP reakcijomis pagrįsti metodai susideda iš dviejų komponentų: žinomo (standartinio) oksidanto ir tiriamo antioksidanto. Vyksta nekonkuruojanti reakcija, kurios metu antioksidantas atiduoda elektroną standartiniam oksi­dantui. Redukuojantis standartiniam oksidantui, stebimas absorbcijos spektro pokytis regimosios šviesos srityje [175]. Reakcijos mišinio spalvos pokyčiai yra proporcingi antioksidanto redukcinei galiai. Galimas rezultatų kintamumas dėl fiksuoto laiko skirtumų, taip pat dėl įvairių priemaišų (ypač metalo jonų) įtakos [187]. Ne visi antioksidantiniu poveikiu šiuose meto­duose pasižymintys junginiai gali būti antioksidantai biologinėse sistemose [186].

Dažniausiai naudojami EP reakcijomis pagrįsti antioksidantinio akty­vumo nustatymo metodai yra: DPPH radikalų surišimo metodas, ABTS radikalų-katijonų surišimo metodas, geležies redukcijos antioksidantinė galia (angl. *Ferric reducing antioxidant power* – FRAP) ir vario redukcijos antioksidantinė galia (angl. *Cupric reducing antioxidant capacity* – CUPRAC) [151].

# 1.5. Antioksidantinio aktyvumo įvertinimo metodai pagrįsti elektronų perdavimo reakcija

**DPPH radikalų surišimo metodas**. DPPH yra stabilus, ilgai gyvuojantis organinis azoto radikalas. Tai tamsiai violetinės spalvos kristalai tirpstantys organiniuose tirpikliuose. DPPH radikalų prieš naudojimą nereikia akty­vuoti, pakanka ištirpinti reikiamą jų kiekį. Violetinės spalvos DPPH radika­lai yra redukuojami antiradikaliniu aktyvumu pasižyminčių junginių į blan­kiai geltoną hidraziną (1.5.1 pav.). DPPH radikalų surišimo galia organinėje terpėje vertinama matuojant absorbcijos sumažėjimą prie fiksuoto bangos ilgio (515-528 nm intervale), kai absorbcija tampa stabili [34, 113], arba fiksuojant elektronų sukinio rezonansą [40].

Anksčiau manyta, kad DPPH radikalų surišimo metu vyksta vandenilio atomų perdavimas. Tačiau Foti ir kt. [70] nustatė, kad pirmiausia labai greitai perduodami elektronai, o po to sekantis vandenilio atomo atidavimas vyksta lėtai ir priklauso nuo terpės vandenilinių ryšių stiprumo. DPPH radi­kalų surišimo aktyvumą stipriai įtakoja tirpiklis ir reakcijos pH. Stasko ir kt. [216] ištyrė vandeninės terpės kiekio įtaką DPPH radikalų surišimo efekty­vumui. Organinio tirpiklio ir vandens (0 – 50 proc. v/v) mišiniuose pasiektas vienodas vitamino E antiradikalinis aktyvumas, tačiau, didėjant vandens kiekiui mišinyje, greitėja reakcija tarp DPPH radikalo ir antioksidanto. Reakcijos terpėje esant didesniems vandens kiekiams (70 – 90 proc. v/v), antiradikalinis aktyvumas ima mažėti, kadangi dalis DPPH radikalų koagu­liuoja ir tampa neprieinami antioksidantams [216].



***1.5.1 pav.*** *DPPH radikalo struktūra prieš ir po reakcijos su antioksidantu (A-H).*

DPPH radikalų surišimo rezultatai pateikiami kaip efektyvi koncentracija (EC50) tai yra antioksidanto kiekis reikalingas surišti 50 proc. pradinės DPPH koncentracijos [34]. Nekintamos absorbcijos būsenai su EC50 pasiekti reikalingas laikas nustatomas iš kinetinės kreivės ir žymimas TEC50. Vėliau Sanchez-Moreno ir kt. [201] apjungė šiuos abu parametrus ir pavadino „antiradikaliniu efektyvumu“, kuris apskaičiuojamas pagal formulę AE=(1/ EC50 × TEC50). Kuo mažesnės EC50 ir TEC50 reikšmės, tuo didesnis tiriamo antioksidanto „antiradikalinis efektyvumas“. Labai panašus parametras pasiūlytas De Beer ir kt. [56], kuris pavadintas radikalų surišimo efekty­vumu (RSE). RSE apskaičiuojamas kaip pradinio DPPH radikalų surišimo greičio (gauto per pirmą minutę) ir EC50 santykis. Pagrindinis EC50 trūku­mas yra tai, kad radikalų surišimo procentas priklauso nuo pradinės DPPH radikalų koncentracijos [113]. Nėra linijinės priklausomybės tarp skirtingų DPPH radikalų koncentracijų ir antioksidanto kiekio. Dėl šios priežasties tiksliau būtų naudoti DPPH radikalų tirpalo absorbcijos pokytį arba surištų radikalų kiekį, nei procentinę DPPH radikalų surišimo išraišką. Absorbcijos pokyčio reikšmės naudojamos standartinio antioksidanto (askorbo rūgštis, troloksas) kalibracinei kreivei sudaryti ir tiriamo junginio DPPH radikalų surišimo aktyvumas išreiškiamas kaip standartiniam antioksidantui ekviva­lentiška koncentracija.

Sferinis DPPH radikalo prieinamumas yra svarbus reakcijos veiksnys. Mažos antioksidanto molekulės, turinčios geresnį prieinamumą prie radikalo aktyvių centrų, pasižymi santykinai didesniu antiradikaliniu aktyvumu [97]. Daugelis didelės molekulinės masės antioksidantų, kurie greitai inaktyvuoja ROO• radikalus, gali būti lėti arba visai inertiški šiame metode. DPPH radi­kalai netirpsta vandeninėje terpėje, tai riboja hidrofilinių antioksidantų įver­tinimą. Šis metodas netinka plazmos antiradikalinio aktyvumo nustatymui, nes organinėje terpėje nusodinami proteinai. Taip pat trūkumu įvardijamas DPPH ar į jį panašių radikalų nebuvimas biologinėse sistemose. Gana komplikuotas junginių, tokių kaip karotenoidai, antocianinai, antiradikalinio aktyvumo rezultatų vertinimas, kadangi sutampa šių junginių ir DPPH radi­kalų absorbcijos spektrai [187]. Šiuo atveju, labai tiktų elektrocheminė DPPH radikalų surišimo detekcija pasiūlyta Milardovic ir kt. [152, 153], kuri įgalina analizuoti spalvotus ar drumstus bandinius su mažu antioksi­dantų kiekiu.

Nepaisant aukščiau išvardintų trūkumų, DPPH radikalų surišimo metodas yra techniškai paprastas ir greitas, atliekamas spektrofotometru. Jis tinkamas uogų, daržovių, vaisių ir jų sulčių ar ekstraktų antiradikalinio aktyvumo tyrimams [223].

**ABTS radikalų-katijonų surišimo metodas**. ABTS radikalas-katijonas (ABTS•+) yra stabilus, ilgai gyvuojantis spalvotas radikalas, kuris regimo­sios šviesos spektre turi kelis absorbcijos maksimumus prie 415, 650, 734 ir 815 nm bangos ilgių. Pirmasis šį metodą aprašė Miller ir kt. [158] ir pava­dino TEAC metodu. Originalus TEAC metodas pagrįstas metmioglobino aktyvacija, kuris veikia kaip peroksidazė, sujungdamas H2O2, sudaro feril­mioglobino radikalus. Pastarieji reaguoja su ABTS ir generuojami ABTS•+ (1.5.2 pav.).

Originaliame TEAC metode tiriamas bandinys įdedamas prieš ABTS•+ generaciją. Antiradikaliniu aktyvumu pasižymintys junginiai suriša susida­riusius ABTS radikalus-katijonus. Išmatavus reakcijos mišinio absorbciją, nustatomas nesurištų ABTS•+ kiekis ir įvertinamas tiriamo bandinio antira­dikalinis aktyvumas. Ši reagentų ir bandinio įdėjimo tvarka buvo sukriti­kuota, kadangi kai kurie antioksidantai, kaip kvercetinas, gali sujungti H2O2, reaguoti su oksidantų derivatais. Klaidingai sumažinama ABTS•+ generacija, kas lemia didesnį tiriamo bandinio antiradikalinį aktyvumą nei iš tiesų yra [220]. Re ir kt. [196] pasiūlė patobulintą ABTS radikalų-katijonų surišimo metodą. Šiuo atveju, tiriamasis bandinys įdedamas sugeneravus tam tikrą kiekį ABTS•+. Po fiksuotą laiką trunkančios tiesioginės reakcijos su anti­oksidantu išmatuojama tirpalo absorbcija, kuri proporcinga likusiai ABTS•+ koncentracijai. ABTS radikalų-katijonų surišimo aktyvumas išreiškiamas standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentu (TEAC) [151]. Tai trolokso tirpalo koncentracija (mM) turinti ekvivalentišką antiradikalinį aktyvumą kaip ir 1 mM tiriamo bandinio. Kim ir kt. [121] ABTS•+ surišimo įvertini­mui vietoj trolokso pasiūlė labiau žinomą antioksidantą askorbo rūgštį. Rezultatai pateikiami kaip askorbo rūgšties masė (mg) 100 g ar 100 ml tiriamo bandinio ir žymima VCEAC – vitaminui C ekvivalentiška antioksi­dantinė galia.

radical_ABTS_lt.TIF

***1.5.2 pav.*** *ABTS radikalo-katijono aktyvacija ir reakcija su antioksidantu (troloksu).*

ABTS radikalai-katijonai gali būti generuojami: 1) cheminiais reagentais, tokiais kaip magnio dioksidas [159], 2,2‘-azobis-(2-amidinopropano) hidrochloridas (ABAP) [232], kalio persulfatas [196]; 2) fermentinių reak­cijų metu, naudojant metmioglobiną [158], krienų peroksidazę [42]; 3) elektrochemine reakcija [5]. Cheminėmis reakcijomis paremtai ABTS•+ generacijai reikalingas ilgas laiko tarpas (daugiau nei 16 valandų su kalio persulfatu) arba aukšta temperatūra (60 °C su ABAP reagentu). Fermentinės reakcijos yra žymiai greitesnės ir nereikalauja agresyvių sąlygų [187].

ABTS radikalų-katijonų surišimo spektrofotometrinis metodas yra techniškai paprastas ir gali būti taikomas antioksidantų atrankai bei rutini­niams tyrimams. Šis metodas nustato pradinių junginių ir reakcijos produktų antiradikalinį aktyvumą [151]. Santykinai didelės kai kurių antiradikališkai aktyvių junginių, kaip chryzinas, TEAC reikšmės siejamos su susidariusiais reakcijos produktais, kurie taip pat suriša ABTS•+. ABTS radikalų-katijonų surišimas gali būti nustatomas plačiame pH intervale. Ši savybė leidžia tyri­nėti pH įtaką junginių antiradikaliniam aktyvumui [135]. Ozgen ir kt. [175] nustatė, kad antiradikalinis aktyvumas esant terpės pH 7,4 yra 5-20 proc didesnis nei prie pH 4,5. ABTS radikalų-katijonų surišimo spektrofotome­triniame metode dažniausiai naudojama pH 7,4, tačiau prie šio pH ABTS•+ stabilumas ilgesnį laiką tampa problematiškas [113]. Standartiniai anti­oksidantai (troloksas ir askorbo rūgštis) prie pH 7,4 pusiausvyrinę reakcijos būseną su ABTS radikalais-katijonais pasiekia per 10 min. Fenoliniams jun­giniams pasiekti pusiausvyros tašką reikalingas ilgesnis nei 10 min reakcijos laikas. Esant fiksuotam trumpam (pvz.: 10 min) reakcijos laikui, gali būti gaunamos klaidingos TEAC reikšmės [97]. ABTS•+ yra tirpūs vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, tai leidžia nustatyti hidrofilinių ir lipofilinių jun­ginių antiradikalinį aktyvumą. Šis metodas taip pat turi keletą trūkumų. ABTS radikalai-katijonai nereprezentuoja biomolekulių, jie neaptinkami biologinėse sistemose. Taip pat bet koks junginys, kurio redokso potencialas mažesnis nei ABTS•+ (0,68 V) gali reaguoti su šiuo radikalu-katijonu. ABTS radikalų-katijonų surišimo metodo trūkumai nėra esminiai ir netrukdo plačiam jo pritaikymui vaistinių augalinių žaliavų ekstraktų [222], maisto ir gėrimų [181, 191, 204] bei kraujo [68] pavyzdžiuose esančių lipo­filinių ir hidrofilinių junginių antiradikalinio aktyvumo tyrimams.

**FRAP metodas** įvertina antioksidantų gebėjimą rūgštinėje terpėje redu­kuoti geležies 2,4,6-tripyridyl-s-triazino [Fe(III)-(TPTZ)2]3+ kompleksą į intensyviai mėlynos spalvos [Fe(II)-(TPTZ)2]2+ kompleksą (1.5.3 pav.) [28, 29]. Su elektronų perdavimo reakcijomis susijęs tirpalo absorbcijos padidė­jimas išmatuojamas prie 593 nm bangos ilgio. Gautos reikšmės palyginamos su etaloniniu dvivalentės geležies jonų tirpalu arba standartinių antioksi­dantų (troloksas, askorbo rūgštis) tirpalais ir apskaičiuojamos FRAP arba TEAC, VCEAC reikšmės. FRAP metodas mažai skiriasi nuo ABTS radi­kalo-katijono surišimo metodo, išskyrus tai, kad reakcija tarp antioksidanto ir ABTS•+ dažniausiai atliekama neutralioje (pH 7,4) terpėje, o FRAP meto­dui būtinos rūgštinės (pH 3,6) sąlygos, kad nesusidarytų [Fe(III)-(TPTZ)2]3+ komplekso nuosėdos [97, 113]. Trivalentės geležies (Fe(III)) druskos redokso potencialas (0,70 V) panašus į ABTS•+ redokso potencialą (0,68 V) [97].

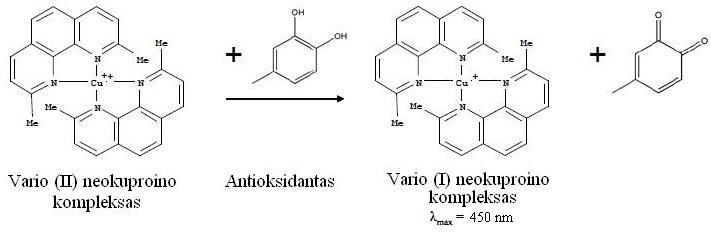
FRAP_lt.TIF

***1.5.3 pav.*** *FRAP metodas pagrįstas [Fe(III)-(TPTZ)2]3+ komplekso redukcija antioksidantu į spalvotą [Fe(II)-(TPTZ)2]2+ kompleksą.*

Dvivalentė geležis (Fe(II)) yra gerai žinomas prooksidantas. Ji gali reaguoti su H2O2 ir produkuoti OH•, žalingiausius laisvuosius radikalus *in vivo*. FRAP metodu tiriamų junginių gebėjimas redukuoti Fe(III) į Fe(II) prilyginamas antioksidantiniam aktyvumui. Žinomi antioksidantai, tokie kaip askorbo rūgštis ar šlapimo rūgštis, gali redukuoti ir ROS/RNS ir Fe(III), todėl jų gebėjimas redukuoti Fe(III) didina reaktyvių deguonies ir azoto rūšių neutralizavimo tikimybę. Tačiau ne visi junginiai galintys atiduoti elektronus trivalentės geležies jonams yra antioksidantai [187]. Šis FRAP metodo vienas iš trūkumų susijęs su redokso potencialu. Junginys (net be antioksidantinių savybių), turintis mažesnį redokso potencialą nei 0,70 V, teoriškai gali redukuoti Fe(III) jonus ir nulemti klaidingai didesnius FRAP rezultatus [169]. Be to, antioksidantai, kurie efektyviai neutralizuoja prooksidantus, gali visai neredukuoti Fe(III). Pavyzdžiui, vienas svarbiausių antioksidantų *in vivo* glutationas FRAP metode neturi antioksidantinių savybių [186]. Taip pat antioksidantai, kurių veikimas paremtas vandenilio atomo perdavimo reakcijomis (tioliai, karotenoidai), FRAP metodu negali būti nustatinėjami [173, 190]. Šiam metodui būtina rūgštinė (pH 3,6) terpė gali įtakoti baltymų (pvz.: kaseino piene) išsėdimą [46]. Pulido ir kt. [190] pastebėjo, kad FRAP metode fenolinių junginių antioksidantinis aktyvumas priklauso nuo reakcijos laiko. Kavos rūgštis, ferulo rūgštis, kvercetinas ir elago rūgštis po 4 min nepasiekė reakcijos pusiausvyros būsenos. Lėtas absorbcijos didėjimas stebimas ir po keletos valandų [190]. Tai apsunkina galimybę taikyti fiksuotą reakcijos laiką.

Nepaisant rūgštinės pH 3,6 terpės (fiziologinėmis sąlygomis pH 7,4) ir kitų auksčiau aprašytų trūkumų, FRAP metodas plačiai taikomas maisto ir augalų ekstraktuose, plazmoje ir kituose biologiniuose skysčiuose esančių junginių redukcinės galios įvertinimui [79, 191, 222]. FRAP metodas yra paprastas, palyginus nebrangus ir nereikalaujantis specifinės aparatūros.

**CUPRAC metodas** pagrįstas dvivalenčio vario ir neokuproino (2,9-di­metil-1,10-fenan-trolino) (Cu(II)-Nc) komplekso redukcija antioksidantu į chromogeninį Cu(I)-Nc kompleksą, kurio absorbcijos maksimumas yra prie 450 nm bangos ilgio (1.5.4 pav.) [13]. Tiriamo junginio antioksidantinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal standartinių antioksidantų (trolokso, šlapimo rūgšties) kalibracines kreives ir išreiškiamas atitinkamais ekviva­lentais [11, 187].



***1.5.4 pav.*** *CUPRAC metodas pagrįstas vario (II) neokuproino komplekso redukcija antioksidantu į spalvotą vario (I) neokuproino kompleksą.*

CUPRAC reagentą sudaro vienodomis dalimis sumaišyti CuCl2, neoku­proino ir buferio amonio acetato (pH 7,0) tirpalai. Labai mažas neokuproino tirpumas vandenyje, todėl jis tirpinamas organiniuose tirpikliuose (dažniau­siai naudojamas 95 proc. etanolis) ir praskiedžiamas kitais tirpikliais. β-ka­rotenas vandens-etanolio terpėje su CUPRAC reagentu nereaguoja, jam reikalingas riboto maišymosi dichloretanas [13]. Lėtos kinetikos antioksi­dantų reakcijai su CUPRAC reagentu pagreitinti, taikoma inkubacija 50 °C temperatūroje [11].

Fenolinių junginių antioksidantinis aktyvumas nustatytas CUPRAC metodu yra panašus į ABTS radikalo-katijono surišimo metodu gautas reikšmes, kai tuo tarpu redukcinis aktyvumas įvertintas FRAP metodu yra šiek tiek mažesnis. CUPRAC metodas yra selektyvesnis, kadangi Cu(II) redokso potencialas (apie 0,60 V) yra mažesnis nei ABTS•+ ar Fe(III). Cuk­rai ir citrinos rūgštis, kurie nėra tikri antioksidantai, neoksiduojami CUPRAC reagentu [11]. Vienodomis sąlygomis vertinant junginių reduk­cinį poveikį prieš prooksidantus, mažesnį redokso potencialą turintys stan­dartiniai oksidantai yra jautresni [187]. CUPRAC metodu nustatomas tiolo grupę turinčių antioksidantų (pvz.: glutationo) redukcinis aktyvumas, ko negalima pasakyti apie FRAP metodą. CUPRAC reagentas yra stabilesnis ir lengviau pagaminamas nei chromogeniniai radikalų reagentai (pvz.: ABTS, DPPH). Jo neveikia tokie faktoriai kaip oras, saulės spinduliai, tirpiklio tipas ir pH. Cu(II) redukcinės galios nustatymas biologiniuose pavyzdžiuose gali netiesiogiai, bet efektyviau, už kitus laisvuosius radikalus naudojančius metodus, įvertinti antioksidantinį aktyvumą [11]. Tyrimai CUPRAC metodu atliekami neutraliomis pH (7,0) sąlygomis [12, 74], kurios artimos fiziolo­ginėms, kai tuo tarpu FRAP metodo pH 3,6. Šiuo metodu galima įvertinti lipofilinių ir hidrofilinių antioksidantų aktyvumą. Reakcijos tirpalo absorb­cijos priklausomybė nuo tiriamo junginio koncentracijos yra linijinė plačiame intervale [11]. Elektronų perdavimo reakcija tarp CUPRAC rea­gento ir tokių žinomų antioksidantų kaip askorbo rūgštis, šlapimo rūgštis, galo rūgštis ir kvercetinas, įvyksta per minutę, tačiau kompleksinių mišinių tyrimams reikia 30-60 min kol pasiekiama pusiausvyra [176]. Tai pagrin­dinis šio metodo trūkumas, kadangi priklausomai nuo reakcijos laiko kinta tiriamo bandinio redukcinis aktyvumas [187].

CUPRAC metodas yra paprastas, nebrangus ir sudėtingos aparatūros nereikalaujantis redukcinės galios nustatymo metodas. Juo galima įvertinti maistinių fenolinių junginių (natūralių ir sintetinių, lipofilinių ir hidrofili­nių), vitaminų C ir E, kraujo serumo redukcinį aktyvumą [11, 12, 13]. CUPRAC metodo privalumai išskiria jį iš kitų elektronų perdavimo reakcija pagrįstų antioksidantinio aktyvumo nustatymo metodų.

# 1.6. ESC pokolonėliniai antioksidantų tyrimo metodai

Elektronų perdavimo reakcija pagrįstuose antioksidantinio aktyvumo nustatymo metoduose dažniausiai naudojama spektrofotometrinė regimosios šviesos absorbcijos pokyčio detekcija. Tai paprastas, patikimas ir tinkamas metodas grynų junginių antioksidantinių savybių įvertinimui bei struktūros-aktyvumo ryšio nustatymui [97, 120, 187]. Sudėtiniuose mišiniuose, tokiuose kaip augalinės žaliavos ekstraktai, maisto ir biologiniai pavyzdžiai, spektrofotometrinis metodas įvertina visų bandinyje esančių junginių suminį antioksidantinį aktyvumą [202, 222, 225]. Kartu apima įvairias sąveikas (priemaišos, aktyvinantys ir slopinantys efektai) tarp skirtingų antioksi­dantų. Šis metodas negali nustatyti atskirų komponentų įnašą į bendrą anti­oksidantų sudėtį. Kiekvieno junginio išskyrimas iš sudėtinio mišinio ir indi­vidualus jo tyrimas yra labai brangus bei neefektyvus procesas dėl didelio antioksidantų skaičiaus, įvairovės ir kompleksiškumo [239].

Spektrofotometrinių antioksidantinio aktyvumo nustatymo metodų dar vienas galimas trūkumas yra operatoriaus klaidos, pavyzdžiui, nevienodas bandinio ir reagento sumaišymas, neadekvatus reakcijos laikas. Šie netiks­lumai ypatingai išryškėja rutininių tyrimų metu, esant dideliam skaičiui pavyzdžių. Trūkumus galima pašalinti visiškai automatizavus procesą ir eliminavus žmogiškąjį faktorių.

Atskirų junginių antioksidantinio aktyvumo įvertinimo metodai leidžia atlikti augalinėse žaliavose esančių natūralių antioksidantų atranką, kurie galėtų būti naudojami kaip prevencinė priemonė prieš įvairias lėtines ligas, taip pat maisto pramonėje apsaugoti maisto produktus nuo oksidacinių pro­cesų ir taip prailginti jų galiojimo laiką [33, 129]. Tokie metodai yra veiks­minga priemonė augalų atrankai tarp skirtingų rūšių, varietetų, fenologinio tarpsnio ir auginimo sąlygų tam, kad būtų užtikrinta gausi antioksidantų sudėtis [116].

Pastaruoju metu vis plačiau taikomi efektyviosios skysčių chromatogra­fijos pokolonėliniai antioksidantinio aktyvumo nustatymo metodai. Juose apjungiamas efektyvus biologiškai aktyvių junginių skirstymas ir pokolonė­linės reakcijos su įvairiais reagentais detekcija. Dažniausiai naudojami spal­voti stabilūs laisvieji DPPH radikalai ir ABTS radikalai-katijonai [123, 124, 128, 189]. Pirmieji ESC pokolonėlinį metodą išvystė Koleva ir kt. laisvuo­sius radikalus surišančių junginių atrankai kompleksiniuose mišiniuose, panaudojant metanolinį DPPH tirpalą [123]. ESC išskirstytos analitės reak­toriuje reaguoja su DPPH radikalais, kurių redukcija yra fiksuojama absorb­ciniu detektoriumi ir užrašomos neigiamos smailės prie 517 nm bangos ilgio. Reakcijos kilpa buvo pagaminta iš 15 m 0,25 mm vidinio diametro PEEK vamzdelio. DPPH tirpalas į reaktorių tiektas pertraukiamo veikimo švirkštiniu siurbliu. Autoriai optimizavo tokius parametrus kaip DPPH tirpalo koncentracija, reakcijos laikas, organinio tirpiklio ir terpės pH įtaką pokolonėlinei reakcijai. Koleva ir kt. nustatė, kad geriausios tiriamo jungi­nio aptikimo ribos pasiekiamos naudojant 10-5 M koncentracijos DPPH metanolinį tirpalą ir reakcijai vykstant 30 sekundžių. Rūgštinė reakcijos terpė ir didelis organinio tirpiklio kiekis mažino metodo jautrumą. Autorių nuomone ESC-DPPH pokolonėlinis metodas yra paprastas, pigus ir univer­salus antiradikalinio aktyvumo nustatymui kompleksiniuose mišiniuose.

Vėliau Dapkevičius ir kt. [54] pagerino (apie 30 kartų) ESC-DPPH pokolonėlinio metodo jautrumą. Mokslininkas degazavo DPPH tirpalą helio dujomis, optimizavo DPPH koncentraciją ir tiekimo greitį į pokolonėlę bei į sistemą papildomai įmontavo reagento tėkmės pulsacijos slopintuvą. Pato­bulintas metodas buvo pritaikytas laisvuosius radikalus surišančių junginių nustatymui čiobrelių lapuose [53].

Kosar ir kt. [127, 129] DPPH tirpalo tiekimui į reaktorių vietoj pertrau­kiamo veikimo švirkštinio siurblio panaudojo nuolatinio veikimo ESC siurblį. Bandonienė ir kt. [20] pritaikė 2,15 m 0,6 mm ID reakcijos kilpą. Pagal autorių straipsnyje [20] pateiktas obuolių DPPH chromatogramas galima teigti, kad didesnio vidinio diametro reakcijos kilpa nežymiai išple­čia neigiamas smailes. Bandonienė ir kt. [19] kiekiškai įvertino *Salvia* gen­ties rūšyse ir *Borago officinalis* augalinėje žaliavoje esančios rozmarino rūgšties antiradikalinį aktyvumą išorinės kalibracijos metodu. Autoriai nustatė stiprią korealiaciją (R2 = 0,98) tarp rozmarino rūgšties kiekio ir augalinės žaliavos antiradikalinio aktyvumo.

ESC-DPPH pokolonėlinio metodo universalumą puikiai iliustruoja Nuengchamnong ir kt. [170], Pukalskas ir kt. [189], Exarchou ir kt. [64] moksliniai darbai. Nuengchamnong ir kt. [170] sujungė ESC-DPPH poko­lonėlinį metodą su masių spektrometrija (MS). Šią sistemą mokslininkai pritaikė vaistinio augalo *Butea superba* ekstrakte esančių antioksidantų greitam identifikavimui. Po gradientinio skirstymo 0,8 ml/min eliuentų tėkmė buvo padalinta į dvi dalis. Viena dalis 0,16 ml/min nukreipta į reakto­rių DPPH radikalų surišimo gebai įvertinti, o kita 0,64 ml/min – į masių detektorių antioksidanto struktūrai nustatyti. DPPH tirpalo tėkmės greitis buvo 0,1 ml/min, reaktoriui panaudota 100 μl 0,33 mm vidinio diametro TFE reakcijos kilpa. Nors autoriai teigia, kad sistema lemia minimalų smailės išsiplėtimą, tačiau pateiktose MS ir DPPH chromatogramose mato­mos šiek tiek prasiplėtusios analičių smailės. Šis trūkumas tikriausiai susijęs su santykinai dideliu reakcijos kilpos vidiniu diametru esant mažam tėkmės greičiui.

Pukalskas ir kt. [189] išvystė sudėtingą ESC-RSD-DMD-KFE-BMR sistemą tiesioginiam antioksidantų identifikavimui kompleksiniuose miši­niuose. Eliuentas su atskirtomis analitėmis po diodų matricos detektoriaus (DMD) dalijamas į dvi skirtingas tėkmes, kurių viena patenka į radikalų surišimo detekcijos (RSD) sistemą, o kita – į kietafazės ekstrakcijos (KFE) ir branduolių magnetinio rezonanso (BMR) detekcijos sistemą. RSD siste­moje eliuentas sumaišomas su santykinai koncentruotu 0,1 mM metanoliniu DPPH ir amonio acetato buferio tirpalu. Metodas buvo pritaikytas komerci­niame rozmarinų ekstrakte esančių laisvuosius radikalus surišančių junginių tyrimams. Autoriai kaip pagrindinę problemą pažymi menką BMR detekto­riaus jautrumą.

Exarchou ir kt. [64] patobulino ESC-RSD-DMD-KFE-BMR sistemą įmontuodami dviejų kelių vožtuvą. Eliuentas su atskirtomis analitėmis po diodų matricos detektoriaus nedalijamas ir vožtuvo nukreipiamas į radikalų surišimo detekcijos sistemą. Pokolonėlėje junginiai reaguoja su DPPH radi­kalais arba su ABTS radikalais-katijonais ir fiksuojami kaip neigiamos smailės absorbciniu detektoriumi atitinkamai prie 512 nm ir 734 nm bangos ilgio. Sekančių trijų injekcijų metu eliuentas su atskirtomis analitėmis vož­tuvo nukreipiamas į KFE-BMR sistemą, kur kietafazės ekstrakcijos modu­lyje koncentruojami antiradikaliniu aktyvumu pasižymintys junginiai ir branduolių magnetinio rezonanso spektroskopu nustatoma jų struktūra. Šis sprendimas pašalina metodo trūkumą, susijusį su salyginai mažu BMR detektoriaus jautrumu. Taip pat patobulintas ESC-RSD-DMD-KFE-BMR metodas leidžia tirti tik tuos junginius, kurie turi antiradikalinių savybių. Apjungus gautus duomenis su ESC-MS tyrimais galima identifikuoti visus antioksidantus (flavonoidus ir fenolines rūgštis) be papildomų atskyrimo ir sukoncentravimo procesų preparatyvinės chromatografijos metodu.

Bartašiūtė ir kt. [21] nuodugniai ištyrė reakcijos mechanizmus tarp DPPH radikalo ir antioksidanto bei patobulino laisvuosius radikalus suri­šančių junginių elgsenos prognozavimą *in vivo* terpėje pagal ESC-DPPH pokolonėliniu metodu gautus rezultatus. Autoriai pagrindė iškeltą hipotezę, kad stabilių DPPH radikalų surišimas metanolio-vandens terpėje esant fiziologiniam pH 7,4 atspindi antioksidantų oksidacijos-redukcijos ciklinių reakcijų charakteristikas *in vivo*.

Pirmą kartą ESC-ABTS pokolonėlinį metodą publikavo Koleva ir kt. [124]. ABTS radikalai-katijonai yra tirpūs vandenyje ir organiniuose tirpi­kliuose, todėl plačiai taikomi hidrofilinių ir lipofilinių antiradikalinių jungi­nių tyrimams. ABTS•+ aktyvuoti kalio persulfatu fosfatinių buferinių druskų tirpale (pH 7,4) turinčio 10 proc. metanolio. Autorių teigimu, ESC-ABTS pokolonėlinis metodas tinkamas izokratinei ir gradientinei eliucijai 100 proc. organiniu tirpikliu ar įvairių proporcijų jo mišiniais su vandeniu. Eliu­entai gali būti silpnai parūgštinti ar buferizuoti (pH 3-7,4). 5,5 μM koncent­racijos ABTS•+ tirpalas į pokolonėlę tiekiamas švirkštiniu siurbliu 0,5 ml/min tėkmės greičiu. Reaktorius pagamintas iš 13,7 m 0,25 mm vidinio diametro PEEK vamzdelio, kuriame reakcijos mišinys išlaikomas 30 s ir užtikrinamas minimalus smailės išsiplėtimas. Metodas pritaikytas *Sideritis syriaca* ir *Rosmarinus officinalis* augalinės žaliavos bei standartinių anti­oksidantų analizei. Autoriai išvadose teigia, kad ESC-ABTS pokolonėlinis metodas yra selektyvus, santykinai paprastas, nebrangus ir kur kas jautresnis nei ESC-DPPH metodas.

Miliauskas ir kt. [155] pritaikė Kolevos ir kt. išvystytą ESC-ABTS pokolonėlinį metodą *Potentilla fruticosa* antiradikalinio aktyvumo tyri­mams. Vėliau ta pati mokslininkų grupė panaudojo sudėtingą ESC-DMD-KFE-BMR sistemą kartu su ESC-ABTS tiesioginiam laisvuosius radikalus surišančių junginių identifikavimui *Rhaponticum carthamoides* ekstrak­tuose.

Atskiros mokslininkų grupės nežymiai modifikuodavo ESC-ABTS pokolonėlinį metodą ir pritaikydavo įvairių augalinių žaliavų antiradikalinio aktyvumo tyrimams [25, 41, 214, 217]. Dažniausiai optimizuodavo ABTS•+ tirpalo koncentraciją, reakcijos terpės pH, reakcijos laiką ir reakcijos kilpos parametrus, siekdami padidinti metodo jautrumą. Stewart ir kt. [217] ištyrė juodosios ir žaliosios arbatos pavyzdžius ESC-ABTS pokolonėliniu metodu. Gautus duomenis susiejo su ESC-MS sistemoje gautais rezultatais. Pagal sulaikymo laikus ir masių spektrus identifikavo naujus antiradikaliniu akty­vumu pasižyminčius junginius – chino rūgšties darinius su kafeoil ir feruloil pakaitais. Li ir kt. [138] tiesiogiai sujungė ESC-ABTS pokolonėlinį metodą su masių spektrometrija. Eliuentas po diodų matricos detektoriaus dalijamas į dvi skirtingas tėkmes, kurių viena patenka į pokolonėlinę ABTS sistemą, o kita – į masių spektrometrą.

Huang ir kt. [97] teigia, kad validuotas *in vitro* antioksidantinio akty­vumo nustatymo metodas sujungtas su bioprieinamumo bei oksidacinio streso biomarkerių įvertinimu yra neįkainojama priemonė klinikiniams tyrimams. Tačiau šiuo metu vis dar neturima validuoto *in vitro* metodo, kuris gali patikimai išmatuoti maisto ir biologinių pavyzdžių suminį anti­oksidantinį aktyvumą.

Modernių kompleksinių ESC pokolonėlinių sistemų antioksidantinio aktyvumo tyrimams vystymas yra perspektyvus ir efektyvus įrankis greitai antioksidantų paieškai, kurie būtų naudojami kaip žymenys vaistinių augalinių žaliavų ir jų preparatų kokybės kontrolei. Šios sistemos įgalina nustatyti kompleksines „pirštų antspaudų“ chromatogramas, nurodančias ne tik vaistinės augalinės žaliavos ar jos preparato fitocheminį profilį, bet ir junginių turinčių antioksidantinį aktyvumą „pirštų antspaudus“.

2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

# 2.1. Tyrimų objektai

**Augalinės žaliavos.** Vienapiesčių gudobelių (Crataegus monogyna Jacq.) lapai ir žiedai, surinkti 2006 metais nuo natūraliai augančių ekotipų. Paprastųjų raudonėlių (*Origanum vulgare* L.) žolė, lapai ir stiebai rinkti 2007 metais gamtinėse cenopopuliacijose. Spontaninių (*Achillea millefolium* L., *A. cartilaginea* ir *A. ptarmica*) ir introdukuotų (*A. odorata*, *A. sibirica* ir *A. ﬁlipendulina*) kraujažolių rūšių pavyzdžiai paruošti 2006–2007 m. *A. millefolium* žolė, žiedai, lapai ir stiebai bei *A. cartilaginea* žolė surinkti masinio žydėjimo metu iš gamtinių cenopopuliacijų, *A. ptarmica*, *A. odo­rata*, *A. sibirica* ir *A. ﬁlipendulina* žolės pavyzdžiai gauti iš Botanikos insti­tuto lauko kolekcijos. Perilės (*Perilla* L.) genties augalų – *P. frutescens*, *P. frutescens* var. *crispa* f. *viridis*, *P. ocymoides* var. *bicolorlaciniata*, *P. frutescens* var. *nankinensis* *laciniata* – antžeminės dalies pavyzdžiai surinkti 2008 m. iš bandymų ploto Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sode. Žemuogių (*Fragaria viridis, F. vesca* ir *F. moschata*) rūšių lapų ir vai­sių bandiniai surinkti 2006 m. liepos mėn. Botanikos instituto lauko kolek­cijose.

Augalinės žaliavos džiovintos kambario temperatūroje (20–25 °C), gerai vėdinamoje ir apsaugotoje nuo tiesioginių saulės spindulių patalpoje. Ora­sausės žaliavos nuodžiūvis įvertintas pagal Europos farmakopėjos reikala­vimus ir tyrimų duomenys perskaičiuoti absoliučiai sausai augalinei žalia­vai. Sunokę žemuogių vaisiai iš karto užšaldyti ir laikyti šaldiklyje prie –30 °C temperatūros.

*P. frutescens* var. *crispa* f. *viridis* sausasis ekstraktas (10:1) pagamintas vaistinę augalinę žaliavą ekstrahuojant 40 proc. v/v etanoliu maceracijos metodu. Ekstraktas užšaldytas ant sublimacijos indų paviršiaus 1 cm storiu liofilizatoriaus Freeze Dryer FD8512S (ilShin Europe, Ede, Netherlands) rotaciniame užšaldymo modulyje ir išdžiovintas šiame liofilizatoriuje prie 5 militorių slėgio (kondensatoriaus temperatūra –85 °C).

**Fitopreparatai.** „Gudobelių tinktūra Valentis“ 1:10 ir „Gudobelių skys­tasis ekstraktas Valentis“ 1:1 geriamieji lašai (25ml tirpalas). Koncentruotas *P. frutescens* lapų sausasis ekstraktas (5:1) „Zi Su Ye“ ir kapsuliuotas auga­linis preparatas „Allermin“. Vienoje „Allermin“ kapsulėje yra 150 mg stan­dartizuoto *P. frutescens* lapų ekstrakto. Visi šie fitopreparatai įsigyti komer­ciškai.

# 2.2. Tyrimų metodai

**Naudoti reagentai.** Tyrimų metu naudoti gradientinio švarumo eliuentai: acetonitrilas ir metanolis įsigyti iš Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland). Ultragrynas vanduo (18,2 mΩcm-1) ruošiamas Millipore vandens valymo sistema (Bedford, USA). Skruzdžių rūgštis (98–100 proc.), trifluoracto rūgštis (TFA) (99,9 proc.), acto rūgštis (99,8 proc.) ir druskos rūgštis gauti iš Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). Etanolis (96,3 proc.) įsigytas iš Stumbras (Kaunas, Lithuania). Naudoti chemiškai švarūs reagentai: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfo-no rūgšties) diamonio druska (ABTS), kalio persulfatas, kalio permangana­tas gauti iš Fluka (Buchs, Switzerland); geležies (III) chlorido heksahidratas (FeCl3×6H2O), 2,4,6-tripyridyl-s-triazinas (TPTZ), natrio citratas ir natrio acetato trihidratas įsigyti iš Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany). ESC grynumo standartiniai junginiai: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilo rūgštis (troloksas), chlorogeno rūgštis, (–)-epikatechinas, kavos rūgštis, (+)-katechinas, rutinas, elago rūgštis, kvercetinas, izokvercitrinas, kvercitrinas, hiperozidas, epigalo-katechino galatas įsigyti iš Fluka (Buchs, Switzerland), Roth (Karlsruhe, Germany), Sigma-Aldrich (Buchs, Swit­zerland).

**Tiriamųjų pavyzdžių paruošimas.** C. monogyna lapų ir žiedų etanoli­niam ekstraktui pagaminti atsveriama 1 g susmulkintos orasausės (tiksli masė) augalinės žaliavos. Dedama į 50 ml talpos kolbutę, užpilama 40 ml 70 proc. v/v etanolio, kratoma purtyklėje 1 h, po to laikoma 24 h saugant nuo tiesioginių saulės spindulių, vėl 1 h kratoma purtyklėje ir filtruojama pro popieriaus filtrą į 50 ml talpos matavimo kolbutę. Nuosėdos plaunamos 10 ml 70 proc. v/v etanoliu ir pripilama etanolio iki žymės.

*O. vulgare* žolės, lapų ir stiebų etanolinių ekstraktų gamyba: 0,5 g (tiksli masė) susmulkintos žaliavos suberiama į 25 ml talpos kolbutę ir užpilama 20 ml 96,3 proc. v/v etanolio; paliekama ekstrahuotis 24 h; gautas ekstraktas filtruojamas pro popieriaus filtrą į 25 ml talpos matavimo kolbutę ir pra­skiedžiamas 96,3 proc. v/v etanoliu iki žymės.

*Achillea* L. genties augalų žolės, žiedų, lapų ir stiebų ekstrakcijai ultra­garsu naudota ultragarso vonelė BioSonic UC100 (Mavajai, JAV). Apie 0,25 g (tiksli masė) susmulkintos augalinės žaliavos užpilama 25 ml 70 proc. v/v etanolio. Kolbutė dedama į vandens vonelę ir atliekama ekstrakcija ultragarsu 30 min. Ekstraktas centrifuguojamas 12000 min-1 greičiu 10 min. Supernatantas nupilamas į 25 ml matavimo kolbutę ir pilama 70 proc. v/v etanolio iki žymės.

*Perilla* L. genties augalų antžeminės dalies etanoliniam ekstraktui paga­minti sveriama apie 0,5 g (tiksli masė) susmulkintos augalinės žaliavos ir ekstrahuojama 50 ml 60 proc. v/v etanoliu 30 min. purtyklėje. Gautas eks­traktas filtruojamas pro popierinį filtrą į 50 ml matavimo kolbutę ir praskie­džiamas 60 proc. v/v etanoliu iki žymės.

*F. viridis, F. vesca* ir *F. moschata* lapų ir vaisių ekstrakcija atliekama ultragarsu. Atsveriama apie 0,25 g (tiksli masė) susmulkintų žemuogių lapų, užpilama 25 ml 70 proc. v/v etanolio ir 30 min. laikoma ultragarso vonelėje. Žemuogių vaisiai homogenizuojami, atsveriama 2,5 g (tiksli masė) homo­genizuotos masės, užpilama 25 ml 100 proc. metanolio ir 10 min. ekstra­huojama ultragarso vonelėje. Gauti lapų ir vaisių ekstraktai centrifuguojami 13000 min-1 greičiu 15 min. Supernatantai nupilami į 25 ml matavimo kolbutes ir atitinkamai praskiedžiami 70 proc. v/v etanoliu ir 100 proc. metanoliu iki žymės.

*P. frutescens* var. *crispa* f. *viridis* sausojo ekstrakto (10:1) ir koncen­truoto *P. frutescens* lapų sausojo ekstrakto (5:1) „Zi Su Ye“ tyrimams atlikti atsveriama apie 0,1 g (tiksli masė) sauso ekstrakto ir ištirpinama 25 ml van­dens. Augalinio preparato „Allermin“ kapsulės išardomos ir atsveriama apie 3 g (tiksli masė) jų turinio, kuris ištirpinamas 25 ml vandens. Fitopreparatų „Gudobelių tinktūra Valentis“ (1:10) ir „Gudobelių skystasis ekstraktas Valentis“ (1:1) tyrimams naudojamos neskiestos gamintojo išleidžiamos formos.

Standartiniai junginiai tirpinami 96,3 proc. etanolyje, išskyrus elago rūgštį, kurios etaloninis tirpalas paruoštas acetonitrilo ir ultragryno vandens (1:1, v/v) mišinyje.

ESC pokolonėlinei analizei atlikti tiriamieji pavyzdžiai filtruojami pro 0,22 μm porų dydžio membraninį filtrą (Roth, Karlsruje, Vokietija).

**DPPH tirpalo paruošimas**. Kiekvieną dieną ruošiamas šviežias DPPH tirpalas ir laikomas tamsaus stiklo butelyje apsaugančiame nuo saulės spin­dulių. DPPH kristalai tirpinami acetonitrile. Paruošiamas 0,05 M citrinos rūgšties-natrio citrato buferis (pH 7,6). Darbinis DPPH tirpalas gaunamas sumaišius acetonitrilo ir buferio tirpalus santykiu 1:1. Atliekamas darbinio DPPH tirpalo standartizavimas pagal optinį tankį spektrofotometru Back­man DU-70 (Fullerton, JAV) iki 0,500±0,005 AV prie 520 nm bangos ilgio. Galutinė stabilių DPPH radikalų koncentracija darbiniame tirpale yra 100 μM.

**ABTS tirpalo paruošimas**. ABTS milteliai ištirpinami išgrynintame vandenyje (2 mM) ir pridedama kalio persulfato (0,7 mM). Mišinys laiko­mas 16-17 h. tamsoje kambario temperatūroje kol pasiekiama reakcijos pusiausvyra. Gautas pradinis ABTS radikalo-katijono tirpalas skiedžiamas išgrynintu vandeniu iki darbinės 110 μM ABTS•+ koncentracijos. Atliekant ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėlinių metodų palyginamuosius tyrimus, pradinis ABTS radikalo-katijono tirpalas iki darbinės 110 μM koncentra-cijos skiedžiamas acetatiniu buferiu (300 mM, pH 3,6).

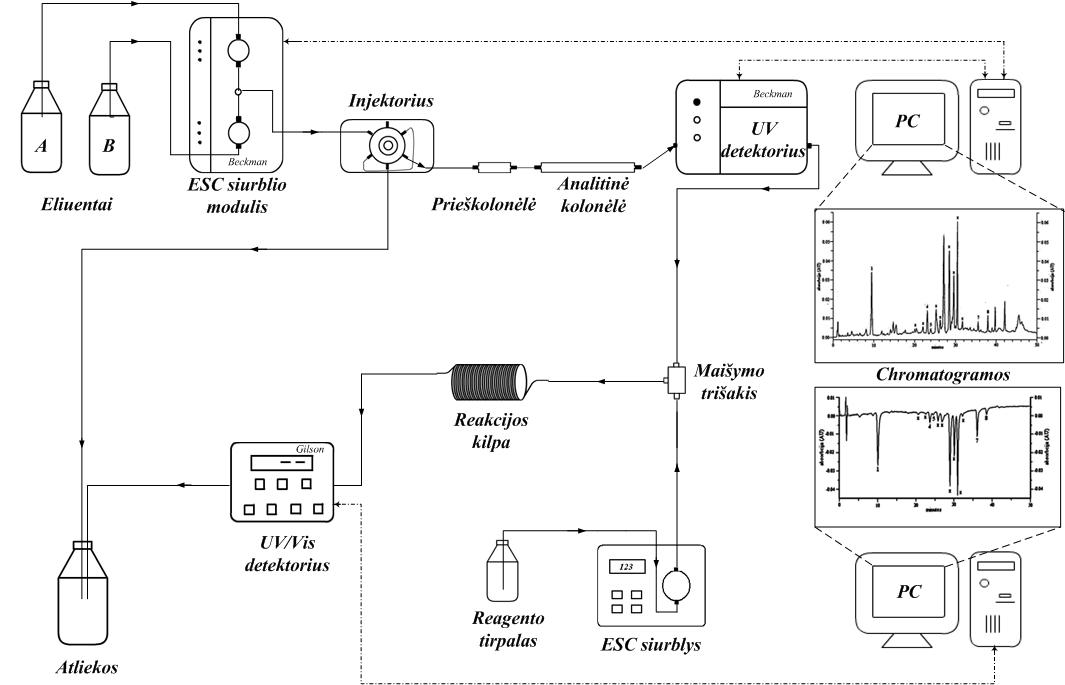
**FRAP tirpalo paruošimas**. TPTZ (*2,4,6-tripyridyl-s-triazine*) milteliai (10 mM) ištirpinami 40 mM HCl tirpale. Geležies (III) chlorido heksahi­drato (FeCl3×6H2O) 20 mM tirpalas ruošiamas išgrynintame vandenyje. Darbinis FRAP tirpalas gaunamas sumaišius TPTZ, FeCl3×6H2O ir acetati­nio buferio (300 mM, pH 3,6) tirpalus santykiu 1:1:25.

**Naudota aparatūra.** Efektyviosios skysčių chromatografijos pokolonė­linio metodo principinė schema pavaizduota 2.2.1 pav. Naudotos dvi kompleksinės aparatūros sistemos:

*1 sistema*. Eliucijos gradientas formuojamas chromatografu Beckman Programmable solvent module 126 (Fulertonas, JAV). Bandiniai injekuo­jami rankiniu injektoriumi Rheodyne 7125 (Rheodyne, RohnertPark, CA), kuris turi 20 µl injekcijos kilpą. Analitinėje kolonėlėje išskirstyti junginiai nustatomi ultravioletinės šviesos absorbciniu detektoriumi Beckman System Gold 166 Programmable detector module (Fulertonas, JAV). Judri fazė su išskirstytais junginiais iš detektoriaus per maišymo trišakį patenka į reakci­jos kilpą, į kurią tuo pačiu metu tiekiamas reagento tirpalas antioksidantinio aktyvumo nustatymui. Reagento tirpalo tiekimui naudojamas nuolatinio veikimo ESC siurblys Gilson pump 305 (Midletonas, JAV). Reakcijos kilpa sujungta su ultravioletinės-matomos šviesos tipo detektoriumi Gilson UV/VIS detector 118 (Midletonas, JAV), kuriuo matuojama pratekančio tirpalo absorbcija. Gauti duomenys apdorojami ir aparatūra valdoma dviem kompiuteriais su programinėmis įrangomis – System Gold (Beckman) ir Unipoint (Gilson).

*2 sistema*. Chromatografinė analizė atliekama Waters 2695 Alliance moduliu su ultravioletinės-matomos šviesos absorbciniu detektoriumi Waters 2487 (Milfordas, JAV). Bandiniai šioje sistemoje injektuojami automatiniu injektoriumi. Iš detektoriaus eliuentas su išskirstytais junginiais per maišymo trišakį patenka į reakcijos kilpą. Reagento tirpalas į pokolonė­linį reaktorių tiekiamas nuolatinio veikimo ESC siurbliu Waters Reagent Manager (Milfordas, JAV). Pratekančio reakcijos mišinio absorbcijos poky­tis fiksuojamas ultravioletinės-matomos šviesos absorbciniu detektoriumi Gilson UV/VIS detector 118 (Midletonas, JAV). Gauti duomenys apdoro­jami ir aparatūros sistema valdoma kompiuteriu su Waters Empower (Mil­fordas, JAV) programine įranga.

Pokolonėliniam reaktoriui naudotos reakcijos kilpos pagamintos iš 8 m (0,25 mm VS ir 1,58 mm IS) PEEK, 15 m (0,25 mm VS ir 1,58 mm IS) PEEK, 30 m (0,25 mm VS ir 1,58 mm IS) PEEK, 15 m (0,3 mm VS ir 1,58 mm IS) TFE, 3 m (0,3 mm VS ir 1,58 mm IS) TFE ir 5 m (0,5 mm VS ir 1,58 mm IS) TFE vamzdelių.



Šiukšlės

Reagento tirpalas

ESC siurblys

Duomenų registravimo sistema

Detektorius

Detektorius

Reakcijos kilpa

Maišymo trišakis

Analitinė kolonėlė

Prieškolonė

Injektorius

ESC binarinis siurblys

Eliuentai

***2.2.1 pav.*** *ESC pokolonėlinio metodo aparatūros sistema augalinių antioksidantų tyrimams.*

Tirpalų pH matavimai atlikti Hana Instruments HI 2200 (Michigan, JAV) pH matuokliu.

**ESC-DPPH, ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėliniai metodai.** C. monogyna, *O. vulgare* augalinės žaliavos ir fitopreparatų „Gudobelių tink­tūra Valentis“ (1:10), „Gudobelių skystasis ekstraktas Valentis“ (1:1) tyri­mai atlikti ESC-DPPH pokolonėliniu metodu *1 sistemoje*. Analičių skirsty­mas atliktas atvirkščių fazių analitine kolonėle X-Terra RP18 150×3,0 mm, 3,5 μm sorbento dalelių dydžio su prieškolone X-Terra RP18 3,5 µm (Waters, Milfordas, JAV). Eliuentų sistema: A – 0,1 proc. v/v TFA tirpalas vandenyje, B – 0,1 proc. v/v TFA tirpalas acetonitrile. Eliucija: 45 min 5–45 proc. eliuento B; 50 min 45 proc. eliuento B; 55 min 45–5 proc. eliuento B. Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min, injekcijos tūris – 20 μl. Chroma­tografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės bei standartinių junginių eliucijos trukmės sutapimą ir priedo metodu į analizuojamą bandinį pridedant standartinio junginio ir stebint smailių plotų pokyčius chromato­gramoje. Naudota 8 m 0,25 mm vidinio ir 1,58 mm išorinio skersmens reak­cijos kilpa, kurios tūris ~0,4 ml. DPPH darbinio tirpalo tiekimo greitis į reaktorių – 0,4 ml/min. Pokolonėlinė detekcija atlikta prie 520 nm bangos ilgio.

*Achillea* L. genties augalų žolės, žiedų, lapų ir stiebų tyrimai atlikti ESC-DPPH pokolonėliniu metodu *1 sistemoje*. Chromatografinis skirstymas atliktas su Ascentis RP-Amide 150×4,6 mm analitine kolonėle, 5 μm sorbento dalelių dydžio, apsaugota su 5 μm Supelguard Ascentis RP-Amide prieškolone (Supelco, Belefontas, JAV). Judriai fazei naudojama dviejų eliuentų sistema: A – 0,1 proc. v/v TFA tirpalas vandenyje, B – 0,1 proc. v/v TFA tirpalas acetonitrile. Eliucijos linijinis gradientas: 25,5 min 10–24 proc. eliuento B; 27 min 24–28 proc. eliuento B; 45 min 28–55 proc. eliuento B; 48 min 55 proc. eliuento B; 52 min 55–10 proc. eliuento B. Naudotas eliua­vimo greitis – 1,5 ml/min, injekcijos tūris – 20 μl. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės bei standartinių junginių eliucijos trukmės sutapimą ir priedo metodu į analizuojamą bandinį pridedant stan­dartinio junginio ir stebint smailių plotų pokyčius chromatogramoje. Reak­cijos kilpa pagaminta iš TFE 15 m 0,3 mm vidinio ir 1,58 mm išorinio skersmens vamzdelio, kurio tūris ~1 ml. DPPH darbinio tirpalo tiekimo greitis į reaktorių – 1,5 ml/min. Pokolonėlinė detekcija atlikta prie 520 nm bangos ilgio.

*Perilla* L. genties augalų antžeminės dalies tyrimai atlikti ESC-DPPH ir ESC-ABTS pokolonėliniais metodais, *P. frutescens* var. *crispa* f. *viridis* sausojo ekstrakto (10:1) bei fitopreparatų „Zi Su Ye“ ir „Allermin“ tyrimai atlikti ESC-ABTS pokolonėliniu metodu *1 sistemoje*. Visų bandinių chro­matografinis skirstymas atliktas ACE C18 150×4,6 mm analitine kolonėle, 5 μm sorbento dalelių dydžio, apsaugota su 5 μm ACE C18 prieškolone (Aberdenas, Škotija). Judri fazė sudaryta iš dviejų eliuentų: A – 0,5 proc. v/v acto rūgštis, B – metanolis. Eliucijos linijinis gradientas: 40 min 10–80 proc. eliuento B; 50 min 80–90 proc. eliuento B; 52 min 90–100 proc. eliu­ento B; 53 min 100–10 proc. eliuento B. Naudotas eliuavimo greitis – 1 ml/min, injekcijos tūris – 20 μl. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės bei standartinių junginių eliucijos trukmės sutapimą ir priedo metodu į analizuojamą bandinį pridedant standartinio junginio ir stebint smailių plotų pokyčius chromatogramoje. Reakcijos kilpa 15 m 0,3 mm vidinio ir 1,58 mm išorinio skersmens TFE vamzdelis, kurio tūris ~1 ml. DPPH darbinis tirpalas į reaktorių tiekiamas 1 ml/min, o ABTS darbinis tirpalas – 0,5 ml/min greičiu. DPPH ir ABTS pokolonėlinė detekcija atlikta atitinkamai prie 520 nm ir 650 nm bangos ilgio.

*F. viridis, F. vesca* ir *F. moschata* lapų bei vaisių ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėlinė analizė atlikta *2 sistemoje*. Chromatografiniam skirsty­mui naudojama atvirkščių fazių analitinė kolonėlė ACE C18 250×4,6 mm, 5 μm sorbento dalelių dydžio su prieškolone ACE C18 5 µm (Aberdenas, Ško­tija). Judri fazė sudaryta iš dviejų eliuentų: A – 1 proc. v/v skruzdžių rūgštis, B – acetonitrilas. Eliucijos linijinis gradientas sekantis: 30 min 10–22 proc. eliuento B; 45 min 22-80 proc eliuento B. Judrios fazės tėkmės greitis – 1 ml/min, injekcijos tūris – 10 μl. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės bei standartinių junginių eliucijos trukmės ir UV absorbcijos spektrų (λ = 200-600 nm) sutapimą, taip pat priedo metodu į analizuojamą bandinį pridedant standartinio junginio ir stebint smailių plotų pokyčius chromatogramoje. Reakcijos kilpa 15 m 0,3 mm vidinio ir 1,58 mm išorinio skersmens TFE vamzdelis, kurio tūris ~1 ml. ABTS ir FRAP darbinių tirpalų tiekimo greitis į reaktorių – 0,5 ml/min. ABTS ir FRAP pokolonėlinė detekcija atlikta atitinkamai prie 650 nm ir 593 nm bangos ilgio.

**Antioksidantinio aktyvumo įvertinimas.** Augalinių žaliavų ekstraktuo-se ir fitopreparatuose esančių biologiškai aktyvių junginių antioksidantinis aktyvumas vertinamas pagal etaloninį antioksidantą – troloksą. Kiekvienu ESC pokolonėliniu metodu tiriama priklausomybė tarp trolokso koncentra­cijos (µM) ir jo suformuoto smailės ploto pokolonėlinėje chromatogramoje, nustatomas tiesiškumo intervalas ir sudaroma trolokso kalibracinė kreivė (*S=a×c+b*). Tiriamajame bandinyje esančių junginių antioksidantinio akty­vumo kiekiniam įvertinimui apskaičiuojama troloksui ekvivalentiškos antioksidantinės galios (TEAC) reikšmė. TEAC atitinka trolokso kiekį (μmol), kuris tokiose pat tyrimo sąlygose turi identišką antioksidantinį akty­vumą kaip ir tiriamas junginys viename grame augalinės žaliavos ar fiksuo­tame fitopreparato kiekyje. TEAC reikšmė apskaičiuojama pagal formulę:

*TEAC = , (μmol/g)* (1)

*Sjung.* – antioksidantiniu aktyvumu pasižyminčio junginio smailės plotas pokolonėlinėje chromatogramoje; *a* – nuolydis ir *b* – nuokrypis iš trolokso kalibracinės kreivės regresijos lygties; *Vtirp.* – tiriamo bandinio tirpalo tūris; *mband.* – tiriamo bandinio atsvertas kiekis (tiksli masė).

TEAC reikšme galima įvertinti atskiro junginio indėlį į bendrą augalinės žaliavos ar fitopreparato antioksidantinį aktyvumą, nustatyti dominuojantį antioksidantą. TEAC reikšmės apibūdina augalinės žaliavos arba fitoprepa­rato antioksidantines charakteristikas, tačiau neįvertina kiek tiriamasis jun­ginys yra aktyvesnis ar mažiau aktyvus už troloksą ar kitą etaloninį anti­oksidantą. Koleva ir kt. [124] pasiūlė santykinę TEACS reikšmę. Kiekiškai įvertintiems junginiams bei standartams apskaičiuojamos TEACS reikšmės, kurios nurodo kiek kartų tiriamas junginys ar standartas yra aktyvesnis už troloksą. TEACS reikšmė apskaičiuojama pagal formulę:

*TEACS = ajung./atrolokso* (2)

*ajung.* – tiriamo junginio kalibracinės kreivės regresijos lygties nuolydis; *atrolokso* – tro­lokso kalibracinės kreivės regresijos lygties nuolydis.

**ESC pokolonėlinių metodų validacija** atlikta pagal šiuos pasirinktus validacijos parametrus: specifiškumas, glaudumas (precizija), aptikimo riba (LoD), nustatymo riba (LoQ) ir tiesiškumas.

Specifiškumas įvertintas identifikavimo testu, kuris atskiria antioksidan­tiniu aktyvumu pasižyminčius junginius. Reakcijos su antioksidantu metu kinta reagento tirpalo absorbcija regimosios šviesos spektre.

ESC pokolonėlinio metodo glaudumo įvertinimui apskaičiuotas standar­tinių junginių tyrimo metu gaunamų rezultatų pakartojamumas ir atkuria­mumas. Pakartojamumo (*intra-day*) tyrimui atliktos šešios pavyzdžio injek­cijos tą pačią dieną, atkuriamumo (*inter-day*) – po šešias pavyzdžio injekci­jas tris skirtingas dienas. Glaudumas įvertintas pagal santykinį standartinį nuokrypį (SSN), kuris apskaičiuojamas kaip standartinio nuokrypio ir vidu­tinio smailės ploto santykio procentinė išraiška.

Aptikimo ir nustatymo ribos įvertintos dviem būdais [117]: 1) lyginant smailės aukštį su bazinės linijos triukšmu. Smailės aukščio ir bazinės linijos triukšmo santykis skaičiuojant aptikimo ribą yra 3:1, o nustatymo ribą – 10:1; 2) pagal formules *LoD = 3,3σ/a* ir *LoQ = 10σ/a* apskaičiuojamos atitinkamai aptikimo ir nustatymo ribos. Čia *σ* – tiriamo junginio kalibraci­nės kreivės regresijos lygties nuokrypio (*y-intercept*) standartinis nuokrypis; *a* – tiriamo junginio kalibracinės kreivės regresijos lygties nuolydis.

Tiesiškumo tyrimai atlikti vertinant tiriamo junginio smailės ploto poky­čio po reakcijos su reagentu priklausomybę nuo koncentracijos. Kiekvienos koncentracijos matavimai kartoti po tris kartus ir vidurkis naudojamas kalib­racinės kreivės ir regresijos lygties sudarymui. Nustatyti jų determinacijos koeficientai (R2).

**Tyrimų duomenų statistinis įvertinimas.** Eksperimentiniai duomenys apdoroti naudojant statistinius duomenų analizės paketus SPSS 17.0 (SPSS Inc., JAV) ir Microsoft Office Excel (Microsoft, JAV). Visi eksperimentai kartoti tris kartus ir duomenys išreikšti vidurkiais ± standartinė paklaida. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirstinių buvo nustatyti naudojant Mano-Vitnio U testą. Nagrinėti tiesinės regresijos modeliai. Kiekvieno regresijos modelio tinkamumui apskaičiuotas determinacijos koeficientas R2 ir gauta p reikšmė tikrinant hipotezę apie regresijos netiesiškumą [52]. Pasi­rinktas reikšmingumo lygmuo α=0,05.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

# 3.1. Reakcijos kilpos parinkimas antioksidantinio aktyvumo tyrimams ESC pokolonėlinėje sistemoje

Efektyviosios skysčių chromatografijos pokolonėlinės reakcijos metodo rezultatų patikimumas betarpiškai susijęs su efektyviu kompleksinių jungi­nių skirstymu ir chemine reakcija tarp analitės ir pokolonėlinio reagento. ESC pokolonėlinis metodas privalo užtikrinti optimalias ir stabilias kom­pleksiniuose mišiniuose esančių antioksidantiniu aktyvumu pasižyminčių junginių analizės sąlygas. Chromatografinio skirstymo metodikos turi būti tinkamos efektyviam biologiškai aktyvių junginių atskyrimui vienos anali­zės metu. Pagrindiniai validacijos parametrų įverčiai turi patvirtinti jos pati­kimumą ir tikslumą tiriamų junginių tapatybės nustatymui ir kiekiniam įvertinimui augalinėse žaliavose bei jų preparatuose. Šiame darbe eksperi­mentiniams tyrimams naudojamos validuotos ESC sistemos ir chromatogra­finio skirstymo metodikos, kurios užtikrina optimalias ir stabilias chroma­tografinės analizės sąlygas.

Mūsų apibendrintų mokslinių tyrimų tikslas buvo optimalių sąlygų nustatymas cheminei reakcijai vykti eliucijos metu pokolonėlinėje sistemoje tarp chromatografiškai atskirtos analitės ir reagento, skirto antioksidantinio aktyvumo tyrimams. Analitės ir reagento reakcija privalo būti selektyvi, jautri ir maksimalios išeigos. Natūralių augalinių antioksidantų atrankai ir jų tyrimams panaudoti reagentai DPPH, ABTS ir FRAP priklauso elektronų pernašos (redokso) reakcijomis pagrįstiems antioksidantinio poveikio mechanizmams [151]. Redokso reakcijų efektyvumą labiausiai įtakoja reagentų koncentracija, reakcijos terpė ir reakcijos laikas [131].

Reagento koncentracijos ir reakcijos terpės optimizavimas atliktas indi­vidualiai kiekvienam reagentui ir aprašymai pateikti ESC pokolonėlinių metodų optimizavimo ir validacijos skyriuose.

Augalinių antioksidantų reakcijos kinetika su minėtais reagentais yra labai skirtinga. Dalis antioksidantų pasižymi sparčia reakcija su reagentu, kita dalis – lėta. Reakcijos pusiausvyrai pasiekti reikalingas skirtingas laikas – nuo kelių minučių iki kelių valandų [239]. Atlikus ESC pokolonėlinės sistemos tyrimus, nustatyta, kad reakcijos laiką reaktoriuje įtakoja trys pagrindiniai faktoriai: 1) chromatografinio skirstymo metodikos eliuentų tėkmės greitis; 2) pokolonėlinio reagento tėkmės greitis; 3) reaktoriaus reakcijos kilpos tūris.

Augalinių žaliavų ir jų fitopreparatų biologiškai aktyvių junginių tyri­mams taikomos įvairios optimizuotos ESC metodikos [20, 123, 124, 127, 131, 189]. Naudojami optimalūs eliucijos tėkmės greičiai, kurie parenkami atsižvelgiant į chromatografinės sistemos parametrus (analitinė kolonėlė, eliuentai ir kt.), siekiant gauti maksimalius analičių atskyrimo rezultatus (skiriamąją gebą).

Bazinės linijos stabilumas pokolonėlinėje sistemoje priklauso nuo rea­gento tiekimo į reaktorių greičio ir reagento darbinio tirpalo koncentracijos. Optimalaus tėkmės greičio parinkimo tyrimai atlikti kiekvienam ESC pokolonėliniam metodui.

Suminis pokolonėlinės reakcijos mišinio tėkmės greitis yra fiksuotas, tačiau išlaikomas vienodas santykis tarp eliucijos ir reagento tėkmės greičių. Reakcijos laikas tarp atskirtos analitės ir pokolonėlinio reagento gali būti moduliuojamas keičiant reakcijos kilpos parametrus (3.1.1 lentelė.). Reak­cijos kilpos tūris tiesiogiai priklauso nuo naudojamo vamzdelio ilgio ir vidi­nio skersmens. Reaktoriaus optimizavimas atliktas ESC-DPPH ir ESC-ABTS pokolonėliniais metodais įvertinant reakcijos kilpos parametrų įtaką standartinio antioksidanto smailės aukščio ir bazinės linijos triukšmo (S/N) santykiui. Šiam tyrimui panaudotos šešios skirtingų parametrų reakcijos kil­pos: 3 m (0,3 mm VS ir 1,58 mm IS) TFE vamzdelis, kurio tūris yra ~0,2 ml, 8 m (0,25 mm VS ir 1,58 mm IS) PEEK – ~0,4 ml, 15 m (0,25 mm VS ir 1,58 mm IS) PEEK – ~0,74 ml, 15 m (0,3 mm VS ir 1,58 mm IS) TFE – ~1,1 ml, 30 m (0,25 mm VS ir 1,58 mm IS) PEEK – ~1,47 ml ir 5 m (0,5 mm VS ir 1,58 mm IS) TFE vamzdelis, kurio tūris – ~1 ml.

***3.1.1 lentelė.*** *Apskaičiuotas reakcijos mišinio užlaikymo laikas skirtingų parametrų reakcijos kilpose prie tam tikro suminio tėkmės greičio.*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Reakcijos kilpa** | **Užlaikymo laikas, s** | | |
| **0,8 ml/min** | **2 ml/min** | **3 ml/min** |
| 3 m (0,3 mm VS × 1,58 mm IS) TFE | 15 | 6 | 4 |
| 8 m (0,25 mm VS × 1,58 mm IS) PEEK | 30 | 12 | 8 |
| 15 m (0,25 mm VS × 1,58 mm IS) PEEK | 56 | 22 | 15 |
| 5 m (0,5 mm VS × 1,58 mm IS) TFE | 75 | 30 | 20 |
| 15 m (0,3 mm VS × 1,58 mm IS) TFE | 83 | 33 | 22 |
| 30 m (0,25 mm VS × 1,58 mm IS) PEEK | 110 | 44 | 29 |

VS – vidinis skersmuo; IS – išorinis skersmuo.

Eksperimentiniai tyrimai atlikti atsižvelgiant į optimizuotų ir validuotų ESC metodikų, skirtų augalinių žaliavų analizei, eliucijos greičius. Chro­matografinėje sistemoje izokratinėmis sąlygomis buvo eliuuojamas vandens ir acetonitrilo (70:30) mišinys šiais tėkmės greičiais: 0,4 ml/min, 1 ml/min ir 1,5 ml/min. Reagentas į pokolonėlę buvo tiekiamas santykiu 1:1 eliucijos greičiui. Darbiniai DPPH ir ABTS tirpalai paruošti 80 μM koncentracijos atitinkamai acetonitrile ir vandenyje. Suminis reakcijos mišinio tėkmės greitis pokolonėlinėje sistemoje atitinkamai buvo 0,8 ml/min, 2 ml/min ir 3 ml/min. Skirtingų parametrų reakcijos kilpose pasiekiamas tam tikras reak­cijos mišinio užlaikymo laikas (3.1.1 lentelė.). Siekiant išvengti kolonėlės sorbento įtakos standartinių antioksidantų smailės koncentracijos zonos išplitimui, kolonėlė buvo įmontuota prieš injektorių. Į ESC pokolonėlinę sistemą injektuota po 10 μl 200 μM trolokso, 165 μM kvercetino ir 139 μM rozmarino rūgšties etanolinio tirpalo.

Nustatyta, kad 3 m (0,3 mm VS ir 1,58 mm IS) TFE reakcijos kilpa nesuteikia pakankamo laiko įvykti reakcijai tarp standartinio antioksidanto ir reagento. 30 m (0,25 mm VS ir 1,58 mm IS) PEEK vamzdelyje reakcija vyksta ilgiausiai, tačiau tuo pačiu sukeliamas nepageidaujamai didelis atga­linis slėgis pokolonėlinėje sistemoje. Pastebėta, kad didėjant reakcijos kil­pos vidiniam diametrui, plečiasi smailės koncentracijos zona, kartu mažėja ir S/N santykis. Tai vyksta dėl išilginės difuzijos vamzdelyje. Kuo didesnis reakcijos mišinio tėkmės greitis reakcijos kilpoje, tuo greičiau smailė bus eliuuota, o išilginės difuzijos indėlis bendrame koncentracijos zonos išpli­time bus mažesnis. Ilgesniuose vamzdeliuose išilginė difuzija yra didesnė [10]. Reakcijos mišinio užlaikymas skatina smailės išsiplėtimą. Bandonienė ir kt. [20] nustatė, kad reakcijos pusiausvyra tarp daugelio fenolinių junginių ir laisvųjų radikalų pasiekiama per pirmą minutę. Esant 0,8 ml/min sumi­niam tėkmės greičiui tinkamiausia 8 m (0,25 mm VS ir 1,58 mm IS) PEEK reakcijos kilpa. Dirbant 2 ml/min ir 3 ml/min suminiu tėkmės greičiu pasi­rinkta 15 m (0,3 mm VS ir 1,58 mm IS) TFE reakcijos kilpa. 5 m (0,5 mm VS ir 1,58 mm IS) TFE šiek tiek išplečia smailes, o 15 m (0,25 mm VS ir 1,58 mm IS) PEEK – nepasirinkta dėl trumpesnio užlaikymo laiko. Optima­liausia reakcijos mišinį pokolonėlinėje sistemoje išlaikyti apie 0,5 min, užtikrinant pakankamai ilgą reakcijos laiką ir geriausią S/N santykį.

# 3.2. ESC pokolonėlinių metodų optimizavimas ir validacija augalinių antioksidantų tyrimams

## 3.2.1. ESC–DPPH pokolonėlinis metodas

**Reakcijos terpės pokolonėlinėje sistemoje optimizavimas.** Fenolinių junginių analizei dažniausiai naudojama atvirkščių fazių chromatografija. Dėl augalinių žaliavos ekstraktų ar preparatų kompleksiškumo, junginių atskyrimui taikoma gradientinė eliucija acetonitrilo-vandens ar metanolio-vandens mišiniais be ar su nedideliu kiekiu rūgšties [10]. Eliuentai parūgšti­nami siekiant sumažinti fenolinių hidroksilo grupių jonizaciją ir taip page­rinti smailės simetriškumą [117].

Redokso reakcijos yra priklausomos nuo pH. Didėjanti terpės pH reikšmė, mažina jonizacijos potencialą bei didina deprotonizaciją [236]. Todėl antioksidantas lengviau atiduoda savo elektronus. Reakcijos terpės pH taip pat įtakoja DPPH radikalų stabilumą. Koleva ir kt. [123] nustatė, kad prie pH 3–6 DPPH tirpalo absorbcija per 30 s beveik nepakinta, tačiau stipriai rūgštinėje terpėje (pH 2,2) DPPH radikalai labai greitai suyra. Lite­ratūroje teigiama, kad reakciją tarp DPPH radikalo ir antioksidanto optima­liausia vykdyti prie pH 5–6,5 naudojant buferius [162]. Reakciją pagreitina vandeninės fazės buvimas reakcijos terpėje [216]. Buferinės sistemos palaiko nekintamą reakcijos terpės pH gradientinės eliucijos metu bei padi­dina antiradikalinio aktyvumo įvertinimo tikslumą.

ESC-DPPH pokolonėlinėje sistemoje išbandytas citrinų rūgšties-dinatrio hidrofosfato buferis, kurį pasiūlė Dapkevičius ir kt. [54]. DPPH kristalai ištirpinti acetonitrile ir pridėta minėto buferio santykiu 1:2, pH 7,6. Gra­dientinės analizės metu, sumažėjus vandeninės fazės procentui, reakcijos kilpoje pradėjo formuotis natrio hidrofosfato kristalai, kurie didino bazinės linijos nepastovumą. Susikaupę natrio hidrofosfato kristalai gali užkimšti reakcijos kilpą. Dėl šios priežasties citrinų rūgšties-dinatrio hidrofosfato buferio taikymas ESC-DPPH analizėje yra komplikuotas. Pukalskas ir kt. [189] eliuento pH korekcijai panaudojo amonio acetato (CH3COONH4) buferį. Eksperimentams buvo pagamintas DPPH radikalų tirpalas acetoni­trile ir pridėta 0,005 M koncentracijos CH3COONH4 buferio santykiu 1:2, pH 7,4. Reakcijos kilpoje nepageidaujami kristalai nesiformavo, tačiau ste­bimas didelis bazinės linijos nestabilumas pokolonėlinėje chromatogramoje. Todėl amonio acetato buferis tolimesniuose tyrimuose nenaudotas.

ESC-DPPH pokolonėliniu metodu geriausi etaloninių antioksidantų S/N rezultatai pasiekti naudojant citrinų rūgšties-natrio citrato buferį, kurį pasiūlė Kosar ir kt. [127, 128]. Citratinį buferį (pH 7,6) sudaro 0,05 M citri­nų rūgšties ir 0,05 M natrio citrato tirpalai. DPPH radikalai ištirpinami acetonitrile ir gautas tirpalas sumaišomas su 0,05 M citratiniu buferiu santy­kiu 1:1. Reakcijos terpės mažo pH (apie 2) korekcijai taikytas dvigubos koncentracijos 0,1 M citratinis buferis, tačiau gradientinės eliucijos metu padidėjus organinės fazės kiekiui eliuente (80–100 proc.), blogėja natrio citrato tirpumas. Susidarusios nuosėdos trukdo pratekančio reakcijos mišinio absorbcijos detekcijai. Naudojant 0,05 M koncentracijos citratinį buferį, minėtos komplikacijos buvo eliminuotos.

**DPPH radikalų koncentracijos reaktoriuje parinkimas**. DPPH radi­kalų koncentracijos reaktoriuje įtakos antiradikalinio atsako stiprumo įverti­nimui buvo pasirinkti šie standartiniai junginiai: troloksas 159,8 μM, hipe­rozidas 57,6 μM, kvercetinas 82,7 μM ir chlorogeno rūgštis 112,9 μM. Šių junginių atskyrimui analitinėje kolonėlėje (X-Terra RP18 150×3,0 mm, 3,5 μm) taikyta gradientinė eliucija 0,4 ml/min tėkmės greičiu, judria faze nau­dojant 0,1 proc. TFA vandenyje (eliuentas A) ir 0,1 proc. TFA acetonitrile (eliuentas B). Skirtinga DPPH radikalų koncentracija 8 m (0,25 mm VS ir 1,58 mm IS) PEEK reakcijos kilpoje pasiekta keičiant darbinio DPPH tirpalo koncentraciją. Reikiamas kiekis DPPH kristalų buvo ištirpinti aceto­nitrile ir sumaišyti su 0,05 M citratiniu buferiu santykiu 1:1. Gautas darbinis DPPH tirpalas buvo tiekiamas į pokolonėlinę sistemą 0,4 ml/min. tėkmės greičiu.

***3.2.1.1 pav.*** *Standartinių junginių smailės ploto priklausomybė nuo DPPH radikalų koncentracijos reaktoriuje.*

ESC-DPPH pokolonėliniu metodu tiriamų junginių antiradikalinis akty­vumas kiekiškai vertinamas pagal neigiamos smailės plotą. Nustatyta, kad didinant DPPH radikalų koncentraciją reaktoriuje, didėja standartinių jungi­nių smailės plotas pokolonėlinėje chromatogramoje. Ši priklausomybė pavaizduota 3.2.1.1 pav.

Maksimalūs visų standartinių junginių smailių plotai pasiekiami esant apie 100 μM DPPH radikalų koncentracijai reaktoriuje. Kvercetinui ir hipe­rozidui pakanka ir 50 μM DPPH radikalų koncentracijos. Deja, DPPH radi­kalų koncentracijos didinimas reaktoriuje sukelia bazinės linijos nestabi­lumą ir didina triukšmo lygį pokolonėlinėje sistemoje (3.2.1.2 pav.). Bazi­nės linijos nepastovumas įvardijamas kaip pagrindinė ESC-DPPH pokolo­nėlinio metodo problema [127]. Tai neigiamai įtakoja metodo jautrumą, padidėja antiradikališkai aktyvaus junginio aptikimo ir minimali nustatymo ribos.

***3.2.1.2 pav.*** *Standartinių junginių smailės S/N santykio ir bazinės linijos triukšmo priklausomybė nuo DPPH radikalų koncentracijos reaktoriuje.*

Reaktoriuje pasiekus apie 100 μM DPPH radikalų koncentraciją, dėl bazinės linijos triukšmo reikšmingai mažėja S/N santykis (p<0,05). Didžiausios S/N reikšmės gautos esant mažoms DPPH radikalų koncentra­cijoms (iki 20 μM) (3.2.1.2 pav.). Tačiau atliekant augalinių ekstraktų ar preparatų tyrimus ESC-DPPH pokolonėliniu metodu dėl mažos radikalų koncentracijos reaktoriuje gali būti pasiekiama detekcijos riba. Aktyviausių junginių neigiamų smailių viršūnės pokolonėlinėje chromatogramoje tarsi „nupjaunamos“ surišant visus reakcijos kilpoje esančius DPPH radikalus.

Naudojant 50 μM DPPH radikalų koncentraciją reaktoriuje gaunami optimalūs standartinių junginių S/N santykiai. Prie šios radikalų koncentra­cijos pasiekiamos tinkamos detekcijos ribos augalinių ekstraktų ir preparatų antiradikalinio aktyvumo tyrimams. Radikalus surišančių junginių nustaty­mui ir kiekiniam antiradikalinio aktyvumo įvertinimui pasirinkta 50 μM DPPH radikalų koncentracija reaktoriuje.

**DPPH tirpalo tėkmės greičio optimizavimas.** Reakcijos kinetika tarp augalinio antioksidanto ir DPPH radikalo yra skirtinga. Vieni antioksidantai pasižymi greita reakcijos kinetika, kiti – ženkliai lėtesne [20]. Spektrofoto­metriniu metodu nustatyta, kad daugelis augalinių antioksidantų reikšmingą kiekį DPPH radikalų suriša per 30–60 s [20]. ESC-DPPH pokolonėliniame metode, atliekant standartinių junginių eliuciją 0,4 ml/min tėkmės greičiu, buvo naudojama 8 m (0,25 mm VS ir 1,58 mm IS) PEEK reakcijos kilpa. DPPH tirpalo tiekimo į pokolonėlę greitis tiesiogiai lemia reakcijos laiką tarp antioksidanto ir DPPH radikalų. Nustatyta, kad ilgėjant reakcijos laikui didėja standartinių junginių neigiamos smailės plotas (3.2.1.3 pav.).

***3.2.1.3 pav.*** *Standartinių junginių smailės ploto priklausomybė nuo reakcijos laiko su DPPH radikalais (50 μM) reaktoriuje.*

DPPH radikalų tirpalo tėkmės greitis įtakoja pokolonėlinės chromato­gramos bazinės linijos triukšmą ir analitės neigiamos smailės aukštį. Į pokolonėlinę sistemą DPPH radikalus tiekiant 0,1 ml/min tėkmės greičiu, padidėja bazinės linijos triukšmas bei šiek tiek išplečiamos smailės. Tai sumažina standartinių junginių S/N santykį (3.2.1.4 pav.). Didinant DPPH tirpalo tėkmės greitį, chromatogramos bazinės linijos triukšmas mažėja. Tačiau dėl trumpėjančio reakcijos laiko gaunamas mažesnis smailės aukštis. Nustatyta, kad optimaliausias DPPH radikalų tiekimo greitis į pokolonėlinę sistema yra 0,4 ml/min. Esant šiam tėkmės greičiui pasiekiamos didžiausios standartinių junginių S/N reikšmės (3.2.1.4 pav.).

Antiradikalinio aktyvumo nustatymo ir įvertinimo tyrimams ESC-DPPH pokolonėliniu metodu ruošiamas šviežias DPPH radikalų tirpalas, kuris lai­komas tamsaus stiklo butelyje apsaugotas nuo šviesos. Šiose sąlygose DPPH tirpalo absorbcija po 8–10 val. sumažėja apie 5 proc. Tai leidžia jį naudoti serijinei analizei. Darbinio tirpalo DPPH radikalų koncentracija yra 100 μM, kuri spektrofotometru standartizuojama pagal optinį tankį iki 0,500±0,005 AV prie 520 nm bangos ilgio. Į pokolonėlinę sistemą darbinis DPPH tirpalas tiekiamas 0,4 ml/min tėkmės greičiu.

***3.2.1.4 pav.*** *Standartinių antioksidantų smailės S/N santykio priklausomybė nuo DPPH tirpalo tėkmės greičio.*

**ESC-DPPH pokolonėlinio metodo validacija**. Literatūroje trūksta duomenų apie antioksidantinio aktyvumo nustatymui taikomų ESC pokolo­nėlinių metodų validaciją. Nėra vieningų validacijos parametrų. Pokolonė­linė reakcija vykdoma po chromatografinės analizės. Į reaktorių patenka jau atskirtos analitės. Todėl ESC-DPPH pokolonėlinio metodo validacijai netai­komi ESC metodo skiriamosios gebos ir analitės sulaikymo trukmės glau­dumo įvertinimai. Pokolonėliniam metodui naudojamos jau validuotos ESC metodikos.

ESC-DPPH pokolonėlinio metodo validacija atlikta vertinant standartinių junginių neigiamų smailių plotus. Pasirinkti keli standartiniai metodo vali­dacijos parametrai: specifiškumas, aptikimo riba, nustatymo riba, glaudu­mas ir tiesiškumas.

Specifiškumas įvertintas atskiriant junginius pasižyminčius DPPH radi­kalus surišančiu poveikiu. Pokolonėlinėje sistemoje atskirtos analitės sąvei­kauja su DPPH radikalais. Antiradikališkai aktyvi analitė reaguoja su DPPH radikalais mažindama reakcijos kilpoje esančio mišinio absorbciją prie 520 nm ir pokolonėlinėje chromatogramoje fiksuojama neigiama smailė. Anali­tės nepasižyminčios antiradikalinėmis savybėmis neigiamų smailių nesu­daro (pvz.: apigeninas).

Įvertintos pasirinktų standartinių junginių aptikimo ir nustatymo ribos (3.2.1.1 lentelė). Mažiausios reikšmės gautos troloksui (atitinkamai 1,89 ir 5,72 μM), didžiausios – chlorogeno rūgščiai (atitinkamai 4,06 ir 12,30 μM).

Nustatyti ESC-DPPH pokolonėlinio metodo pakartojamumo (*intra-day*) ir atkuriamumo (*inter-day*) neigiamos smailės plotui variacijos koeficientai, kurie neviršija 4,99 proc. Toks rezultatų glaudumas yra priimtinas ir galima atlikti kiekinį junginių antiradikalinio aktyvumo įvertinimą. Nustatyti stan­dartinių junginių tiesiškumo intervalai, kurie pateikti 3.2.1.1 lentelėje. Apskaičiuoti kalibracinių kreivių determinacijos koeficientai (R2) didesni už 0,99, tai patvirtina metodo tiesiškumą.

***3.2.1.1 lentelė.*** *ESC–DPPH pokolonėlinio metodo validacijos parametrų reikšmės.*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Junginys** | **LoD**a **μM** | **LoQ**b **μM** | **Intra-day**c**, proc.** | **Inter-day**d**, proc.** | **Tiesiš-kumas, μM** | **Kalibracinė kreivė** | **R2** |
|
| Troloksas | 1,89 | 5,72 | 1,45 | 3,13 | 5 – 280 | y = 3435,7x + 18680 | 0,9977 |
| Hiperozidas | 2,46 | 7,46 | 1,31 | 3,77 | 4 – 194 | y = 3163,9x + 487,61 | 0,9988 |
| Kvercetinas | 2,12 | 6,44 | 1,56 | 4,62 | 4 – 232 | y = 5156,2x – 20097 | 0,9989 |
| Chlorogeno rūgštis | 4,06 | 12,30 | 2,19 | 4,99 | 7 – 282 | y = 2243,7x + 11481 | 0,9978 |

a aptikimo riba; b nustatymo riba; c pakartojamumas; d atkuriamumas.

ESC-DPPH pokolonėlinis metodas optimizuotas bei validuotas ir su kitomis chromatografinio skirstymo metodikomis, kuriose eliucijos tėkmės greitis buvo 1 ml/min ir 1,5 ml/min. Pakankamam eliuento ir DPPH radikalų (50 μM) mišinio išlaikymui reaktoriuje panaudotas 15 m (0,3 mm VS ir 1,58 mm IS) TFE vamzdelis. Nustatyta, kad optimalus darbinio DPPH tirpalo tiekimo greitis į pokolonėlę atitinka ESC eliucijos tėkmės greitį, išlaikant santykį 1:1. Esant šiam santykiui pasiekiamos geriausios standartinių jungi­nių S/N reikšmės. Atliktų validacijos parametrų (specifiškumas, aptikimo riba, nustatymo riba, glaudumas ir tiesiškumas) tyrimų rezultatai patvirtino ESC-DPPH pokolonėlinio metodo tinkamumą radikalus surišančių junginių nustatymui ir kiekiniam antiradikalinio aktyvumo įvertinimui.

## 3.2.2. ESC–ABTS pokolonėlinis metodas

**ABTS radikalo-katijono aktyvacija ir darbinio tirpalo stabilumas.** Literatūroje nurodomi įvairūs ABTS radikalo-katijono (ABTS•+) generacijos būdai [92]. ABTS•+ gali būti gaunamas oksiduojant ABTS šiais oksidato­riais: metmioglobinu/vandenilio peroksidu (H2O2) [132, 157, 158]; krienų peroksidaze/H2O2 [14, 101]; peroksilo radikalu (ROO•), gautu terminio 2,2-azobis(2-amidinopropano) hidrochlorido (AAPH) skaidymo metu [92, 232, 233]; mangano dioksidu (MnO2) [25, 92, 159]; bromu (Br2) [206]; kalio persulfatu (K2S2O8) [92, 180, 196, 248].

Mūsų tyrimuose ABTS radikalo-katijono aktyvacijai išbandyti stiprūs oksidantai kalio permanganatas ir kalio persulfatas. Aktyvuojant ABTS•+ kalio permanganatu, kyla problemos dėl iškritusių MnO2 nuosėdų, kurių pašalinimui reikalingos papildomos procedūros. Šiuo būdu aktyvuotų ABTS radikalų-katijonų tirpalas yra nestabilus, nes reakcijos tarp MnO2 ir ABTS metu susidarę Mn(II) ir/arba Mn(III) jonai skatina ABTS radikalų-katijonų suirimą [92]. Paruošto darbinio ABTS•+ tirpalo absorbcija kambario tempe­ratūroje sumažėdavo apie 20 proc. per pirmąją analizės valandą. Dėl šios priežasties kalio permanganatas netinka ABTS radikalų-katijonų generacijai ESC-ABTS pokolonėlinei analizei, kuriai būtinas ilgalaikis reagento stabi­lumas.

Kalio persulfatu aktyvuoti ABTS radikalai-katijonai pasižymi dideliu stabilumu. Literatūros duomenimis optimaliausias ABTS/K2S2O8 molinis santykis tirpale turi būti tarp 2 ir 3 [92]. Mūsų tyrimuose pradinis ABTS•+ tirpalas ruošiamas oksiduojant 2 mM ABTS 0,7 mM kalio persulfatu vande­nyje. Mišinys laikomas 16–17 val. tamsoje kol pasiekiama reakcijos pusiausvyra. Pradinis ABTS•+ tirpalas apsaugotas nuo šviesos yra stabilus daugiau nei dvi dienas laikant jį kambario temperatūros sąlygomis. Nusta­tyta, kad K2S2O8 aktyvuotų ABTS radikalų-katijonų suirimas yra labai mažas (iki 1 proc./val.), todėl jie tinkami naudoti serijinei bandinių analizei ESC-ABTS pokolonėliniu metodu.

Eksperimentiniams tyrimams pradinis ABTS•+ tirpalas praskiedžiamas iki darbinės koncentracijos. Kaip jau minėta, svarbus parametras yra darbi­nio ABTS•+ tirpalo ilgalaikis stabilumas. ABTS radikalų-katijonų koncen­tracijos mažėjimas reaktoriuje įtakoja kiekinio antiradikalinio aktyvumo įvertinimo tikslumą, o pasiekus detekcijos ribą – kiekinis įvertinimas tampa negalimas. Pradinio ABTS•+ tirpalo praskiedimui buvo išbandyti: 8 mM fos­fatinių druskų (PBS) buferis (pH 7,4), 0,1 M citrinos rūgšties-natrio citrato buferis (pH 7,6) ir išgrynintas vanduo. Darbinės koncentracijos ABTS•+ tirpalas laikytas 8 val. kambario temperatūroje apsaugotas nuo šviesos. Nustatyta, kad praskiedimui naudojant PBS buferį, vyksta stiprus ABTS radikalų-katijonų irimas ir po 5 val. darbinio ABTS•+ tirpalo koncentracija sumažėja iki 50% (~0,2 µM/min). Panaši tendencija stebėta praskiedus pradinį ABTS•+ tirpalą citratiniu buferiu (~0,17 µM/min). Didžiausias darbinio ABTS•+ tirpalo ilgalaikis stabilumas (p<0,05) pasiektas skiedžiant išgrynintu vandeniu. ABTS radikalų-katijonų koncentracija tirpale po 8 val. sumažėja tik ~5%. Tolimesniuose tyrimuose pradinis ABTS•+ tirpalas prieš kiekvieną serijinę analizę skiedžiamas išgrynintu vandeniu iki darbinės kon­centracijos.

Koleva ir kt. [124] įvertino organinio tirpiklio įtaką ABTS•+ radikalų-katijonų stabilumui reaktoriuje ir nustatė, kad net prie 100 proc. organinės judrios fazės (metanolio ar acetonitrilo) ABTS•+ absorbcijos pokytis yra nežymus. Augalinių ekstraktų antiradikalinio aktyvumo tyrimai ESC-ABTS pokolonėliniu metodu gali būti atliekami izokratinės ir gradientinės eliucijos sąlygomis.

**ABTS radikalų-katijonų koncentracijos reaktoriuje parinkimas.** Ra­dikalus surišančių augalinių junginių kiekiniam antiradikalinio aktyvumo įvertinimui ESC-ABTS pokolonėliniu metodu labai svarbu parinkti optima­lią ABTS radikalų-katijonų koncentraciją reaktoriuje. ABTS•+ koncentracija kaip ir reakcijos laikas įtakoja antioksidanto neigiamos smailės plotą poko­lonėlinėje chromatogramoje ir S/N reikšmę. Didinant ABTS radikalų-kati­jonų koncentraciją reaktoriuje, plečiamos reaktoriaus detekcijos ribos. Tuo pačiu sumažinamas metodo jautrumas. Jautrumas gali būti reguliuojamas keičiant ABTS radikalų-katijonų koncentraciją reakcijos kilpoje atsižvel­giant į tiriamų junginių koncentraciją, jų antiradikalinę galią ir reakcijos kinetiką. Mažu antiradikaliniu aktyvumu pasižyminčių augalinių junginių tyrimams reikalingas didesnis ESC-ABTS pokolonėlinio metodo jautrumas, kuris pasiekiamas sumažinant ABTS•+ koncentraciją arba prailginant reak­cijos laiką.

ESC-ABTS pokolonėlinis metodas optimizuotas atsižvelgiant į įprastines augalinių ekstraktų analičių koncentracijas nustatomas chromatografinės analizės metu. Optimalios ABTS radikalų-katijonų koncentracijos reakto­riuje nustatymo tyrimams naudotas šis standartinių junginių mišinys: trolok­sas (80 µM), rozmarino rūgštis (110 µM), kavos rūgštis (60 µM) ir chloro­geno rūgštis (150 µM). Chromatografinis skirstymas atliktas ACE C18 150×4,6 mm, 5 μm analitine kolonėle taikant gradientinę eliuciją 1 ml/min greičiu. Judri fazė sudaryta iš dviejų eliuentų: A – 0,5 proc. v/v acto rūgštis, B – metanolis. Reikiama ABTS radikalų-katijonų koncentracija reaktoriuje (10–120 µM) pasiekta, keičiant darbinio ABTS tirpalo koncentraciją. Į 15 m (0,3 mm VS ir 1,58 mm IS) TFE reakcijos kilpą (tūris ~1ml) darbinis ABTS tirpalas tiektas 1 ml/min tėkmės greičiu.

Nustatyta, kad didinant ABTS radikalų-katijonų koncentraciją reakto­riuje, didėja standartinio junginio neigiamos smailės plotas pokolonėlinėje chromatogramoje. Ši priklausomybė pavaizduota 3.2.2.1 pav. Pasiekus tam tikrą ABTS radikalų-katijonų koncentraciją reaktoriuje, standartinių jungi­nių smailės plotas nebedidėja. Didžiausi ir nebekintantys smailių plotai pasiekiami prie skirtingų ABTS•+ koncentracijų (troloksas prie 25 µM, kavos ir chlorogeno rūgštys – 95 µM). Taip atsitinka dėl nevienodos anti­oksidantų reakcijos kinetikos su radikalais. Esant mažai ABTS•+ koncentra­cijai reaktoriuje (10 µM), standartiniai junginiai suriša visus radikalus-kati­jonus ir pasiekiama reaktoriaus detekcijos riba (neigiamos smailės „nupjau­namos“).

***3.2.2.1 pav.*** *Standartinių junginių smailės ploto priklausomybė nuo ABTS radikalų-katijonų koncentracijos reaktoriuje.*

Nuo 35 µM ABTS•+ koncentracijos toliau didinant ABTS radikalų-kati­jonų kiekį reaktoriuje nenustatytas statistiškai patikimas trolokso ir rozma­rino rūgšties neigiamų smailių plotų skirtumas (p<0,05). Kavos ir chloro­geno rūgščių nekintantys smailių plotai pokolonėlinėje chromatogramoje pasiekiami prie 95 µM ABTS radikalų-katijonų koncentracijos.

***3.2.2.2 pav.*** *Standartinių junginių smailės S/N santykio ir bazinės linijos triukšmo priklausomybė nuo ABTS radikalų-katijonų koncentracijos reaktoriuje.*

Tačiau didėjant ABTS•+ koncentracijai reaktoriuje, tuo pačiu sparčiai didėja bazinės linijos triukšmas, kuris mažina S/N santykį (3.2.2.2 pav.). S/N santykis tiesiogiai susijęs su ABTS radikalų-katijonų koncentracija reaktoriuje. Didėjant ABTS•+ koncentracijai, mažėja S/N santykis. Pokolo­nėlinės chromatogramos bazinės linijos nestabilumas turi neigiamos įtakos metodo jautrumui ir kiekinio antiradikalinio aktyvumo (TEAC) įvertinimo tikslumui.

Statistiškai reikšmingas bazinės linijos triukšmo pokytis nustatytas kai ABTS•+ koncentracija reaktoriuje pasiekia 45 µM. Toliau didinant ABTS•+ koncentraciją, bazinės linijos nestabilumas labai sparčiai didėja.

Nustatyta, kad optimaliausia ABTS radikalų-katijonų koncentracija reaktoriuje yra 35 µM. Esant šiai koncentracijai pasiekiamas optimalus standartinių junginių S/N santykis bei neigiamos smailės plotas. Tolimes­niems tyrimams ESC-ABTS pokolonėliniu metodu pasirinkta 35 µM ABTS radikalų-katijonų koncentracija reaktoriuje.

**Darbinio ABTS•+ tirpalo tėkmės greičio optimizavimas.** Kaip jau minėta, pokolonėlinės reakcijos laiką galima keisti reguliuojant darbinio ABTS•+ tirpalo tėkmės greitį. Į 15 m (0,3 mm VS × 1,58 mm IS) TFE reak­cijos kilpą skirtingais tėkmės greičiais (0,25 – 1,5 ml/min) tiektas tam tikros koncentracijos darbinis ABTS•+ tirpalas, kad reaktoriuje būtų pasiekta 35 µM ABTS radikalų-katijonų koncentracija. Nustatyta, kad didinant darbinio ABTS•+ tirpalo tėkmės greitį į pokolonėlinę sistemą, standartinių junginių neigiamų smailių plotai mažėja, kadangi sutrumpėja reakcijos laikas reakto­riuje (3.2.2.3 pav.).

***3.2.2.3 pav.*** *Standartinių junginių smailės ploto priklausomybė nuo reakcijos laiko su ABTS radikalais-katijonais reaktoriuje.*

Ilgėjant reakcijos laikui reaktoriuje, pasiekiamas didesnis antiradikalinis atsakas. Svarbus parametras yra atgalinis slėgis pokolonėlinėje sistemoje, kuris didėja, didinant reagento tirpalo tėkmės greitį. Būtina atsižvelgti į detektoriaus pratekančios kiuvetės ir reakcijos kilpos slėgio ribas.

***3.2.2.4 pav.*** *Standartinių junginių smailės S/N santykio priklausomybė nuo ABTS tirpalo tėkmės greičio.*

Nustatyta, kad darbinio ABTS•+ tirpalo tiekimo į pokolonėlinę sistemą greitis įtakoja ne tik standartinio junginio smailės plotą, bet ir S/N santykį (3.2.2.4 pav.). Prie 0,25 ml/min tėkmės greičio pastebėtas padidėjęs bazinės linijos nestabilumas, kuris sumažino S/N santykį. Tai gali būti susiję su didesne darbinio ABTS•+ tirpalo koncentracija (175 µM). Didinant ABTS tirpalo tėkmės greitį nuo 0,5 ml/min iki 1,5 ml/min, S/N santykis taip pat mažėja, kadangi trumpėja reakcijos laikas. Geriausias standartinių junginių S/N santykis pasiekiamas prie 0,5 ml/min tėkmės greičio (3.2.2.4 pav.).

Radikalus surišančių junginių nustatymui ir kiekiniam jų antiradikalinio aktyvumo įvertinimui ESC-ABTS pokolonėliniu metodu ruošiamas šviežias darbinis ABTS radikalų-katijonų tirpalas, praskiedžiant pradinį ABTS•+ tirpalą išgrynintu vandeniu iki 110 µM (0,90 AV) koncentracijos. Darbinis ABTS•+ tirpalas į pokolonėlinę sistemą tiekiamas 0,5 ml/min tėkmės greičiu (santykis tarp ESC eliucijos ir reagento tėkmės greičių yra 2:1) ir reaktoriuje pasiekiama optimali 35 µM ABTS radikalų-katijonų koncentracija. Analizės metu darbinis ABTS•+ tirpalas laikomas tamsaus stiklo butelyje apsaugotas nuo šviesos.

**ESC-ABTS pokolonėlinio metodo validacija.** Validacija atlikta optimi­zuotomis sąlygomis vertinant standartinių junginių neigiamų smailių plotus pokolonėlinėje chromatogramoje. Pasirinkti šie metodo validacijos parame­trai: specifiškumas, aptikimo riba, nustatymo riba, glaudumas ir tiesišku­mas.

ESC-ABTS pokolonėlinio metodo specifiškumas buvo įvertintas identi­fikacijos testu atskiriant antiradikališkai aktyvius junginius. Chromoforinio ABTS radikalo-katijono ir atskirtos analitės reakcijos metu sumažėja miši­nio spalvos (mėlynai žalia) intensyvumas reaktoriuje. Fiksuojamas absorb­cijos pokytis prie 650 nm bangos ilgio kaip neigiama smailė pokolonėlinėje chromatogramoje, kas patvirtina analitės antiradikalines savybes.

Praskiedimo būdu nustatytos standartinių junginių aptikimo ir nustatymo ribos. Pagal 3.2.2.1 lentelėje pateiktus rezultatus galima teigti, kad ESC-ABTS pokolonėlinis metodas yra pakankamai jautrus. Aptikimo ir nusta­tymo ribos atitinkamai svyravo nuo 1,60 iki 2,26 µM bei nuo 5,00 iki 7,53 µM.

***3.2.2.1 lentelė.*** *ESC–ABTS pokolonėlinio metodo validacijos parametrų reikšmės.*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Junginys** | **LoD**a**, μM** | **LoQ**b**, μM** | **Intra-day**c**, proc.** | **Inter-day**d**, proc.** | **Tiesiš-kumas, μM** | **Kalibracinė kreivė** | **R2** |
|
| Troloksas | 1,60 | 5,00 | 1,53 | 2,99 | 5 – 320 | y = 2812,7x – 9576,6 | 0,9997 |
| Rozmarino rūgštis | 1,67 | 5,07 | 1,60 | 3,13 | 5 – 180 | y = 4896,6x – 1760,9 | 0,9986 |
| Kavos rūgštis | 2,22 | 7,40 | 1,28 | 2,16 | 6 – 555 | y = 2166,3x – 6228,6 | 0,9958 |
| Chlorogeno rūgštis | 2,26 | 7,53 | 3,21 | 5,84 | 7 – 283 | y = 1203,8x – 17352,0 | 0,9910 |

a aptikimo riba; b nustatymo riba; c pakartojamumas; d atkuriamumas.

ESC-ABTS pokolonėlinio metodo pakartojamumo variacijos koeficientas neviršija 3,21 proc., o atkuriamumo – 5,84 proc. (3.2.2.1 lentelė.). Toks rezultatų glaudumas yra priimtinas. Nustatyti standartinių antioksidantų tie­siškumo intervalai ir apskaičiuoti kalibracinių kreivių determinacijos koefi­cientai (R2), kurie yra didesni už 0,99, kas patvirtina metodo teisiškumą (3.2.2.1 lentelė.).

Gauti pasirinktų ESC-ABTS pokolonėlinio metodo validacijos parametrų įverčiai patvirtina jo tinkamumą ir patikimumą augaliniuose ekstraktuose bei jų preparatuose esančių radikalus surišančių junginių nustatymui ir kiekiniam antiradikalinio aktyvumo įvertinimui pagal TEAC reikšmes.

## 3.2.3. ESC-FRAP pokolonėlinis metodas

**Eksperimentinių sąlygų optimizavimas.** ESC-FRAP pokolonėlinis metodas įvertina chromatografinėje sistemoje atskirtų junginių sukeltą trivalentės geležies-tripyridyltriazino (Fe(III)-TPTZ) komplekso redukciją į dvivalentės geležies-tripyridyltriazino (Fe(II)-TPTZ) kompleksą esant mažai terpės pH 3,6 reikšmei. Pratekančio eliuento ir FRAP reagento mišinio absorbcija prie 593 nm bangos ilgio padidėja po reakcijos su redukcinėmis savybėmis pasižyminčia analite [78, 88]. Absorbcijos pokytis pokolonėli­nėje chromatogramoje fiksuojamas kaip teigiama smailė. Pagal gautos smailės plotą kiekiškai (apskaičiuojant TEAC reikšmę) įvertinamas junginio redukcinis aktyvumas.

FRAP reagentas ruoštas pagal Benzie ir Strain aprašytą spektrofotometri-nio tyrimo metodiką [29]. Optimalių TPTZ ir FeCl3×6H2O koncentracijų reaktoriuje tyrimams naudoti dviejų skirtingų koncentracijų (20 ir 400 μM) trolokso tirpalai. Šios koncentracijos pasirinktos ne atsitiktinai, o siekiant išvengti galimos detekcijos ribos (dėl mažėjančios reagentų koncentracijos) įtakos redukcinio atsako stiprumui. Trolokso eliucija atlikta 1 ml/min tėk­mės greičiu izokratinėmis sąlygomis, naudojant judrią fazę sudarytą iš 50 proc. eliuento A (1 proc. v/v skruzdžių rūgštis) ir 50 proc. eliuento B (ace­tonitrilas). FRAP reagentas į 15 m (0,3 mm VS ir 1,58 mm IS) apie 1 ml talpos TFE reakcijos kilpą tiektas 0,5 ml/min tėkmės greičiu.

Fig.1. FRAP reangents koncentracija.TIF

**TPTZ/FeCl3×6H2O koncentracija reaktoriuje, μM**

**20 μM trolokso smailės plotas**

**400 μM trolokso smailės plotas**

***3.2.3.1 pav.*** *Trolokso (400 μM ir 20 μM) smailės ploto priklausomybė nuo TPTZ ir FeCl3×6H2O koncentracijos reaktoriuje.*

3.2.3.1 pav. grafiškai pavaizduota TPTZ/FeCl3×6H2O koncentracijų reaktoriuje įtaka trolokso smailės plotui. Mažinant TPTZ/FeCl3×6H2O kon­centracijas nuo 278/556 μM iki 123/246 μM statistiškai reikšmingi (p < 0,05) trolokso smailių plotų skirtumai nenustatyti (4268514±1017 ir 275210±930 atitinkamai 400 ir 20 μM koncentracijos trolokso tirpalui). Nuo 104/208 μM TPTZ/FeCl3×6H2O koncentracijų reaktoriuje stebimas reikš­mingas (p<0,05) trolokso smailių plotų sumažėjimas. Tolesniems tyrimams ESC-FRAP pokolonėliniu metodu naudojama 123 μM TPTZ ir 246 μM FeCl3×6H2O koncentracija reaktoriuje.

Į pokolonėlinę sistemą tiekiamas darbinis FRAP reagentas yra nespalvo­tas. Spalva atsiranda tik po reakcijos su redukciniu aktyvumu pasižyminčiu junginiu. Dėl šios priežasties FRAP reagento koncentracijos ir tėkmės grei­čio įtaka bazinės linijos triukšmui pokolonėlinėje chromatogramoje yra labai nežymi. Tiriamo junginio S/N reikšmė kaip ir smailės plotas priklauso nuo reakcijos laiko bei galimo smailės išsiplėtimo.

**ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėlinių metodų charakteristikos.** Pokolonėlinių reakcijų su ABTS radikalais-katijonais ir FRAP reagentu metu įvertinamos chromatografiškai atskirtų analičių kokybinės savybės. Reakcija su ABTS•+ charakterizuoja tiriamųjų junginių gebėjimą surišti laisvuosius radikalus, o su FRAP reagentu – gebą redukuoti trivalentę geležį. ESC-ABTS pokolonėlinis metodas įvertina aktyvaus junginio galią inaktyvuoti oksidantą, o ESC-FRAP pokolonėliniu metodu tiesiogiai nusta­toma aktyvaus junginio redukcinė galia, kuri yra svarbi savybė apibūdinant antioksidantą [115, 169]. ESC-FRAP yra patikimas pokolonėlinis metodas įvairių junginių antioksidantinio aktyvumo įvertinimui, kadangi tiriamo jun­ginio antioksidantinė galia yra tiesiogiai siejama su jo redukcine galia [67]. Redukcinis aktyvumas yra įvertinamas ir kiekiškai – apskaičiuojant TEAC reikšmę. Tam, kad galėtume objektyviai ir išsamiai prie tų pačių optimalių sąlygų palyginti augalinių antioksidantų savybės reikia validuoti ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėlinius metodus. Tik validuotas metodas patvirtina, kad analitinė procedūra yra tinkama numatytiems tyrimams [117].

Antioksidantiškai aktyvių junginių reakcijos kinetika su ABTS ir FRAP reagentais yra skirtinga ir priklauso nuo reagento koncentracijos ir terpės pH reaktoriuje, reakcijos laiko ir temperatūros. ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėlinių metodų palyginimas atliktas naudojant kompleksinę aparatū­ros *2 sistemą* (žr. „Tyrimų metodai“) prie optimalių sąlygų: ABTS•+ (35 μM) ir FRAP (123 μM TPTZ ir 246 μM FeCl3×6H2O) reagentų koncentra­cijų reaktoriuje esant žemam pH (3,6). Tyrimams naudota fiksuotų para­metrų 15 m (0,3 mm VS ir 1,58 mm IS) apie 1 ml talpos TFE reakcijos kilpa, į kurią ABTS ir FRAP reagentai tiekti 0,5 ml/min tėkmės greičiu. Reakcija tarp atskirtos analitės ir ABTS ar FRAP reagento vyksta apie 40 s kambario temperatūros reaktoriuje.

**ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėlinių metodų validacija.** Valida­cijos tyrimams pasirinktas šis standartinių junginių mišinys: dvi fenolinės rūgštys (chlorogeno rūgštis, kavos rūgštis), trys flavanolių dariniai ((+)-ka­techinas, (-)-epikatechinas, epigalokatechino galatas), penki flavonoliai (rutinas, kvercetinas, izokvercitrinas, kvercitrinas, hiperozidas), elago rūgš­tis ir troloksas. Įvertinti validacijos parametrai: specifiškumas, glaudumas, aptikimo riba, nustatymo riba ir tiesiškumas.

***3.2.3.1 lentelė.*** *ESC–ABTS pokolonėlinio metodo validacijos parametrų reikšmės.*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Junginys** | **LoD**a **μM** | **LoQ**b **μM** | **Intra-day**c**, proc.** | **Inter-day**d**, proc.** | **Tiesiš-kumas, μM** | **Kalibracinė kreivė** | **R2** |
|
| Troloksas | 1,86 | 5,59 | 1,35 | 3,11 | 5 – 400 | y = 6793,9x – 7302,9 | 0,9998 |
| Chlorogeno rūgštis | 2,65 | 7,94 | 3,37 | 7,14 | 5 – 285 | y = 3394,4x – 1735,1 | 0,9978 |
| Kavos rūgštis | 2,57 | 7,73 | 1,56 | 3,41 | 5 – 555 | y = 6414,6x – 6228,6 | 0,9994 |
| Elago rūgštis | 3,28 | 9,94 | 1,18 | 4,56 | 5 – 200 | y = 897,7x  – 2061,7 | 0,9994 |
| Rutinas | 2,02 | 6,11 | 1,22 | 3,83 | 4 – 80 | y = 3570,4x + 1113,5 | 0,9994 |
| Kvercetinas | 1,55 | 4,69 | 2,68 | 5,30 | 4 – 330 | y = 6471,9x + 1917,3 | 0,9989 |
| Kvercitrinas | 1,83 | 5,56 | 2,11 | 4,73 | 5,5 – 110 | y = 2106,8x + 4838,5 | 0,9987 |
| Izokvercitrinas | 2,37 | 7,18 | 2,41 | 4,97 | 5,5 – 110 | y = 3625,4x + 1267,1 | 0,9982 |
| Hiperozidas | 1,47 | 4,46 | 1,63 | 3,07 | 2,8 – 110 | y = 4842,7x + 1178,4 | 0,9998 |
| (+)-katechinas | 1,71 | 4,93 | 1,35 | 4,11 | 4 – 410 | y = 5503,1x + 7823,6 | 0,9997 |
| (–)-epikate-chinas | 2,28 | 7,19 | 1,42 | 4,39 | 5 – 550 | y= 4484,2x  + 1193,7 | 0,9988 |
| Epigalokate-chino galatas | 2,12 | 5,37 | 1,89 | 5,03 | 5 – 260 | y = 10190,0x – 6715,2 | 0,9991 |

a aptikimo riba; b nustatymo riba; c pakartojamumas; d atkuriamumas.

ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėlinių metodų specifiškumas buvo įvertintas identifikacijos testu atskiriant aktyvius junginius. Chromoforinio ABTS radikalo-katijono ir tam tikro atskirto aktyvaus junginio reakcijos metu sumažėja tirpalo spalvos intensyvumas. Fiksuojamas absorbcijos sumažėjimas matomų bangų spektre kaip neigiama smailė, kas patvirtina radikalų surišėjo savybes.

Fe(III)–tripyridyltriazino komplekso reakcijos su antioksidantiškai akty­viu junginiu metu susiformuoja mėlynos spalvos dvivalentės geležies che­latas (Fe(II)-TPTZ). Fiksuojamas absorbcijos padidėjimas matomų bangų spektre ir taip patvirtinamos tiriamo junginio redukcinės savybės. Visi pasi­rinkti standartiniai junginiai pasižymėjo radikalus surišančiu ir geležies jonus redukuojančiu poveikiu.

***3.2.3.2 lentelė.*** *ESC–FRAP pokolonėlinio metodo validacijos parametrų reikšmės.*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Junginys** | **LoD**a **μM** | **LoQ**b **μM** | **Intra-day**c**, proc.** | **Inter-day**d**, proc.** | **Tiesiš-kumas, μM** | **Kalibracinė kreivė** | **R2** |
|
| Troloksas | 1,88 | 5,69 | 1,01 | 2,17 | 5 – 400 | y = 10984,1x + 18323,7 | 0,9997 |
| Chlorogeno rūgštis | 2,17 | 6,58 | 2,59 | 5,78 | 5 – 340 | y = 9165,2x  – 2426,8 | 0,9985 |
| Kavos rūgštis | 1,97 | 5,98 | 2,88 | 5,55 | 5 – 667 | y = 13244,8x – 16185,5 | 0,9978 |
| Elago rūgštis | 1,20 | 3,63 | 2,65 | 4,99 | 2,5 – 400 | y = 15987,3x + 96401,2 | 0,9982 |
| Rutinas | 1,21 | 3,66 | 0,47 | 2,10 | 2 – 160 | y = 9894,6x  – 2812,1 | 0,9999 |
| Kvercetinas | 0,91 | 2,74 | 1,60 | 3,67 | 2 – 330 | y = 14759,7x + 65949,3 | 0,9988 |
| Kvercitrinas | 1,01 | 3,07 | 0,33 | 2,41 | 2,8 – 220 | y = 11397,1x + 2638,6 | 0,9999 |
| Izokvercitrinas | 1,91 | 5,78 | 0,62 | 1,75 | 5,5 – 220 | y = 10879,4x + 5093,3 | 0,9998 |
| Hiperozidas | 1,12 | 3,40 | 0,94 | 3,12 | 2,8 – 220 | y = 14625,2x + 16564,5 | 0,9995 |
| (+)-katechinas | 1,08 | 3,26 | 0,90 | 2,58 | 2 – 410 | y = 14303,2x + 16836,9 | 0,9998 |
| (–)-epikate-chinas | 1,82 | 5,51 | 0,88 | 1,93 | 5 – 550 | y = 11355,7x + 41959,4 | 0,9998 |
| Epigalokate-chino galatas | 1,24 | 3,77 | 1,36 | 3,65 | 2,5 – 260 | y = 16987,1x – 2621,7 | 0,9996 |

a aptikimo riba; b nustatymo riba; c pakartojamumas; d atkuriamumas.

ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėlinių metodų glaudumo variacijos koeficiento reikšmės 12 antioksidantiškai aktyvių junginių pateiktos atitin­kamai 3.2.3.1 ir 3.2.3.2 lentelėse. ESC-ABTS pokolonėlinio metodo pakar­tojamumo variacijos koeficiento reikšmės įvairavo nuo 1,18 proc. (elago rūgštis) iki 3,21 proc. (kavos rūgštis), o ESC-FRAP pokolonėlinio metodo – nuo 0,33 proc. (kvercitrinas) iki 2,88 proc. (kavos rūgštis). ESC-ABTS pokolonėlinio metodo pakartojamumo variacijos koeficiento reikšmės buvo didesnės nei ESC-FRAP pokolonėlinio metodo, tačiau neviršijo 5 proc. ribos.

Metodų atkuriamumo santykinio standartinio nuokrypio (SSN) reikšmės buvo mažesnės nei 10 proc. Maksimalios SSN reikšmės nustatytos chloro­geno rūgščiai 6,84 proc. ESC-ABTS ir 5,78 proc. ESC-FRAP metodu. Gauti rezultatai abiem metodais atitinka tinkamumo kriterijus.

Bazinės linijos nestabilumas įtakoja metodo jautrumą. Didėjantis bazinės linijos triukšmas padidina metodo aptikimo ir nustatymo reikšmes. Bazinės linijos nestabilumas yra aktualus ESC-ABTS pokolonėlinio metodo aspek­tas, nes ABTS•+ tirpalas yra spalvotas. Su šia problema nesusiduriama ESC-FRAP pokolonėlinės analizės metu, kadangi Fe(III)-TPTZ kompleksas paverčiamas į spalvotą Fe(II)-TPTZ kompleksą tik po reakcijos su antioksi­dantiškai aktyviu junginiu, todėl bazinės linijos triukšmas yra nežymus.

Mažiausios aptikimo ir nustatymo ribos ESC-ABTS pokolonėliniu metodu nustatytos hiperozidui atitinkamai 1,47 µM ir 4,46 µM, kai ESC-FRAP pokolonėliniu hiperozidui atitinkamai 1,12 µM ir 3,40 µM. Mažiau­sios aptikimo (0,91 µM) ir nustatymo (2,74 µM) ribos ESC-FRAP metodu nustatytos kvercetinui, kurio LoD ir LoQ ESC-ABTS metodu buvo atitin­kamai 1,55 µM ir 4,69 µM. Skirtumai atsiranda dėl minėtos bazinės linijos nestabilumo įtakos ir individualių junginio savybių. 3.2.3.1 ir 3.2.3.2 lente­lėse pateiktos LoD ir LoQ reikšmės parodo, kad ABTS ir FRAP pokolonėli­niai metodai gali būti naudojami antioksidantiškai aktyvių junginių nusta­tymui ir kiekiniam įvertinimui pagal TEAC.

Tiesiškumas buvo įvertintas matuojant atskirų antioksidantiškai aktyvių junginių žinomų koncentracijų bandinių absorbcijos pokyčius abiem poko­lonėliniais metodais. Kiekvienas matavimas pakartotas tris kartus ir apskai­čiuoti vidurkiai panaudoti regresijos tiesės sudarymui. Tam tikrų antioksi­dantiškai aktyvių junginių didelės koncentracijos ABTS metodu netenkino tiesiškumo kriterijų. Tiesiškumo intervalas gali būti išplečiamas padidinus ABTS radikalų-katijonų koncentraciją reaktoriuje. ESC-ABTS metodikoje naudojama fiksuota ABTS•+ koncentracija (35 μM) reaktoriuje, todėl didelės aktyvių junginių koncentracijos pasiekia nustatymo ribą.

Sudarytos visų 12 abiem pokolonėliniais metodais tirtų antioksidantiškai aktyvių junginių statistiškai patikimos (p<0,05) regresijos tiesės, kurių determinacijos koeficientai viršijo 0,99. Nustatyti ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėliniais metodais tirtų standartinių junginių tiesiškumo intervalai. Duomenys pateikti 3.2.3.1 ir 3.2.3.2 lentelėse.

# 3.3. Fenolinių junginių antioksidantinių savybių įvertinimas ESC pokolonėliniais metodais

Fenoliniai junginiai yra didžiausia junginių grupė augaluose, pasižyminti antioksidantinėmis savybėmis. Tikslinga įvertinti atskirų fenolinių junginių efektyvumą inaktyvuoti laisvuosius radikalus ar redukuoti prooksidantus, lyginant su etaloniniu antioksidantu troloksu.

Atlikti pasirinktų standartinių fenolinių junginių antioksidantinio akty­vumo tyrimai ESC-DPPH, ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėliniais meto­dais. Antioksidantinio efektyvumo išraiškai apskaičiuotos Kolevos ir kt. [124] pasiūlytos santykinės TEACS reikšmės, kurios pagal kalibracinių kreivių nuolydžius nurodo kiek kartų tiriamas junginys yra aktyvesnis už troloksą. Įvairių mokslinių tyrimų duomenimis augalinių junginių antioksi­dantinis aktyvumas priklauso nuo pH [54, 58, 123, 135]. Lemanska ir kt. [135] nustatė, kad ABTS radikalų-katijonų surišimo geba didėja didėjant terpės pH. Siekiant išsamiai palyginti standartinių fenolinių junginių anti­oksidantines savybes, ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėliniai tyrimai atlikti identiškomis sąlygomis, esant vienodam terpės pH (3,6). ESC-DPPH pokolonėlinėje sistemoje terpės pH siekė apie 6, o reakcijos mišinio užlai­kymo trukmė buvo apie 0,5 min.

***3.3.1 lentelė.*** *Standartinių fenolinių junginių santykinės TEACS reikšmės gautos optimizuotais ir validuotais ESC pokolonėliniais metodais.*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Fenolinis junginys** | **DPPH TEACS** | **ABTS TEACS** | **FRAP TEACS** | **ABTS/FRAP TEACS santykis** |
|
| Troloksas | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Chlorogeno rūgštis | 0,65± 0,04 | 0,42 ± 0,03 | 0,83 ± 0,05 | 0,50 |
| Kavos rūgštis | 0,85± 0,03 | 0,83 ± 0,06 | 1,21 ± 0,06 | 0,69 |
| Elago rūgštis | – | 0,13 ± 0,01 | 1,46 ± 0,08 | 0,09 |
| Rozmarino rūgštis | 1,81± 0,07 | 1,74 ± 0,09 | – | – |
| Rutinas | 0,70± 0,04 | 0,53 ± 0,04 | 0,90 ± 0,05 | 0,58 |
| Kvercetinas | 1,50± 0,06 | 0,95 ± 0,07 | 1,34 ± 0,07 | 0,71 |
| Kvercitrinas | – | 0,31 ± 0,01 | 1,04 ± 0,06 | 0,30 |
| Izokvercitrinas | – | 0,53 ± 0,02 | 0,99 ± 0,04 | 0,54 |
| Hiperozidas | 0,92± 0,04 | 0,71 ± 0,04 | 1,33 ± 0,06 | 0,54 |
| (+)-katechinas | – | 0,81 ± 0,05 | 1,30 ± 0,05 | 0,62 |
| (-)-epikatechinas | – | 0,66 ± 0,03 | 1,03 ± 0,05 | 0,64 |
| Epigalokatechino galatas | – | 1,50 ± 0,07 | 1,55 ± 0,08 | 0,97 |

Įvertinus ESC-DPPH, ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėliniais meto­dais gautas standartinių fenolinių junginių TEACs reikšmes, nustatytas skir­tingas fenolinių rūgščių, flavonolių ir flavanolių darinių antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas (3.3.1 lentelė). Kadangi ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėliniai tyrimai atlikti identiškomis sąlygomis, buvo apskaičiuoti ABTS/FRAP TEACS santykiai. Jei tiriamo junginio ABTS/FRAP TEACS santykis mažesnis už vienetą, tuomet labiau išreikštos redukcinės savybės, jei didesnis už vienetą – labiau išreikštos antiradikalinės savybės. Atliktų tyrimų duomenimis visi standartiniai fenoliniai junginiai labiau pasižymėjo redukcinėmis savybėmis, išskyrus epigalokatechino galatą, kuriam statistiš­kai patikimo skirtumo tarp antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo nenusta­tyta (p>0,05) (3.3.1 lentelė).

Tarp tirtų fenolinių rūgščių elago rūgštis silpniausiai suriša laisvuosius radikalus (TEACS 0,13±0,01), tačiau pasižymi didele redukcine galia (TEACS 1,46±0,08). Literatūroje nepateikta elago rūgšties TEACS duomenų pokolonėlinėse sistemose su ABTS ir FRAP reagentais. Moksliniuose tyri­muose dažniausiai vertinamos koreliacijos tarp elago rūgšties kiekio ir augalinio ekstrakto antioksidantinio aktyvumo [1, 37, 148, 156].

Hidroksicinamono rūgštys pagal antioksidantinį aktyvumą, nustatytą ESC pokolonėliniais metodais, išsidėsto sekančia eile: rozmarino rūgštis > kavos rūgštis > chlorogeno rūgštis. Įvertinus kavos ir chlorogeno rūgščių ABTS/FRAP TEACS santykius (atitinkamai 0,69 ir 0,50) galima teigti, kad labiau išreikštos šių junginių redukcinės savybės. Rozmarino rūgštis pasi­žymi stipriu antiradikaliniu aktyvumu, kurį lemia dvi *orto*-dihidroksi funk­cinės grupės molekulėje. Rozmarino ir kavos rūgščių TEACs reikšmės gautos ESC-DPPH ir ESC-ABTS pokolonėliniais metodais statistiškai pati­kimai nesiskiria. Tačiau chlorogeno rūgšties ESC-DPPH sistemoje TEACS reikšmė (0,65±0,04) yra didesnė nei ESC-ABTS sistemoje (0,42±0,03). Ta pati tendencija pastebėta ir tirtų flavonolių (kvercetino, rutino ir hiperozido) atveju (3.3.1 lentelė). Tai gali būti siejama su skirtinga terpės pH ESC-DPPH (pH ~6) ir ESC-ABTS (pH 3,6) pokolonėlinėse sistemose.

Mūsų tyrimų duomenimis kvercetinas pasižymi stipresniu antiradikaliniu (TEACs 0,95±0,07) ir redukciniu (TEACs 1,34±0,07) aktyvumu nei jo dari­niai (rutinas, kvercitrinas, izokvercitrinas ir hiperozidas) (3.3.1 lentelė). Gautus tyrimų rezultatus patvirtina ir kitų mokslininkų darbai, kuriuose teigiama, kad cukrinė glikozido dalis keičia aglikono antioksidantinį akty­vumą, dažniausiai jį sumažina [169, 197]. Pagal ESC-ABTS pokolonėliniu metodu gautus rezultatus kvercetino dariniai išsidėstė tokia tvarka: kverceti­nas > hiperozidas > rutinas ≈ izokvercitrinas > kvercitrinas. Stipriausiu lais­vuosius radikalus surišančiu aktyvumu pasižymėjo kvercetinas, silpniausiu – kvercitrinas. Pagal redukcinį aktyvumą minėtų junginių išsidėstymas nežymiai skiriasi: kvercetinas > hiperozidas > kvercitrinas > izokvercitrinas > rutinas. Nustatyta, kad kvercetino-3-O-galaktozidas (hiperozidas) yra aktyviausias tirtas flavonolių glikozidas. Kitų kvercetino darinių antioksi­dantinį aktyvumą mažino gliukozės, ramnozės ir rutinozės cukrinės dalys. Ramnozė suteikia stipresnes redukcines savybes nei rutinozė. Izokvercitri­nui ir hiperozidui nustatytas vienodas ABTS/FRAP TEACS santykis (0,54), bet gautos skirtingos TEACS reikšmės ESC-ABTS (atitinkamai 0,53±0,02 ir 0,71±0,04) ir ESC-FRAP (atitinkamai 0,99±0,04 ir 1,33±0,06) pokolonėli­niais metodais. Šis santykis parodo, kad abiejų glikozidų antiradikalinės ir redukcinės savybės yra proporcingos. ESC-DPPH pokolonėlinėje sistemoje kvercetinas taip pat pasižymėjo didesniu antiradikaliniu aktyvumu nei jo glikozidai. Antioksidantinės kvercetino savybės patvirtintos daugelyje mokslinių tyrimų [48, 100, 112, 239] ir nustatytas jo struktūros-aktyvumo ryšys [239]. Flavonolių turinčių katecholo grupę stiprus antioksidantinis aktyvumas gali būti siejamas su bielektronine oksidacija, kurios metu susi­formuoja dvi labai stabilios chinoninės struktūros [67].

Eksperimentinių tyrimų metu nustatyta, kad flavanolio epigalokatechino galato antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas yra panašus (TEACS atitin­kamai 1,50±0,07 ir 1,55±0,08). Jo molekulės B žiedo 3, 4 ir 5 padėtyse yra trys hidroksilo funkcinės grupės bei C žiedo 3 padėtyje prijungta galo rūgš­ties liekana. Flavonoidų gebėjimą surišti laisvuosius radikalus lemia hidro­ksilo grupių kiekis ir jų padėtis aromatiniuose žieduose [168, 224]. Katechi­nui ir epikatechinui nustatytos mažesnės TEACs reikšmės nei kvercetinui abiejose ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėlinėse sistemose, nors šie jun­giniai turi vienodą hidroksilo grupių skaičių molekulėse. Tačiau flavanolių struktūroje nėra 2,3–dvigubos jungties būdingos flavonoliams. 2,3-dviguba jungtis konjuguota su 4-okso grupe C žiede bei aromatiniuose žieduose esančios hidroksilo grupės yra reikalingos antioksidantiniam flavonoidų aktyvumui [107, 112]. Šie struktūros ypatumai yra būtini antiradikaliniam ir redukciniam poveikiui [67].

Apibendrinant tyrimų rezultatus nustatyta, kad aktyviausiai laisvuosius radikalus suriša rozmarino rūgštis. Epigalokatechino galatas pasižymėjo stipriausiomis redukcinėmis savybėmis. Elago rūgšties ABTS/FRAP TEACS santykis yra mažiausias (0,09), patvirtinantis ženkliai stipresnį (apie 11 kartų) redukcinį aktyvumą nei antiradikalinį.

# 3.4. ESC pokolonėlinių metodų taikymas augalinių žaliavų bei jų preparatų antioksidantų sudėties ir aktyvumo įvertinimui

## 3.4.1. Gudobelių augalinių žaliavų ir preparatų tyrimas

Gudobelių (*Crataegus*) vaistinė augalinė žaliava, aprašoma daugelyje farmakopėjų [62, 63], yra gudobelių žiedai ir lapai (*Crateaegi folium cum flore*) bei vaisiai (*Crataegi fructus*). Gudobelių preparatus rekomenduojama vartoti kaip širdį tonizuojančią priemonę, esant funkciniams širdies veiklos sutrikimams bei persirgus sunkiomis širdies veiklą sutrikdžiusiomis ligomis, padidėjus kraujospūdžiui [234]. Europos šalyse vaistinė augalinė žaliava dažniausiai renkama nuo *Crataegus monogyna* Jacq., *C. rhipidophylla* ir *C. laevigata* [108]. *C. monogyna* žaliavose nustatyti įvairūs flavonoidai ir jų glikozidai: viteksinas, viteksin-2”-O-ramnozidas, izoviteksinas, orientinas, hiperozidas, rutinas, epikatechinas ir oligomeriniai procianidinai (katechino ir epikatechino įvairaus laipsnio polimerai) [39]. Literatūros šaltiniuose gausu duomenų apie flavonoidų (ir procianidinų) antioksidantines savybes [89, 234]. Kardioprotekcinis flavonoidų veikimas siejamas ne tiks su vaini­kinių kraujagyslių spindžio didinimu, trombų formavimosi slopinimu, cho­lesterolio ir mažo tankio lipoproteinų koncentracijos kraujo plazmoje maži­nimu, bet ir minėtų junginių oksidacijos slopinimu, oksidacinio streso maži­nimu kardiomiocituose [108].

Atliktas gudobelių žiedų ir lapų augalinės žaliavos etanolinių ekstraktų bei fitopreparatų „Gudobelių skystasis ekstraktas Valentis“ ir „*Gudobelių* tinktūra Valentis“ biologiškai aktyvių junginių tyrimas ESC-DPPH pokolo­nėliniu metodu (3.4.1.1 pav.). Identifikuoti 5 fenoliniai junginiai: chloro­geno rūgštis, (-)-epikatechinas, viteksin-2”-O-ramnozidas, rutinas ir hipero­zidas.

Fitopreparatų „Gudobelių skystasis ekstraktas Valentis“ ir „Gudobelių tinktūra Valentis“ gamybai naudota gudobelių vaisių vaistinė augalinė žaliava ir 70 proc. (v/v) etanolis, kurių santykis atitinkamai 1:1 ir 1:10. ESC-DPPH pokolonėliniu metodu kiekiškai įvertintas antiradikalinis akty­vumas išreikštas TEAC μmol bendram fitopreparato tūriui (25 ml).

Nustatyta, kad didžiausias TEAC reikšmes turėjo chlorogeno rūgštis (3.4.1.1 lentelė), kuri identifikuota visuose tirtuose ekstraktuose ir fitoprepa­ratuose. Gudobelių žieduose ir lapuose chlorogeno rūgšties TEAC atitinka­mai yra 21,98 ir 8,16 μmol/g. Tai lemia apie 29 proc. bendro antiradikalinio žaliavos aktyvumo (3.4.1.2 pav.). Chlorogeno rūgšties indėlis į bendrą fito­preparatų antiradikalinį aktyvumą siekė nuo 34 proc. („Gudobelių tinktūra Valentis“) iki 39 proc. („Gudobelių skystasis ekstraktas Valentis“) (3.4.1.2 pav.).

galutine gudobeliu ir ju preparatu chromatografija maza numeracija zodziai.TIF

520 nm

520 nm

520 nm

520 nm

Sulaikymo trukmė, min

290 nm

290 nm

290 nm

**Žiedai**

290 nm

**Lapai**

**Tinktūra**

**Ekstraktas**

Absorbcija, AV

***3.4.1.1 pav.*** *C. monogyna lapų ir žiedų ėminių bei fitopreparatų „Gudobelių skystasis ekstraktas Valentis“ ir „Gudobelių tinktūra Valentis“ UV-DPPH chromatogramos.*

Analičių smailės: 1 – chlorogeno rūgštis; 2 – (-)-epikatechinas; 3 – viteksin-2”-O-ramnozidas; 4 – rutinas; 5 – hiperozidas.

Gudobelių žiedų ir abiejų fitopreparatų chromatogramose hiperozidas yra dominuojanti smailė. Tačiau jis lėmė vidutiniškai tik apie 13 proc. bendro minėtų pavyzdžių antiradikalinio aktyvumo. Didžiausia hiperozido TEAC reikšmė nustatyta gudobelių žiedų žaliavoje (12,60 μmol/g). Rutino TEAC reikšmės įvairavo nuo 0,15 μmol/g iki 1,82 μmol/g (3.4.1.1 lentelė).

Nustatyta, kad gudobelių lapų bandinio UV chromatogramoje dominuo­janti smailė viteksin-2”-O-ramnozidas nepasižymi antiradikalinėmis savy­bėmis (3.4.1.1 pav.).

Gudobelių žiedai (TEAC 75,81 μmol/g) pasižymi stipresniu antiradikali-niu aktyvumu nei lapai (TEAC 28,19 μmol/g). Žiedų ėminiuose identifi­kuoti fenoliniai junginiai sudarė apie 58 proc. bendro DPPH radikalų suri­šimo aktyvumo, lapuose – apie 64 proc. Svarbiausi laisvuosius radikalus surišantys junginiai yra chlorogeno rūgštis ir hiperozidas (3.4.1.1 lentelė).

***3.4.1.1 lentelė.*** *C. monogyna lapų ir žiedų ėminiuose bei fitopreparatuose „Gudobelių skystasis ekstraktas Valentis“ ir „Gudobelių tinktūra Valentis“ esančių individualių junginių antiradikalinis aktyvumas.*

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr.** | **Junginys** | **ST**a **min** | **TEACDPPH, μmol/g** | | **TEACDPPH, μmol/25 ml** | |
| *Lapai* | *Žiedai* | *Ekstraktas* | *Tinktūra* |
| - | Neidentifikuota | 7,83 | 0,85 | 3,38 | 12,03 | 0,42 |
| - | Neidentifikuota | 8,65 | 1,53 | 4,11 | - | 0,31 |
| - | Neidentifikuota | 12,65 | 0,52 | 1,90 | 4,29 | 0,30 |
| - | Neidentifikuota | 13,85 | 3,54 | 10,89 | 11,19 | 1,75 |
| 1 | Chlorogeno rūgštis | 15,08 | 8,16 | 21,98 | 32,48 | 3,07 |
| 2 | Epikatechinas | 17,14 | 1,01 | 1,07 | - | - |
| 3 | Viteksin-2”-O-ramnozidas | 22,57 | - | - | - | - |
| - | Neidentifikuota | 23,95 | - | 6,67 | - | - |
| 4 | Rutinas | 25,87 | 1,37 | 1,17 | 1,82 | 0,15 |
| 5 | Hiperozidas | 26,83 | 3,69 | 12,60 | 9,19 | 1,02 |
| - | Neidentifikuota | 28,50 | 0,54 | 0,60 | - | - |
| - | Neidentifikuota | 29,24 | 0,78 | 1,05 | - | - |
| - | Neidentifikuota | 30,84 | 2,52 | 3,63 | 1,15 | 0,09 |
| **Įvertintų junginių bendras:** | | | **28,19** | **75,81** | **83,52** | **9,11** |

a sulaikymo trukmė.

***3.4.1.2 pav.*** *C. monogyna lapų ir žiedų ėminiuose bei fitopreparatuose „Gudobelių skystasis ekstraktas Valentis“ ir „Gudobelių tinktūra Valentis“ esančių individualių junginių antiradikalinio aktyvumo procentinės dalies įvairavimas.*

Fitopreparato „Gudobelių skystasis ekstraktas Valentis“ bendro antiradi­kalinio aktyvumo TEAC siekia 83,52 μmol/25 ml, tuo tarpu „Gudobelių tinktūra Valentis“ TEAC yra tik 9,11 μmol/25 ml. Nustatyta, kad fitoprepa­ratų atskirų identifikuotų junginių TEAC reikšmės vidutiniškai skyrėsi apie 10 kartų. Taip yra dėl fitopreparatų „Gudobelių skystasis ekstraktas Valen­tis“ ir „Gudobelių tinktūra Valentis“ koncentracijų skirtumo. Stipriausiomis antiradikalinėmis savybėmis pasižymėjo chlorogeno rūgštis ir hiperozidas (3.4.1.1 lentelė).

Apibendrinant reikia pažymėti, kad pagrindiniai identifikuoti fenoliniai junginiai lemiantys nuo 42 iki 50 proc. visų tirtų gudobelių ėminių ir fito­prepratų antiradikalinio aktyvumo yra chlorogeno rūgštis ir hiperozidas. Gudobelių žaliavų radikalų surišimo aktyvumas siejamas su šių junginių kiekiais ir kitų mokslininkų tyrimuose [16, 17]. Chlorogeno rūgštis ir hipe­rozidas galėtų būti gudobelių žaliavų ir jos preparatų antiradikalinio akty­vumo vertinimo žymenys.

## 3.4.2. Paprastųjų raudonėlių augalinių žaliavų tyrimas

Paprastųjų raudonėlių (*Origanum vulgare* L.) vaistinė augalinė žaliava yra žolė (*Origani vulgaris herba*). Paprastasis raudonėlis pasižymi antimi­krobiniu [45], priešuždegiminiu [103], raminamuoju ir skausmą mažinančiu poveikiu [99]. Skatina virškinimo ir bronchų liaukų sekreciją, didina žar­nyno peristaltiką, pakelia jo tonusą [99]. Minėtus farmakologinius poveikius lemia *O. vulgare* vaistinėje augalinėje žaliavoje esantys eteriniai aliejai ir fenoliniai junginiai (rozmarino rūgštis, rutinas, hiperozidas, liuteolinas, kvercetinas, naringeninas, diosmetinas ir kt.). Dominuojantis junginys yra rozmarino rūgštis, kuriam būdingas stiprus antioksidantinis aktyvumas [193].

ESC-DPPH pokolonėliniu metodu atlikti raudonėlių vaistinės augalinės žaliavos žolės bei atskirų augalo organų lapų ir stiebų antiradikalinio akty­vumo tyrimai. Raudonėlių žolės, lapų ir stiebų pavyzdžiuose identifikuoti šie DPPH radikalus surišantys junginiai: viteksinas, rutinas, hiperozidas ir rozmarino rūgštis (3.4.2.1 pav.). Nustatyta, kad *O. vulgare* žolės etanoli­niame ekstrakte didžiausiu antiradikaliniu aktyvumu pasižymi rozmarino rūgštis (TEAC 20,04 μmol/g) ir neidentifikuotas junginys (TEAC 19,28 μmol/g), kurio sulaikymo trukmė yra 23,03 min (3.4.2.1 pav.). Žolėje esan­čių junginių TEAC reikšmės pateiktos 3.4.2.1 lentelėje.

raudonelio zole_mazas_sutvarkytas.TIF

Sulaikymo trukmė, min

520 nm

290 nm

Absorbcija, AV

**Žolė**

Raudonelio lapai_mazas_sutvarkytas.TIFraudonelio stiebai_mazas_sutvarkytas.TIF

520 nm

520 nm

290 nm

290 nm

**Stiebai**

**Lapai**

Absorbcija, AV

Absorbcija, AV

Sulaikymo trukmė, min

Sulaikymo trukmė, min

***3.4.2.1 pav.*** *O. vulgare žolės, lapų ir stiebų ėminių UV-DPPH chromatogramos.*

Analičių smailės: 1 – viteksinas; 2 – rutinas; 3 – hiperozidas; 4 – rozmarino rūgštis.

Paprastųjų raudonėlių lapų ir stiebų etanoliniuose ekstraktuose nustatyta, kad dominuojantis radikalus surišantis junginys yra rozmarino rūgštis (3.4.2.1 lentelė), lemianti apie 35 proc. bendro antiradikalinio aktyvumo (3.4.2.2 pav.). Stipriausiai DPPH radikalus suriša *O. vulgare* lapų ekstraktas, kurio bendras TEAC yra 60,70 μmol/g. Mažiausias (p<0,05) antiradikalinis aktyvumas nustatytas raudonėlių stiebų pavyzdžiuose (TEAC 11,85 μmol/g).

Nustatyta, kad identifikuoti radikalus surišantys junginiai pagal indėlį į bendrą pavyzdžio antiradikalinį aktyvumą išsidėsto eile: rozmarino rūgštis > hiperozidas > rutinas > viteksinas (3.4.2.2 pav.). Kvercetino dariniai hipero­zidas ir rutinas lemia 16 proc. lapų ir 22 proc. žolės ėminių antiradikalinio aktyvumo. Mažiausiu antiradikaliniu aktyvumu *O. vulgare* lapų ir žolės ekstraktuose pasižymėjo flavono apigenino darinys viteksinas (TEAC ati­tinkamai 0,75 μmol/g ir 0,50 μmol/g). Didesnę radikalų surišimo gebą flavonoliuose lemia katecholio grupė B žiede, kuri turi elektronų donorinių savybių [107, 112]. Stiebų antiradikalinį aktyvumą ženkliai įtakoja neidenti­fikuotas junginys (~29 proc.), kurio sulaikymo trukmė yra 32,17 min (3.4.2.1 pav.). Šis junginys nenustatytas *O.vulgare* lapuose.

***3.4.2.1 lentelė.*** *O. vulgare žolės, lapų ir stiebų ėminiuose esančių individualių junginių antiradikalinis aktyvumas.*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr.** | **Junginys** | **ST**a  **min** | **TEACDPPH, μmol/g** | | |
| *Žolė* | *Lapai* | *Stiebai* |
| - | Neidentifikuota | 21,80 | - | 8,81 | 0,19 |
| - | Neidentifikuota | 23,03 | 19,28 | 15,39 | 1,37 |
| 1 | Viteksinas | 25,36 | 0,50 | 0,74 | 0,34 |
| - | Neidentifikuota | 25,96 | - | 1,11 | - |
| 2 | Rutinas | 27,01 | 4,39 | 3,70 | 0,66 |
| 3 | Hiperozidas | 28,13 | 8,01 | 6,11 | 0,65 |
| 4 | Rozmarino rūgštis | 29,64 | 20,04 | 21,95 | 4,11 |
| - | Neidentifikuota | 30,96 | 1,53 | - | 0,65 |
| - | Neidentifikuota | 32,17 | 0,47 | - | 3,46 |
| - | Neidentifikuota | 33,62 | 0,71 | - | - |
|  | Neidentifikuota | 35,71 | 1,16 | 1,69 | 0,01 |
| **Įvertintų junginių bendras:** | | | **58,31** | **60,70** | **11,85** |

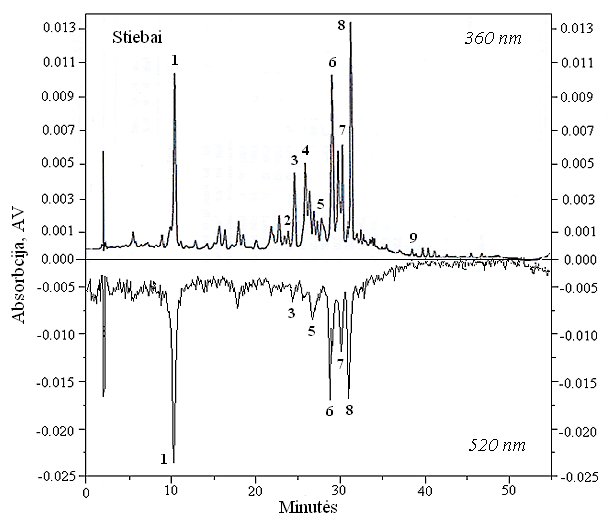
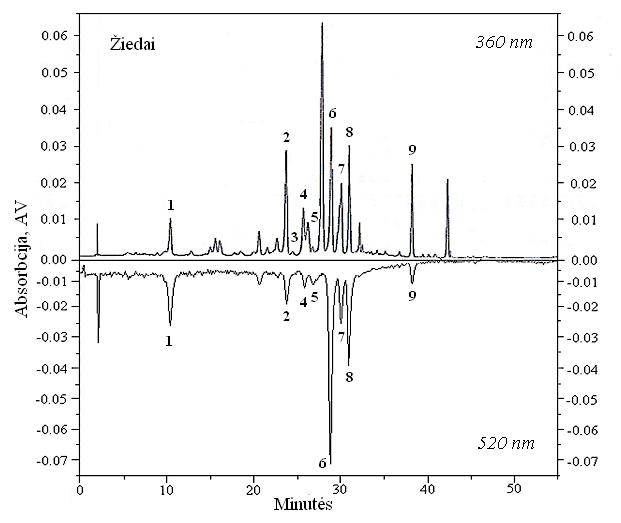
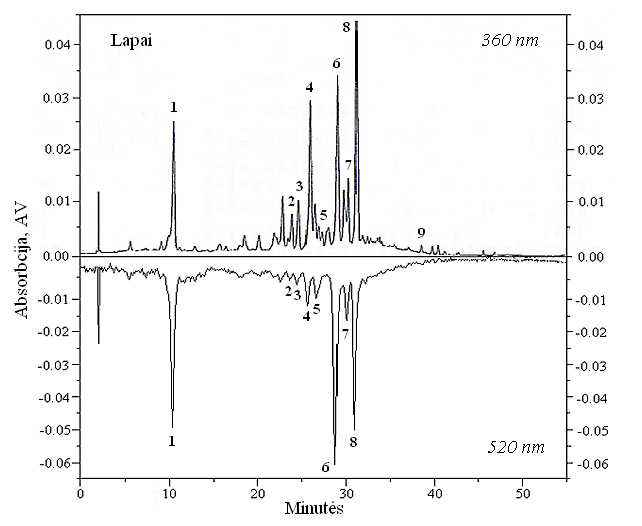
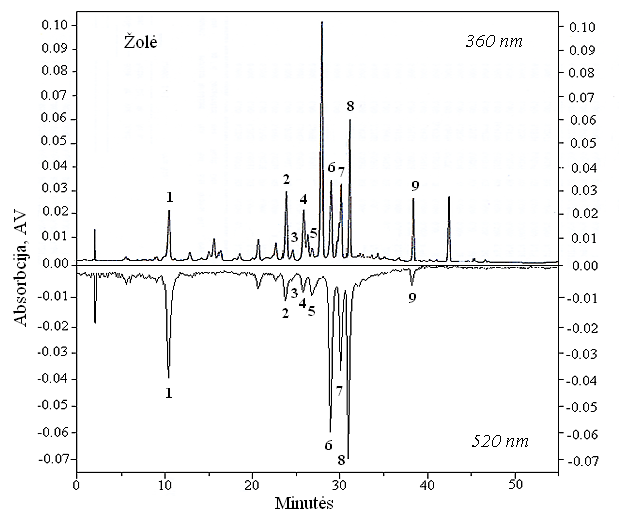
a sulaikymo trukmė.

***3.4.2.2 pav.*** *O. vulgare žolės, lapų ir stiebų ėminiuose esančių individualių junginių antiradikalinio aktyvumo procentinės dalies įvairavimas.*

Visuose tirtuose raudonėlių ekstraktuose vidutiniškai apie 35 proc. anti­radikalinio aktyvumo lemia rozmarino rūgštis. *Lamiaceae* šeimos augalai, kuriuose nustatytas didelis rozmarino rūgšties kiekis, pasižymi labai stipriu radikalus surišančiu poveikiu [209]. Apibendrinant tyrimų rezultatus, nustatyta, jog raudonėlių žaliavų ir jų preparatų antiradikalinio aktyvumo vertinimo žymeniu būtų tikslinga pasirinkti rozmarino rūgštį.

## 3.4.3. Kraujažolės genties rūšių augalinių žaliavų tyrimas

Kraujažolių (*Achillea*) vaistinė augalinė žaliava yra žolė (*Millefolii herba*) ir žiedai (*Millefolii flos*) [63]. Kraujažolių žolė ir žiedai vartojami kaip kraujavimą stabdanti bei žaizdų gijimą skatinanti priemonė. Literatū­roje aprašomas priešuždegiminis, analgetinis, antipiretinis ir spazmolitinis kraujažolių žaliavų poveikiai [30]. Jos preparatais gydomas gastritas, skran­džio ir žarnyno opaligės [30]. Kraujažolių vaistinėje augalinėje žaliavoje nustatyti kartumynai, eteriniai aliejai (borneolis, achilicinas), alkaloidai (cholinas, achileinas) ir fenoliniai junginiai (chlorogeno rūgštis, dikafeil­chino (DCQA) rūgštys, viceninas-2, liuteolinas, liuteolin-7-gliukozidas, liuteolin-3‘,7-digliukozidas, apigeninas, apigenin-7-gliukozidas, rutinas) [27, 30, 44].



*10*

*10*

Sulaikymotrukmė, min

520 nm

520 nm

520 nm

520 nm

360 nm

360 nm

360 nm

360 nm

**Lapai**

**Žolė**

**Žiedai**

**Stiebai**

Absorbcija, AV

Absorbcija**,** AV

Absorbcija, AV

Absorbcija, AV

Sulaikymo trukmė, min

Sulaikymo trukmė, min

Sulaikymo trukmė, min

***3.4.3.1 pav.*** *A. millefolium žolės, lapų, žiedų ir stiebų ėminių UV-DPPH chromatogramos.*

Analičių smailės: 1 – chlorogeno rūgštis; 2 – liuteolin-7-O-gliukozidas; 3 – rutinas; 4 – liuteolin-7-O-gliukuronidas; 5 – 3,4-di-O-dikafeilchino rūgštis (3,4-DCQA); 6 – 3,5-DCQA; 7 – 1,5-DCQA; 8 – 4,5-DCQA; 9 – liuteolinas; 10 – apigeninas.

ESC-DPPH pokolonėlinis metodas pritaikytas Lietuvoje natūraliai augančių bei introdukuotų *Achillea* genties rūšių augalinėse žaliavose esančių antiradikalinėmis savybėmis pasižyminčių junginių nustatymui ir įvertinimui.

Paprastųjų kraujažolių (*A. millefolium*) žolės bei atskirų augalo organų lapų, stiebų ir žiedų žaliavose identifikuoti antiradikalinėmis savybėmis pasižymintys junginiai: chlorogeno rūgštis, liuteolin-7-O-gliukozidas, ruti­nas, liuteolin-7-O-gliukuronidas, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA, 1,5-DCQA, 4,5-DCQA ir liuteolinas (3.4.3.1 pav.). *A. millefolium* augalinių žaliavų eks­traktuose esančių atskirų junginių antiradikalinio aktyvumo TEAC reikšmės pateiktos 3.4.3.1 lentelėje. Nustatyta, kad didžiausiu antiradikaliniu akty­vumu pasižymėjo mono- ir dikafeilchino rūgštys (3,5-DCQA, chlorogeno rūgštis ir 4,5-DCQA). Augaluose jos sintetinamos kaip atsakas į oksidacinį stresą [163]. Hung ir kt. [98] nustatė, kad 3,4-DCQA, 3,5-DCQA ir 4,5-DCQA pasižymi stipresnėmis antiradikalinėmis savybėmis nei kavos rūgštis ar sintetinis antioksidantas butilintas hidroksitoluenas (BHT).

***3.4.3.1 lentelė.*** *A. millefolium žolės, lapų, žiedų ir stiebų ėminiuose esančių individualių junginių antiradikalinis aktyvumas.*

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr.** | **Junginys** | **ST**a **min** | **TEACDPPH, μmol/g** | | | |
| *Žolė* | *Lapai* | *Žiedai* | *Stiebai* |
| 1 | Chlorogeno rūgštis | 10,40 | 21,08 | 23,93 | 9,69 | 10,67 |
| - | Neidentifikuota | 20,65 | 3,26 | - | 2,58 | - |
| - | Neidentifikuota | 22,67 | 1,82 | 2,14 | 1,34 | - |
| 2 | Liuteolin-7-O-gliukozidas | 23,72 | 6,06 | 1,71 | 5,17 | - |
| 3 | Rutinas | 24,46 | 1,86 | 2,57 | - | 1,45 |
| 4 | Liuteolin-7-O-gliukuronidas | 25,75 | 3,41 | 5,31 | 2,50 | - |
| 5 | 3,4-DCQA | 26,76 | 5,71 | 4,86 | 2,66 | 2,25 |
| 6 | 3,5-DCQA | 28,88 | 26,61 | 26,00 | 28,86 | 5,01 |
| 7 | 1,5-DCQA | 30,07 | 15,10 | 6,48 | 8,00 | 3,35 |
| 8 | 4,5-DCQA | 30,92 | 26,24 | 18,64 | 12,93 | 5,59 |
| - | Neidentifikuota | 32,08 | 1,85 | 1,37 | 1,08 | - |
| 9 | Liuteolinas | 38,20 | 3,39 | - | 3,46 | - |
| **Įvertintų junginių bendras:** | | | **116,38** | **93,01** | **78,27** | **28,33** |

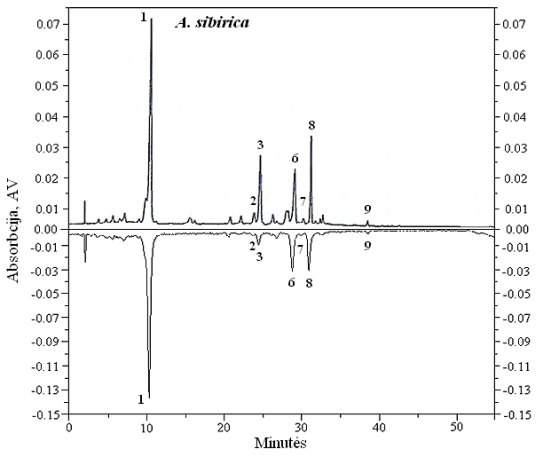
a sulaikymo trukmė.

***3.4.3.2 pav.*** *A. millefolium žolės, lapų, žiedų ir stiebų ėminiuose esančių individualių junginių antiradikalinio aktyvumo procentinės dalies įvairavimas.*

Pastaba: skaičiai grafike atitinka 3.4.3.1 lentelėje pateiktus junginius.

Atskirų *A. millefolium* augalo organų lapų, žiedų, stiebų bei vaistinės augalinės žaliavos žolės ekstraktuose antiradikalinis aktyvumas įvairuoja (3.4.3.2 pav.). Visų tirtų paprastųjų kraujažolių pavyzdžių antiradikalinį poveikį labiausiai (p<0,05) lemia kafeoilchino rūgščių dariniai – nuo 80 proc. žiedų iki 95 proc. stiebų ekstraktų bendro antiradikalinio aktyvumo (3.4.3.2 pav.). Patikimai didžiausios (p<0,05) kafeoilchino rūgčių suminės TEAC reikšmės nustatytos lapų (TEAC 79,91 μmol/g) ir žolės (TEAC 94,72 μmol/g) ekstraktuose. Liuteolino dariniai vidutiniškai lemia apie 11 proc. žiedų, lapų ir žolės pavyzdžių antiradikalinio aktyvumo, tačiau jie nenusta­tyti stiebų žaliavoje. Mažiausią indėlį į antiradikalinį aktyvumą (p<0,05) turėjo rutinas, kuris lemia iki 5 proc. stiebų aktyvumo, tuo tarpu žieduose šis flavonoidas nenustatytas. Literatūroje nurodoma, kad apigenino kiekis kraujažolės žieduose įvairuoja nuo 0,34 iki 2,56 mg/g [27]. Jis identifikuotas žolės ir žiedų UV chromatogramose (3.4.3.1 pav). Tačiau ESC-DPPH pokolonėliniu metodu nustatyta, kad apigeninas neturi radikalus surišančių savybių. Neidentifikuoti junginiai visuose *A. millefolium* ekstraktuose lemia vidutiniškai tik apie 5 proc. bendro antiradikalinio aktyvumo.

Apibendrinant tyrimų rezultatus nustatyta, kad stipriausiomis antiradika­linėmis savybėmis pasižymėjo *A. millefolium* žolės ir lapų ekstraktai, kurių suminės TEAC reikšmės atitinkamai yra 116,38 μmol/g ir 93,01 μmol/g. Stiebų antiradikalinis aktyvumas statistiškai patikimai mažiausias (p<0,05) tarp visų tirtų žaliavų (TEAC 28,33 μmol/g) (3.4.3.1 lentelė).



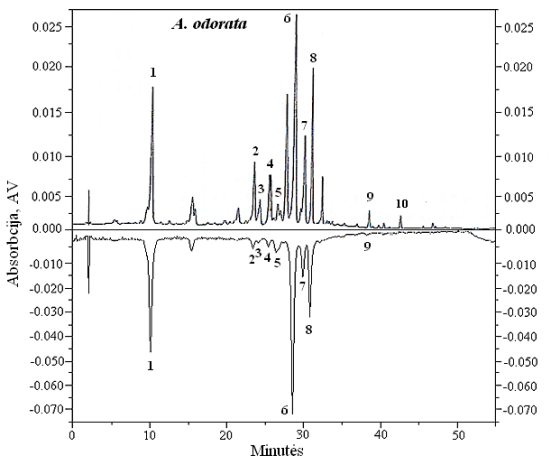
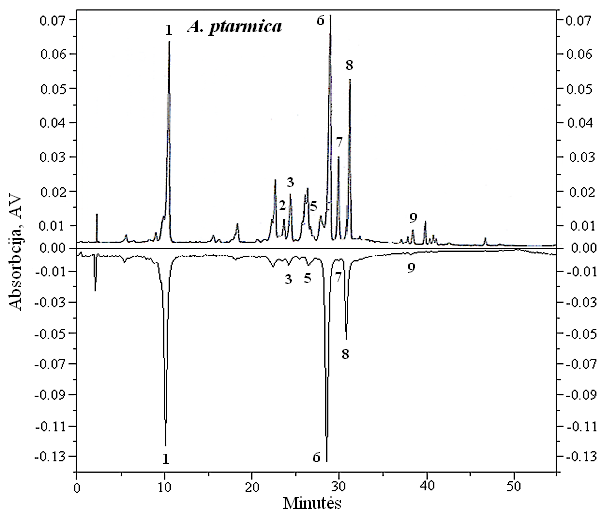
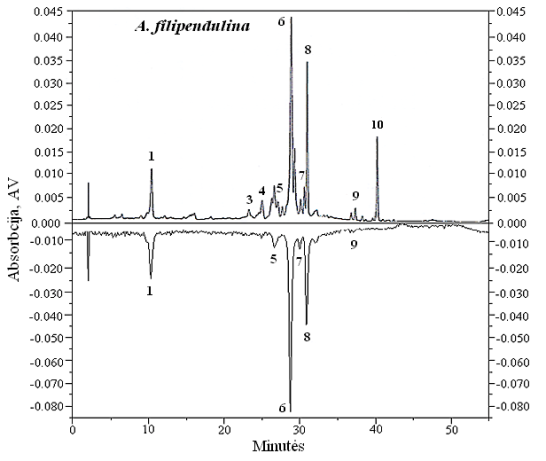
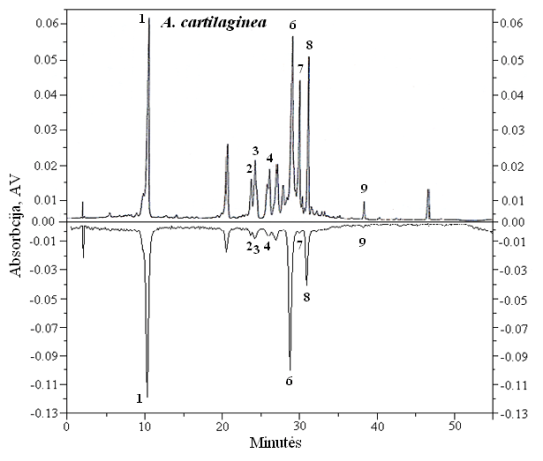
360 nm

***A. sibirica***

520 nm

Absorbcija, AV

Sulaikymo trukmė, min



***A. odorata***

Sulaikymo trukmė, min

Sulaikymo trukmė, min

Sulaikymo trukmė, min

***A. cartilaginea***

1

1

***A. ptarmica***

***A. filipendulina***

520 nm

520 nm

520 nm

520 nm

360 nm

360 nm

360 nm

360 nm

Absorbcija, AV

Absorbcija, AV

Absorbcija, AV

Absorbcija, AV

Sulaikymo trukmė, min

***3.4.3.3 pav.*** *A. sibirica, A. cartilaginea, A. filipendulina, A. ptarmica ir A. odorata žolės augalinės žaliavos UV-DPPH chromatogramos.*

Analičių smailės: 1 – chlorogeno rūgštis; 2 – liuteolin-7-O-gliukozidas; 3 – rutinas; 4 – liuteolin-7-O-gliukuronidas; 5 – 3,4-di-O-dikafeilchino rūgštis (3,4-DCQA); 6 – 3,5-DCQA; 7 – 1,5-DCQA; 8 – 4,5-DCQA; 9 – liuteolinas; 10 – apigeninas.

Atlikus Lietuvoje natūraliai augančių, tačiau retai aptinkamų *A. cartila­ginea* ir *A. ptarmica* bei introdukuotų *A. odorata*, *A. sibirica* ir *A. filipendu­lina* žolės ekstraktų antiradikalinių savybių tyrimus ESC-DPPH pokolonėli­niu metodu nustatyta, kad pagrindiniai radikalus surišantys junginiai yra kavos ir kafeoilchino rūgštys (3.4.3.3 pav.). Efektyviausiai DPPH radikalus sujungė *A. sibirica* žolės ekstraktas (TEAC 109,80 μmol/g), mažesniu akty­vumu pasižymėjo *A. odorata* (TEAC 95,93 μmol/g), *A. filipendulina* žolės antiradikalinės savybės buvo silpniausios (TEAC 73,31 μmol/g) (p<0,05) (3.4.3.2 lentelė).

Introdukuotų ir retai gamtoje aptinkamų kraujažolių antiradikalinį akty­vumą taip pat lemia kafeoilchino rūgštys: nuo 82 proc. viso *A. cartalginea* antiradikalinio aktyvumo iki 92 proc. *A. ptarmica* žolėje (3.4.3.4 pav). *A. filipendulina* žolės antiradikalinį aktyvumą sudaro tik kafeoilchino rūgštys ir neidentifikuoti junginiai (3.4.3.4 pav). Liuteolino ir rutino dariniai šioje žaliavoje nustatyti labai mažais kiekiais ir bendro antiradikalinio aktyvumo neįtakoja.

***3.4.3.2 lentelė.*** *A. sibirica, A. cartilaginea, A. filipendulina, A. ptarmica ir A. odorata žolės augalinėse žaliavose esančių individualių junginių antiradikalinis aktyvumas.*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr.** | **Junginys** | **ST**a **min** | **TEACDPPH, μmol/g** | | | | |
| *A. sibirica* | *A.carti-laginea* | *A.filipen-dulina* | *A. ptarmica* | *A. odorata* |
| 1 | Chlorogeno rūgštis | 10,40 | 70,96 | 60,31 | 11,27 | 62,62 | 25,04 |
| - | Neidentifikuota | 20,65 | 1,55 | 7,92 | - | - | - |
| - | Neidentifikuota | 22,67 | - | - | - | 4,61 | - |
| 2 | Liuteolin-7-O-gliukozidas | 23,72 | 1,57 | 2,19 | - | - | 2,53 |
| 3 | Rutinas | 24,46 | 5,07 | 4,91 | - | 3,24 | 1,76 |
| 4 | Liuteolin-7-O-gliukuronidas | 25,75 | - | 4,05 | - | - | 2,16 |
| 5 | 3,4-DCQA | 26,76 | - | - | 4,70 | 3,78 | 4,58 |
| 6 | 3,5-DCQA | 28,88 | 15,05 | 44,06 | 35,62 | 59,74 | 33,93 |
| 7 | 1,5-DCQA | 30,07 | 1,24 | 1,46 | 2,80 | 1,51 | 7,65 |
| 8 | 4,5-DCQA | 30,92 | 12,84 | 14,98 | 16,40 | 22,20 | 12,92 |
| - | Neidentifikuota | 32,08 | 1,52 | 1,25 | 2,52 | 1,58 | 1,09 |
| 9 | Liuteolinas | 38,20 | - | 1,26 | - | 1,22 | 1,09 |
| **Įvertintų junginių bendras:** | | | **109,80** | **147,61** | **73,31** | **162,37** | **95,93** |

a sulaikymo trukmė.

***3.4.3.4 pav.*** *A. sibirica, A. cartilaginea, A. filipendulina, A. ptarmica ir A. odorata žolės augalinėse žaliavose esančių individualių junginių antiradikalinio aktyvumo procentinės dalies įvairavimas.*

Pastaba: skaičiai grafike atitinka 3.4.3.2 lentelėje pateiktus junginius.

*A. flilpendulina* žolės UV chomatogramoje identifikuota reikšminga api­genino smailė, tačiau šis junginys neturi antiradikalinio aktyvumo.

Visose tirtose kraujažolių rūšyse stipriausiu aktyvumu pasižymėjo chlo­rogeno rūgštis ir 3,5-DCQA. Pagal indėlį į bendrą žaliavos antiradikalinį aktyvumą šios rūgštys išsidėstė tokia eile: chlorogeno rūgštis ≥ 3,5-DCQA > 4,5-DCQA > 1,5-DCQA ≥ 3,4-DCQA. Įvertinus kafeoilchino rūgščių įtaką atskirų kraujažolės organų antiradikaliniam aktyvumui nustatyta, kad domi­nuojantis radikalų surišėjas žiedų, lapų ir žolės bandiniuose buvo 3,5-DCQA, tuo tarpu stiebuose dominavo chlorogeno rūštis, lemianti ~38 proc. bendro aktyvumo. Tarp identifikuotų flavonoidų laisvuosius radikalus suriša rutinas, liuteolin-7-O-gliukozidas, liuteolin-7-O-gliukuronidas bei liuteoli­nas. Tačiau šie junginiai lemia tik iki 11 proc. bendro *Achillea* rūšių žolės aktyvumo.

Apibendrinus rezultatus galima teigti, kad tirtų *Achillea* genties augalinės žaliavos pasižymi antiradikaliniu aktyvumu, jo stiprumą lemia kafeoilchino rūgštys. Chlorogeno rūgštis ir 3,5-DCQA gali būti panaudojamos kaip žymenys vertinant kraujažolių žaliavų ir jų preparatų antiradikalinio akty­vumo rodiklius. *Achillea* genties augalinės žaliavos kokybė gali būti verti­nama pagal charakteringą kafeoilchino rūgščių išsidėstymą UV-DPPH chromatogramoje.

## 3.4.4. Perilės genties rūšių augalinių žaliavų ir preparatų tyrimas

*Perilla* L. genties rūšys– tai vienmečiai, notrelinių (*Lamiaceae* Lindl.) šeimos žoliniai augalai. Perilių lapai (*Perilla folium*) ir vaisiai (*Perilla fructus*) aprašyti kinų farmakopėjoje [227]. Japonų farmakopėjoje nurodyta vaistinė augalinė žaliava – perilių žolė (*Perilla herba*) [106]. Perilių vaistinė augalinė žaliava ir preparatai vartojami apsinuodijus maistu, sutrikus virški­nimui, peršalimo atveju, alergijų gydymui, įeina į mišinių depresijos gydy­mui sudėtį. Eksperimentiniais tyrimais nustatyta, kad vienas pagrindinių *Lamiaceae* šeimos kaupiamų fenolinių junginių – rozmarino rūgštis pasi­žymi priešuždegiminiu, antimutageniniu ir antioksidantiniu poveikiais [183].

Lietuvos klimato sąlygomis augintų *Perilla* L. genties augalų (*P. frutes­cens*, *P. frutescens* var. *crispa* f. *viridis*, *P. ocymoides* var. *bicolorlaciniata, P. frutescens* var. *nankinensis laciniata*) lapų ekstraktų antiradikalinis akty­vumas įvertintas ESC-DPPH ir ESC-ABTS pokolonėliniais metodais. Nustatyti laisvuosius radikalus surišančiu poveikiu pasižymintys junginiai: kavos rūgštis, apigenin-7-O-kafeoilgliukozidas, liuteolin-7-O-digliukuroni­das, skutelarinas ir rozmarino rūgštis (3.4.4.1 pav.). Didžiausiu antiradikali­niu aktyvumu pasižymi *Perilla frutescens* var. *nankinensis laciniata* (PN) lapų ekstraktas, kurio TEACDPPH – 80,08 μmol/g ir TEACABTS – 80,54 μmol/g. Silpniausiai laisvuosius radikalus suriša *Perilla frutescens* var*. crispa* f. *viridis* (PC) (TEACDPPH – 47,89 μmol/g ir TEACABTS – 51,27 μmol/g). Apskaičiuotos tirtų *Perilla* L. genties augalų lapų ekstraktų atskirų junginių TEAC reikšmės, kurios pateiktos 3.4.4.1 lentelėje. Nustatyta, kad antiradikalinį aktyvumą lemia liuteolin-7-O-digliukuronidas, skutelarinas, antocianinai ir rozmarino rūgštis. PC lapų ekstrakto radikalus surišantį poveikį labiausiai įtakoja fenolinės rūgštys (77 proc.), iš kurių net 74 proc. bendro antiradikalinio aktyvumo lemia rozmarino rūgštis. Literatūros duo­menimis PCaugalinėse žaliavose nustatoma daugiausia fenolinių rūgščių lyginant su kitais *Perilla* L. genties augalais (PF, PN, PO) [36]. PF irPO žaliavų ėminių vidutiniškai 50 proc. aktyvumo lemia fenolinės rūgštys ir 40 proc. – flavonoidai. PN žaliavų ėminių antiradikalinį poveikį lemia flavo­noidai (47 proc.).

Bendras vaizdas.TIF

Absorbcija, AV

Sulaikymo trukmė, min

650 nm

650 nm

650 nm

650 nm

520 nm

520 nm

520 nm

520 nm

290 nm

290 nm

290 nm

290 nm

**PC**

**PF**

**PN**

**PO**

***3.4.4.1 pav.*** *Perilla L. rūšių ir varietetų (PF, PN, PO ir PC) žolės augalinės žaliavos UV-DPPH-ABTS chromatogramos.*

PF – *P. frutescens*, PN – *P. frutescens* var. *nankinensis laciniata*, PO – *P. ocymoides* var. *bicolorlaciniata*, PC – *P. frutescens* var. *crispa f. viridis*. Analičių smailės: 1 – kavos rūgštis; 2 – apigenin-7-O-kafeoilgliukozidas; 3 – liuteolin-7-O-digliukuronidas; 4 – apigenin-7-O-digliukuronidas; 5 – skutelarinas; 6 – antocianinai; 7 – rozmarino rūgštis.

***3.4.4.1 lentelė.*** *Perilla L. rūšių ir varietetų (PF, PN, PO ir PC) žolės augalinėse žaliavose esančių individualių junginių antiradikalinis aktyvumas.*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr.** | **Junginys** | **ST**a **min** | **TEACDPPH, μmol/g** | | | | | | | | **TEACABTS, μmol/g** | | | | | | | |
| **PF** | | **PN** | | **PO** | | **PC** | | **PF** | | **PN** | | **PO** | | **PC** | |
| 1 | Kavos rūgštis | 13,4 | 0,87 | | 0,92 | | 0,29 | | 0,89 | | 1,03 | | 1,02 | | 0,90 | | 1,34 | |
| 2 | Apigenin-7-O-kafeoilgliukozidas | 16,4 | 0,56 | | 0,38 | | 0,65 | | 0,71 | | 1,15 | | 1,14 | | 1,47 | | 1,08 | |
| 3 | Luteolin-7-O-digliukuronidas | 17,3 | 14,15 | | 14,35 | | 8,43 | | 2,25 | | 6,38 | | 13,35 | | 3,31 | | 1,19 | |
| – | Neidentifikuota | 18,7 | 1,19 | | 0,28 | | – | | – | | 0,82 | | 1,24 | | 0,40 | | – | |
| 4 | Apigenin-7-O-digliukuronidas | 19,1 | – | | – | | – | | – | | – | | – | | – | | – | |
| 5 | Skutelarinas | 20,6 | 8,99 | | 8,51 | | 9,27 | | 5,58 | | 4,50 | | 12,68 | | 8,54 | | 8,93 | |
| – | Neidentifikuota | 21,1 | 2,29 | | 2,15 | | 1,13 | | 0,91 | | 6,71 | | 3,11 | | 2,82 | | 1,51 | |
| 6 | Antocianinai | 22,2 | 8,49 | | 13,69 | | 6,69 | | 0,62 | | 9,41 | | 15,67 | | 8,53 | | 5,60 | |
| 7 | Rozmarino rūgštis | 23,4 | 31,23 | | 39,59 | | 30,75 | | 35,79 | | 27,64 | | 30,66 | | 28,06 | | 30,27 | |
| – | Neidentifikuota | 31,2 | 1,98 | | – | | – | | – | | 0,97 | | 0,73 | | 0,57 | | 0,53 | |
| – | Neidentifikuota | 33,2 | 0,58 | | – | | 0,90 | | 1,02 | | 1,40 | | 0,94 | | 0,89 | | 0,82 | |
| **Įvertintų junginių bendras:** | | | | **71,89** | | **80,08** | | **58,99** | | **47,89** | | **60,01** | | **80,54** | | **55,49** | | **51,27** | |

a sulaikymo trukmė. PF – *P. frutescens*, PN – *P. frutescens* var. *nankinensis laciniata*, PO – *P. ocymoides* var. *bicolorlaciniata*, PC – *P. frutescens* var. *crispa f. viridis*.

Visuose tirtuose perilės genties augaluose nustatytas apigenin-7-O-digliukuronidas, kurio kiekis įvairuoja nuo 3 mg/g (PF) iki 14 mg/g (PC) sausos žaliavos [36]. Tačiau šis junginys nepasižymi antiradikaliniu akty­vumu (3.4.4.1 pav.). Glikozidų radikalus surišantis poveikis sustiprinamas prie jų cukrinės dalies prijungiant kafeoilo funkcinę grupę [178]. Tai patvir­tina apigenin-7-O-kafeoilgliukozidas, kuris jau pasižymi antiradikalinėmis savybėmis (3.4.4.1 pav.) ir lemia iki 1,5 proc. bendro antiradikalinio akty­vumo tirtuose *Perilla* L. ekstraktuose.

Liuteolin-7-O-digliukuronido ir skutelarino didžiausios TEAC reikšmės nustatytos PF ir PN augalų lapų ekstraktuose (3.4.4.1 lentelė.). Visuose tir­tuose perilės genties augaluose liuteolin-7-O-digliukuronidas lemia nuo 2 proc. (PC) iki 19 proc. (PF), o skutelarinas – nuo 7,5 proc. (PF) iki 15 proc. (PC) bendro antiradikalinio aktyvumo. Liuteolin-7-O-digliukuronidui anti­radikalines savybes suteikia laisva hidroksilo grupė B žiedo *orto* padėtyje, skutelarinui – laisva hidroksilo grupė A žiedo 6 padėtyje. Apigeninas minėtose padėtyse hidroksilo funkcinės grupės neturi [197].

Didžiausios antocianinų TEAC reikšmės nustatytos PN lapų ekstraktuose (3.4.4.1 lentelė.). Jie lemia iki 20 proc. bendro aktyvumo.

***Perilla frutescens* sausojo ekstrakto bei fitopreparatų** „Zi Su Ye“ ir „Allermin“ antiradikalinio aktyvumo tyrimai atlikti ESC-ABTS pokolonėli­niu metodu. Identifikuoti šie antiradikaliniu poveikiu pasižymintys jungi­niai: kavos rūgštis, apigenin-7-O-kafeoilgliukozidas, liuteolin-7-O-digliuku­ronidas, skutelarinas ir rozmarino rūgštis (3.4.4.2 pav.). Apskaičiuotos indi­vidualių junginių, lemiančių minėtų bandinių laisvųjų radikalų surišimo aktyvumą, TEAC reikšmės, kurios pateiktos 3.4.4.2 lentelėje. Įvertinus sau­sojo ekstrakto ir firopreparatų antiradikalinį aktyvumą, nustatyti tie patys junginių aktyvumo dėsningumai kaip ir tirtuose *Perilla* L. genties auga­luose.

Alerminas sujungtas su skaiciukais patobulintas.TIF

**„Allermin“**

650 nm

290 nm

Absorbcija, AV

Sulaikymo trukmė, min

zi zu ze sujungtas su skaiciukais patobulintas.TIFperilla dry extract.TIF

650 nm

650 nm

290 nm

290 nm

**Sausasis ekstraktas**

**“Zi Su Ye”**

Absorbcija, AV

Absorbcija, AV

Sulaikymo trukmė, min

Sulaikymo trukmė, min

***3.4.4.2 pav.*** *P. frutescens preparatų „Allermin“ ir „Zi Su Ye“ bei P. frutescens* var. *crispa f. viridis sausojo ekstrakto UV-ABTS chromatogramos.*

Analičių smailės: 1 – kavos rūgštis; 2 – apigenin-7-O-kafeoilgliukozidas; 3 – liuteolin-7-O-digliukuronidas; 4 – apigenin-7-O-digliukuronidas; 5 – skutelarinas; 6 – rozmarino rūgštis.

Nustatyta, kad didžiausiu gebėjimu sujungti laisvuosius radikalus pasi­žymėjo rozmarino rūgštis (3.4.4.2 pav.), kurios stipriausias antiradikalines savybes patvirtina gautos TEAC reikšmės (3.4.4.2 lentelė.). Didžiausia TEAC reikšmė 87,57 μmol/g nustatyta sausajam ekstraktui, kuriame ji lemia apie 60 proc. bendro bandinio antiradikalinio aktyvumo (TEAC 142,84 μmol/g). Mažiausia rozmarino rūgšties TEAC reikšmė 0,13 μmol/g (apie 20 proc. bendro antiradikalinio aktyvumo) nustatyta fitopreparate „Allermin“. Visuose tiriamuosiuose bandiniuose nustatytas kavos rūgšties, luteolin-7-O-digliukuronido, skutelarino, apigenin-7-O-kafeoilgliukozido antiradikalinis aktyvumas (3.4.4.2 lentelė).

***3.4.4.2 lentelė.*** *P. frutescens preparatuose „Allermin“ ir „Zi Su Ye“ bei P. frutescens* var. *crispa f. viridis sausajame ekstrakte esančių individualių junginių antiradikalinis aktyvumas.*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr.** | **Junginys** | **ST**a **min** | **TEACABTS, μmol/g** | | |
| **"Allermin"** | **"Zi Su Ye"** | **Sausasis ekstraktas** |
| – | Neidentifikuota | 6,93 | 0,14 | 17,84 | – |
| – | Neidentifikuota | 7,90 | 0,03 | 2,58 | – |
| – | Neidentifikuota | 10,07 | 0,04 | 3,34 | – |
| 1 | Kavos rūgštis | 12,99 | 0,06 | 9,39 | 6,24 |
| 2 | Apigenin-7-O-kafeoilgliukozidas | 15,62 | 0,04 | 2,65 | 3,74 |
| 3 | Luteolin-7-O-digliukuronidas | 16,37 | 0,05 | 3,47 | 6,14 |
| 4 | Apigenin-7-O-digliukuronidas | 18,52 | – | – | – |
| – | Neidentifikuota | 19,12 | 0,04 | 5,05 | – |
| 5 | Skutelarinas | 20,30 | 0,04 | 5,00 | 22,40 |
| – | Neidentifikuota | 21,36 | – | – | 6,67 |
| – | Neidentifikuota | 22,01 | – | – | 6,50 |
| 6 | Rozmarino rūgštis | 22,50 | 0,13 | 18,37 | 87,57 |
| – | Neidentifikuota | 27,07 | – | 2,96 | 2,37 |
| – | Neidentifikuota | 28,66 | – | – | 1,22 |
| **Įvertintų junginių bendras:** | | | **0,70** | **70,66** | **142,84** |

a sulaikymo trukmė.

ESC-ABTS pokolonėliniu metodu nenustatytos apigenin-7-O-digliuku­ronido antiradikalinės savybės (3.4.4.2 pav.). Bendrą fitopreparatų antiradi­kalinį aktyvumą ženkliai įtakoja kavos rūgštis: apie 9 proc. „Allermin“ ir 13 proc. „Zi Su YE“. Tuo tarpu *P. frutescens* sausajame ekstrakte jos indėlis į bendrą antiradikalinį aktyvumą tesieka tik 4 proc. Bendrą antiradikalinį tiriamųjų bandinių aktyvumą įtakoja ir neidentifikuoti komponentai. *P. fru­tescens* sausajame ekstrakte nežinomi junginiai lemia tik apie 15 proc. ben­dro antiradikalinio aktyvumo, kai fitopreparatų „Zi Su Ye“ ir kapsuliuoto augalinio preparato „Allermin“ laisvuosius radikalus surišantys neidentifi­kuoti junginiai lemia net apie 50 proc. bendro aktyvumo. Tai siejama su gamybos proceso metu panaudotomis pagalbinėmis medžiagomis, kurios gali turėti antiradikalinių savybių.

Nustatyta, kad didžiausiu suminiu antiradikaliniu aktyvumu pasižymi *P. frutescens* sausasis ekstraktas (TEAC 142,8 µmol/g), mažiausiu – kapsu­liuotasis preparatas “Allermin” (TEAC 0,7 µmol/g). „Zi Su Ye“ fitoprepa­rato suminis TEAC vidutiniškai du kartus mažesnis (TEAC 70,66 µmol/g) už *P. frutescens* sausojo ekstrakto bendrą TEAC. Tai gali būti siejama su dvigubai didesne *P. frutescens* sausojo ekstrakto koncentracija. Tačiau svarbu pažymėti, kad *P. frutescens* sausajame ekstrakte identifikuoti jungi­niai – flavonai ir fenolinės rūgštys – sudaro virš 88 proc. viso antiradikalinio aktyvumo, kurių 61 proc. lemia rozmarino rūgštis. „Zi Su Ye“ ekstrakte identifikuoti junginiai sudaro 55 proc. bendro aktyvumo, iš kurių rozmarino rūgšties indėlis siekia tik 26 proc.

Apibendrinus *Perilla* L. genties augalinių žaliavų ir fitopreparatatų anti­radikalinio aktyvumo tyrimus nustatyta, kad didžiausiu aktyvumu pasižy­mėjo rozmarino rūgštis, liuteolin-7-O-digliukuronidas ir skutelarinas. Rozmarino rūgštis gali būti naudojama kaip charakteringas antiradikalinio aktyvumo žymuo perilės žaliavų ir fitopreparatų kokybės vertinimui.

## 3.4.5. Žemuogės genties rūšių augalinių žaliavų tyrimas

Žemuogių vaistinė augalinė žaliava yra lapai (*Fragariae folium*) ir vaisiai (*Fragariae fructus*) [63]. Žemuogių augalinėse žaliavose nustatomi dideli kiekiai askorbo ir folio rūgščių bei fenolinių junginių, kurių svarbiausieji elagitaninai ir antocianinai lemia žemuogių farmakologinius efektus [22]. Žemuogių lapai ir vaisiai vartojami aterosklerozės, astmos, hipertenzijos, metabolinio sindromo gydymui. Literatūroje nurodoma, kad žemuogių vai­stinė žaliava ir preparatai pasižymi priešuždegiminiu, diuretiniu, antihiperli­pideminiu bei antioksidantiniu poveikiais [22, 37].

Atlikti *Fragaria viridis, F.vesca, F.moschata* lapų ir vaisių augalinės žaliavos etanolinių ekstraktų antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo tyrimai ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėliniais metodais. *Fragaria* L. lapų eks­traktuose identifikuoti 6 pagrindiniai fenoliniai junginiai – (+)-katechinas, (-)-epikatechinas, elago rūgštis, epigalokatechino galatas, hiperozidas, izo­kvercitrinas ir trys kvercetino dariniai (3.4.5.1 pav.).

Fig.2. Fragaria leaves chromatograms_disertacijai_tuscias.TIF

***F. moschata***

***F. vesca***

***F. viridis***

593 nm

593 nm

593 nm

650 nm

650 nm

650 nm

290 nm

290 nm

290 nm

Absorbcija, AV

Sulaikymo trukmė, min

***3.4.5.1 pav.*** *F.viridis, F. vesca ir F. moschata lapų augalinės žaliavos UV-ABTS-FRAP chromatogramos.*

Analičių smailės: 1 – (+)-katechinas; 3 – (-)-epikatechinas; 5, 6, 11 – kvercetino derivatai; 7 – elago rūgštis; 8 – epigalokatechino galatas; 9 – hiperozidas; 10 – izokvercitrinas.

Fig.3. Fragaria fruits chromatograms_disertacijai_tuscias.TIF

593 nm

650 nm

593 nm

650 nm

593 nm

650 nm

Absorbcija, AV

Sulaikymo trukmė, min

***F. moschata***

***F. vesca***

***F. viridis***

290 nm

290 nm

290 nm

***3.4.5.2 pav.*** *F.viridis, F. vesca ir F. moschata vaisių augalinės žaliavos UV-ABTS-FRAP chromatogramos.*

Analičių smailės: 1 – (+)-katechinas; 2 – cianidin-3-O-gliukozidas; 3 – (-)-epikatechinas; 4 – pelargonidin-3-O-gliukozidas; 7 – elago rūgštis; 8 – epigalokatechino galatas; 10 – izokvercitrinas, 11 – kvercetino derivatas.

*Fragaria* L. vaisių ekstraktuose be anksčiau išvardytų junginių nustatyti du antocianidinai – cianidin-3-O-gliukozidas ir pelargonidin-3-O-gliukozi­das (3.4.5.2 pav.). Apskaičiuotos *Fragaria viridis, F.vesca, F.moschata* lapų ir vaisių augalinės žaliavos pagrindinių junginių ir suminės TEAC (μmol/g) reikšmės ir pateiktos 3.4.5.1 lentelėje.

Nustatyta, kad *Fragaria* L. lapų augalinė žaliava pasižymi stipresnėmis antioksidantinėmis savybėmis (suminio TEAC intervalas 191,23 – 609,36 μmol/g ABTS metodu ir 178,63 – 642,20 μmol/g FRAP metodu) nei *Fraga­ria* L. vaisių augalinės žaliavos (8,24 – 25,11 μmol/g ABTS metodu ir 10,82 – 24,82 μmol/g FRAP metodu). Didesnės TEAC reikšmės atspindi dides­nius kiekius bioaktyvių junginių. Pagrindinis kokybinis *Fragaria* L. vaisių ir lapų skirtumas yra vaisiuose nustatyti antocianinai. Pelargonidino ir ciani­dino glikozidai yra antioksidantiškai aktyvūs junginiai. Cianidino-3-O-gliu­kozidas lemia iki 16 proc. bendro antiradikalinio aktyvumo ir iki 20 proc. redukcinio aktyvumo.

Nustatyta, kad tarp *Fragaria* lapų augalinės žaliavos aktyviausia rūšis buvo *F. viridis* (609,36 μmol/g ir 642,20 μmol/g ABTS ir FRAP sistemose), o *F.vesca* buvo aktyviausia tarp *Fragaria* vaisių augalinės žaliavos rūšių (18,05 μmol/g and 18,36 μmol/g ABTS ir FRAP sistemose).

Apskaičiuotos *Fragaria* L. lapų ir vaisių žaliavose nustatytų junginių TEAC reikšmės patvirtina, kad epigalokatechino galatas yra dominuojantis radikalų surišėjas ir turi didžiausią redukcinę galią (3.4.5.1 lentelė). Epiga­lokatechino galato antioksidantinis aktyvumas *F. vesca* ir *F. moschata* lapų augalinėje žaliavoje lemia vidutiniškai 26 proc. visų įvertintų junginių antioksidantinio aktyvumo, o *F. viridis* lapų augalinėje žaliavoje tik apie 8 proc. Tai gali būti sąlygota didesnio aktyvių junginių skaičiaus *F. viridis* lapų augalinėje žaliavoje (3.4.5.1 pav.). *F. viridis* ir *F. vesca* uogų augali­nėje žaliavoje epigalokatechino galatas sudaro apie 11 proc. visų įvertintų junginių antioksidantinio aktyvumo. *F. moschata* uogų augalinėje žaliavoje epigalokatechino galatas lemia apie 30 proc. laisvųjų radikalų surišimo ir 24 proc. redukcinio aktyvumo visų įvertintų junginių. Didesnė epigalokate­chino galato įtaka antioksidantiniam aktyvumui *F. moschata* uogų augali­nėje žaliavoje gali būti siejama su mažesniu aktyvių junginių skaičiumi (3.4.5.2 pav.).

Elago rūgštis pasižymi stipresnėmis redukcinėmis savybėmis bei silpnes­niu antiradikaliniu poveikiu. Nustatyta, kad elago rūgštis lemia apie 10 proc. *F. moschata* lapų bendro redukcinio aktyvumo, tuo tarpu indėlis į bendrą antiradikalinį aktyvumą sudaro tik apie 0,4 proc.

***3.4.5.1 lentelė.*** *F.viridis (1), F. vesca (2), F. moschata (3) lapų bei vaisių augalinėse žaliavose esančių individualių junginių antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas.*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr.** | **Junginys** | **ST, min** | **Žemuogių lapai** | | | | | | | | | | | | **Žemuogių vaisiai** | | | | | | | | | | | |
| **TEACABTS, μmol/g** | | | | | | **TEACFRAP, μmol/g** | | | | | | **TEACABTS, μmol/g** | | | | | | **TEACFRAP, μmol/g** | | | | | |
| **1** | | **2** | | **3** | | **1** | | **2** | | **3** | | **1** | | **2** | | **3** | | **1** | | **2** | | **3** | |
| – | Neidentifikuota | 4,04 | 44,89 | | 5,71 | | 7,10 | | 44,60 | | 5,23 | | 6,65 | | 0,97 | | 1,25 | | 0,85 | | 0,95 | | 1,26 | | 0,80 | |
| – | Neidentifikuota | 5,97 | 52,83 | | 12,36 | | 10,22 | | 41,25 | | 9,81 | | 7,40 | | 1,28 | | 4,79 | | 0,40 | | 0,99 | | 4,06 | | 0,30 | |
| – | Neidentifikuota | 7,81 | 40,97 | | 7,75 | | 7,31 | | 26,65 | | 4,80 | | 5,15 | | 2,26 | | 6,11 | | 0,29 | | 1,38 | | 3,67 | | 0,17 | |
| – | Neidentifikuota | 8,92 | 22,95 | | 8,75 | | 10,30 | | 17,55 | | 6,62 | | 7,74 | | 0,27 | | 0,55 | | 0,13 | | 0,22 | | 0,46 | | 0,09 | |
| 1 | (+)-katechinas | 10,64 | 13,97 | | 11,02 | | 10,63 | | 22,97 | | 19,62 | | 19,34 | | 0,21 | | 0,77 | | 0,26 | | 0,38 | | 1,26 | | 0,52 | |
| 2 | Cianidin-3-O-gliukozidas | 10,89 | – | | – | | – | | – | | – | | – | | 2,97 | | 1,12 | | 1,09 | | 3,68 | | 1,42 | | 1,34 | |
| – | Neidentifikuota | 11,73 | 14,28 | | 3,84 | | 2,69 | | 10,04 | | 2,53 | | 1,84 | | – | | – | | – | | – | | – | | – | |
| – | Neidentifikuota | 12,46 | 10,79 | | 4,50 | | 4,33 | | 9,50 | | 3,76 | | 3,53 | | 0,34 | | 0,12 | | – | | 0,27 | | 0,09 | | – | |
| 3 | (–)-epikatechinas | 13,17 | 17,46 | | 1,49 | | 1,50 | | 26,61 | | 2,61 | | 2,62 | | 0,29 | | 0,10 | | – | | 0,42 | | 0,15 | | – | |
| 4 | Pelargonidin-3-O-gliukozidas | 13,41 | – | | – | | – | | – | | – | | – | | 0,16 | | 0,29 | | 0,14 | | 0,18 | | 0,33 | | 0,15 | |
| – | Neidentifikuota | 16,01 | 14,13 | | 2,49 | | 2,01 | | 14,14 | | 2,55 | | 1,91 | | 0,19 | | 0,30 | | 0,13 | | 0,18 | | 0,28 | | 0,12 | |
| – | Neidentifikuota | 18,11 | 39,91 | | 2,94 | | 8,75 | | 18,18 | | 1,32 | | 3,83 | | 0,93 | | 1,56 | | 0,50 | | 0,47 | | 0,94 | | 0,24 | |
| – | Neidentifikuota | 19,26 | 22,24 | | 5,91 | | 5,02 | | 21,55 | | 5,46 | | 5,09 | | 0,10 | | 0,11 | | – | | 0,09 | | 0,12 | | – | |
| 5 | Kvercetino derivatas | 20,79 | 8,61 | | 2,17 | | – | | 18,48 | | 3,99 | | – | | – | | – | | – | | – | | – | | – | |
| 6 | Kvercetino derivatas | 21,04 | 5,58 | | 3,04 | | – | | 10,76 | | 5,08 | | – | | – | | – | | – | | – | | – | | – | |
| 7 | Elago rūgštis | 23,43 | 2,50 | | 0,52 | | 0,87 | | 24,48 | | 4,02 | | 6,00 | | 0,08 | | 0,18 | | 0,15 | | 0,70 | | 1,72 | | 1,14 | |
| 8 | Epigalokatechino galatas | 24,15 | 49,62 | | 51,45 | | 58,50 | | 50,37 | | 52,11 | | 55,55 | | 2,15 | | 2,89 | | 2,53 | | 2,19 | | 2,88 | | 2,61 | |
| 9 | Hiperozidas | 24,86 | 8,25 | | 2,29 | | 2,69 | | 13,38 | | 4,52 | | 4,01 | | – | | – | | – | | – | | – | | – | |
| 10 | Izokvercitrinas | 25,68 | 16,38 | | 4,59 | | 3,84 | | 32,84 | | 8,63 | | 6,79 | | 0,20 | | 0,15 | | 0,16 | | 0,28 | | 0,27 | | 0,22 | |
| 11 | Kvercetino derivatas | 27,69 | 31,58 | | – | | – | | 32,76 | | – | | 0,09 | | 0,87 | | 0,21 | | – | | 0,75 | | 0,20 | | – | |
| **Įvertintų junginių bendras:** | | | | **609,36** | | **191,23** | | **221,24** | | **642,20** | | **178,63** | | **206,15** | | **18,05** | | **25,11** | | **8,24** | | **18,36** | | **24,82** | | **10,82** | |

ST – sulaikymo trukmė. 1 – *Fragaria viridis*; 2 – *Fragaria vesca*; 3 – *Fragaria* *moschata*.

Nustatyta, kad kvercetino dariniai labiausiai antioksidantinį aktyvumą lemia *F. viridis* lapų žaliavoje (iki 16 proc. bendro redukcinio ir 11 proc. antiradikalinio aktyvumo). Izokvercitrino TEAC reikšmės buvo statistiškai patikimai didžiausios visose tirtose žaliavose (p<0,05). Jo indėlis į bendrą antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą buvo didžiausias palyginus su kitais kvercetino dariniais.

Apskaičiuoti *Fragaria* genties augalų lapų ir vaisių identifikuotų junginių ABTS/FRAP TEACS santykiai (duomenys nepateikti), kurie yra labai panašūs į standartinių fenolinių junginių ABTS/FRAP TEACS santykius (3.3.1 lentelė). Tai patvirtina identifikuotų junginių tapatybę.

Apibendrinant gautų tyrimų rezultatus nustatyta, kad didžiausiu antiradikaliniu ir redukciniu aktyvumu pasižymėjo *F. viridis* lapų ekstraktas, kurio suminės TEAC reikšmės atitinkamai buvo 609,36 ir 642,20 µmol/g. Visų tirtų žemuogių rūšių lapų ekstraktai pasižymėjo stipresniu antioksidantiniu aktyvumu nei vaisių ekstraktai. Epigalokatechino galatas gali būti panaudojamas kaip žymuo vertinant *Fragaria* genties augalų vaistinių augalinių žaliavų ir preparatų antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą. Būdingos UV-ABTS-FRAP chromatogramos tinka žaliavų ir jų preparatų ekvivalentiškumo įvertinimui.

## 3.4.6. Augalinių antioksidantų tyrimų apibendrinimas

Optimizuoti ir validuoti ESC-DPPH, ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėliniai metodai vaistinių augalinių žaliavų ir jų preparatų laisvųjų radikalų surišimo bei redukcinio aktyvumo tyrimams. Pritaikę šiuos pokolonėlinius metodus, nustatėme reikšmingus antioksidantų sudėties bei jų antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo skirtumus tiriamųjų augalų žaliavose bei jų preparatuose. Gauti statistiškai patikimai besiskiriantys kiekiniai antioksidantinio aktyvumo įverčiai, taip pat charakteringos „pirštų antspaudų“ chromatogramos. ESC pokolonėliniais metodais nustatyti antioksidantinio aktyvumo žymenys įgalina vertinti žaliavų kokybę, atrinkti perspektyvias augalų rūšis kaupiančias didelius kiekius antioksidantų. Nustatytos antioksidantinio aktyvumo „pirštų antspaudų“ chromatogramos atveria naujas vaistinių augalinių žaliavų ir jų preparatų standartizacijos perspektyvas.

„Pirštų antspaudų“ chromatogramos kaip fitocheminiai profiliai naudojami vertinant tam tikrų vaistinių augalinių žaliavų ar fitopreparatų kokybę. Ekstraktuose būna daug neidentifikuotų komponentų, dažnai mažais kiekiais, kurie taip pat turi biologinį aktyvumą. Ne visada pagrindinis skirstymo chromatogramoje dominuojantis junginys pasižymi tam tikru žaliavos biologinį poveikį lemiančiu efektu. ESC pokolonėliniais metodais nustatytų „pirštų antspaudų“ chromatrogramų pagalba įvertinome antioksidantinio aktyvumo žymenis bei jų kompleksus. *C. monogyna* ESC chromatogramoje dominuojantis fitocheminis žymuo viteksin-2”-O-ramnozidas nepasižymi antioksidantiniu aktyvumu ir neformuoja atitinkamos smailės („piršto antspaudo“) pokolonėlinėje chromatogramoje. Chlorogeno rūgštis ir hiperozidas identifikuoti kaip antioksidantinio aktyvumo žymenys. Susieję fitocheminį ir antioksidantinio aktyvumo profilius, nustatėme specifinę chromatogramą būdingą tik *C. monogyna* augalinei žaliavai kartu su trimis kokybiniais žymenimis – viteksin-2”-O-ramnozidu, chlorogeno rūgštimi ir hiperozidu.

ESC pokolonėlinių metodų „pirštų antspaudų“ chromatogramos pateikia aiškų ir suprantamą kokybinį vaizdą augalo rūšies identifikavimui, antioksidantų pasiskirstymo tarp atskirų augalo organų įvertinimui, kokybės kontrolei pagal antioksidantinį aktyvumą, užtikrinant kompleksinio augalinio ekstrakto junginių stabilumą. „Pirštų antspaudų“ chromatogramos ne tik patvirtina antioksidantinio aktyvumo žymenis, bet ir nustatytų junginių indėlį į vaistinės augalinės žaliavos ar jos preparato antioksidantinio aktyvumo kokybinę bei kiekybinę charakteristiką. Ištyrę *Achillea* L. ir *Perilla* L. genčių atskiras rūšis, nustatėme, kad antioksidantinio aktyvumo žymenys sutampa, tačiau profiliuose yra skirtumų būdingų atskiroms *Achillea* L. ir *Perilla* L. rūšims. Įvertinę *O. vulgare* atskirų augalo organų antioksidantų pasiskirstymą, nustatėme reikšmingus antioksidantinio aktyvumo skirtumus. *Fragaria* L. lapų antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas reikšmingai didesnis nei vaisių. Šie tyrimai naudingi parenkant vaistines augalines žaliavas pasižyminčias stipriu antioksidantiniu aktyvumu.

Augalai kaupiantys fenolinius junginius yra pirmo pasirinkimo natūralių antioksidantų šaltinis. Kompleksinės ESC pokolonėlinės sistemos yra efektyvus įrankis vaistinių augalinių žaliavų ir fitopreparatų antioksidantų sudėties stabilumo ir pasiskirstymo bei antioksidantinio aktyvumo tyrimams, užtikrinant išsamią jų kokybės kontrolę. Šios sistemos įgalina nustatyti kompleksines fitocheminio ir antioksidantinio aktyvumo „pirštų antspaudų“ chromatogramas.

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad reakcijos kilpos parametrai turi įtakos smailės aukščio ir bazinės linijos triukšmo santykiui. Suminiam tėkmės greičiui esant 0,8 ml/min optimalūs reakcijos kilpos parametrai yra 0,25 mm vidinis skersmuo ir 8 m ilgis, esant 2 ml/min ir 3 ml/min – vidinis skersmuo 0,3 mm ir ilgis 15 m. Šie reakcijos kilpos parametrai užtikrina tinkamą smailės aukščio ir bazinės linijos triukšmo santykį ir rezultatų glaudumą.
2. Vaistinių augalinių žaliavų ir jų preparatų laisvųjų radikalų surišimo tyrimams optimali DPPH radikalų koncentracija reaktoriuje yra 50 μM, o ABTS radikalų-katijonų – 35 µM. Nustatyta, kad optimalus darbinio DPPH reagento tiekimo į pokolonėlinę sistemą ir chromatografinio eliuato tėkmės greičių santykis yra 1:1, o darbinio ABTS reagento – 1:2. Atliktų validacijos eksperimentų rezultatai patvirtina ESC-DPPH ir ESC-ABTS pokolonėlinių metodų tinkamumą radikalus surišančių junginių nustatymui ir kiekiniam antiradikalinio aktyvumo įvertinimui.
3. FRAP reagentas yra tinkamas augalinių antioksidantų redukcinio akty­vumo tyrimams ESC pokolonėlinėje sistemoje. Optimali FRAP reagento komponentų koncentracija reaktoriuje yra 123 μM TPTZ ir 246 μM FeCl3·6H2O. Nustatyta, kad darbinio FRAP tirpalo koncentracijos ir tėkmės greičio įtaka bazinės linijos triukšmui ESC-FRAP sistemoje yra labai nežymi. Gauti ESC-FRAP pokolonėlinio metodo validacijos parametrų įverčiai patvirtina taikytos sistemos jautrumą, glaudumą ir tiesiškumą. Optimizuotas ESC-FRAP pokolonėlinis metodas tinkamas kompleksiniuose mišiniuose esančių junginių redukcinių savybių nustatymui ir kiekiniam redukcinio aktyvumo įvertinimui.
4. Pritaikius optimizuotus ESC pokolonėlinius metodus tų pačių augalinių antioksidantų tyrimams vienodomis chromatografinės eliucijos sąlygomis nustatyti reikšmingi antioksidantinio aktyvumo skirtumai: rozmarino rūgštis aktyviausiai suriša laisvuosius radikalus (TEACs 1,74±0,09); epigalokatechino galatas pasižymėjo didžiausia redukcine galia (TEACs 1,55±0,08); elago rūgšties redukcinis aktyvumas 11 kartų stipresnis nei antiradikalinis. Nustatyti skirtumai tinkami antioksidantinius junginius kaupiančių žaliavų išsamiam vertinimui.
5. Įvertinus *Crataegus* L., *Origanum* L., *Achillea* L., *Perilla* L., *Fragaria* L. augalinių žaliavų ekstraktų ir jų preparatų būdingąsias antioksi­dantinio aktyvumo chromatogramas, nustatytos atskirų junginių TEAC reikšmės ir jų indėlis į bendrą augalinės žaliavos ekstrakto ar preparato antioksidantinį aktyvumą. Nustatyti pagrindiniai antiradikalinio ir/arba redukcinio aktyvumo žymenys: *Crataegus* L. – chlorogeno rūgštis ir hiperozidas; *Origanum* L. ir *Perilla* L. – rozmarino rūgštis; *Achillea* L. – chlorogeno rūgštis ir 3,5-dikafeoilchino rūgštis; *Fragaria* L. – epigalokatechino galatas. Šie žymenys tinkami antioksidantinius junginius kaupiančių vaistinių augalinių žaliavų bei fitopreparatų kokybės kontrolei.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. **Aaby K, Skrede G, Wrolstad RE.** Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). J Agric Food Chem 2005;53:4032-40.
2. **Adly AAM.** Oxidative stress and disease: an updated review. 2010;3:129-45.
3. **Adom KK, Liu RH.** Rapid peroxyl radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants. J Agric Food Chem 2005;53:6572-80.
4. **Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Bahia MF.** Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. Food Chem 2008;106:1014-20.
5. **Alonso AM, Dominguez C, Guillen DA, Barroso CG.** Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. J Agric Food Chem 2002;50: 3112-5.
6. **Alvesalo J, Vuorela H, Tammela P, Leinonen M, Saikku P, Vuorela P.** Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on Chlamydia pneumoniae in cell cultures. Biochem Pharmacol 2006;71:735-41.
7. **Ames BN.** DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. Mutat Res 2001;475:7-20.
8. **Ames BN.** Micronutrient deficiencies. A major cause of DNA damage. Ann NY Acad Sci 1999;889:87-106.
9. **Amstrong JS.** Mitochondrial medicine: pharmacologicl targeting of mitochondria in disease. Brit J Pharmacol 2007;151:1154-65.
10. **Andersen ØM, Markham KR.** Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2006. p.13-20.
11. **Apak R, Guclu K, Demirata B, Ozyurek M, Celik SE, Bektasoglu B ir kt.** Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Mole­cules 2007;12:1496-547.
12. **Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Celik SE.** Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. Microchim Acta 2008;160:413-9.
13. **Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE.** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocu­proine: CUPRAC method. J Agric Food Chem 2004;52:7970-81.
14. **Arnao MB, Cano A, Hernandez-Ruiz J, Garcia-Canovas F, Acosta M.** Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. Anal Biochem 1996;236:255-61.
15. **Atanasiu RL, Stea D, Mateescu MA, Vergely C, Dalloz F, Briot F ir kt.** Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. Mol Cell Biochem 1998;189:127-35.
16. **Bahorun T, Aumjaud E, Ramphul H, Rycha M, Luximon-Ramma A, Trotin F ir kt.** Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. Nahrung 2003;47:191-8.
17. **Bahri-Sahloul R, Ammar S, Fredj RB, Saguem S, Grec S, Trotin F ir kt.** Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. varieties. Pak J Biol Sci 2009;12:660-8.
18. **Balasundram N, Sundram K, Samman S.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem 2006;99:191-203.
19. **Bandonienė D, Murkovic M, Venskutonis RP.** Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. J Chromatogr Sci 2005;43:372-6.
20. **Bandonienė D, Murkovic M.** On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). J Agric Food Chem 2002;50:2482-7.
21. **Bartašiūtė A, Westerink BHC, Verpoorte E, Niederlander HAG.** Impro-ving the *in vivo* predictability of an on-line HPLC stable free radical deco-loration assay for antioxidant activity in methanol-buffer medium. Free Radic Biol Med 2007;42:413-23.
22. **Basu A, Lyons TJ.** Strawberries, blueberries, and cranberries in the metabolic syndrome: clinical perspectives. J Agric Food Chem 2011. Article in press.
23. **Beckman KB, Ames BN.** Oxidative decay of DNA. J Biol Chem 1997;272: 19633-6.
24. **Beckman KB, Ames BN.** The free radical theory of aging matures. Physiol Rev 1998;78:547-81.
25. **Beekwilder J, Jonker H, Meesters P, Hall RD, van der Meer IM, de Vos CHR.** Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. J Agric Food Chem 2005;53:3313-20.
26. **Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin FR, Ortuno A, Del Rio JA.** Uses and properties of *Citrus* ﬂavonoids. J Agric Food Chem 1997;45:4505-15.
27. **Benetis R, Radušienė J, Janulis V.** Variability of phenolic compounds in flowers of Achillea millefolium wild populations in Lithuania. Me­dicina (Kaunas) 2008;44:775-81.
28. **Benzie IF, Strain JJ.** Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15-27.
29. **Benzie IF, Strain JJ.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Anal Biochem 1996;239: 70-6.
30. **Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J.** Herbal Medicine. Expanded Commission E Monographs. Newton: Integrative Medicine Communications; 2000. p. 419-23.
31. **Bors W, Michel C, Schikora S.** Interaction of flavonoids with ascor­bate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. Free Radic Biol Med 1995;19:45-52.
32. **Botham KM, Bravo E, Elliott J, Wheeler-Jones CP.** Direct inter­action of dietary lipids carried in chylomicron remnants with cells on the artery wall: implications for atherosclerosis development. Curr Pharm Des 2005;11:3681-95.
33. **Bouaziz M, Grayer RJ, Simmonds MSJ, Damak M, Sayadi S.** Identi-fication and antioxidant potential of flavonoids and low mole­cular weight phenols in olive cultivar chemlali growing in Tunisia. J Agric Food Chem 2005;53:236-41.
34. **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.** Use of a free radical me­thod to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technol 1995;28:25-30.
35. **Bravo L.** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev 1998;56:317-33.
36. **Bumblauskienė L.** Perilės (*Perilla* L.) rūšių ir varietetų auginimo, fito­cheminės sudėties ir biologinio poveikio tyrimas. Kaunas: Daktaro disertacija; 2011.
37. **Buricova L, Andjelkovic M, Cermakova A, Reblova Z, Jurcek O, Kolehmainen E ir kt.** Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, blackberry, and raspberry leaves. Czech J Food Sci 2011;29:181-9.
38. **Cai Y-Z, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H.** Structure–radical scaven­ging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chi­nese medicinal plants. Life Sci 2006;78:2872-88.
39. **Caliskan O, Gunduz K, Serce S, Toplu C, Kamiloglu O, Sengul M ir kt.** Phytochemical characterization of several hawthorn (Crataegus spp.) species sampled from the Eastern Mediterranean region of Tur­key. Pharmacogn Mag 2012;8:16-21.
40. **Calliste CA, Trouillas P, Allais DP, Simon A, Duroux JL.** Free radi­cal scavenging activities measured by electron spin resonance spectro­scopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. J Agric Food Chem 2001;49:3321-7.
41. **Cano A, Alcaraz O, Acosta M, Arnao MB.** On-line antioxidant acti­vity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS\*+ assay. Redox Rep 2002;7:103-9.
42. **Cano A, Hernandez-Ruiz J, Garcia-Canovas F, Acosta M, Arnao MB.** An end-point method for estimation of the total antioxidant acti­vity in plant material. Phytochem Anal 1998;9:196-202.
43. **Cao GH, Prior RL.** Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. Clin Chem 1998;44:1309-15.
44. **Chandler R, Hooper S, Harvey M.** Ethnobotany and phytochemistry of yarrow *Achillea millefolium*, compositae. Econ Bot 1982;36:203-23.
45. **Chaudhry NMA, Saeed S, Tariq P.** Antibacterial effects of oregano (Origanum vulgare) against gram negative bacilli. Pak J Bot 2007;39:609-13.
46. **Chen J, Lindmark-Mansson H, Gorton L, Akesson B.** Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and ampe­rometric methods. Int Dairy J 2003;13:927-35.
47. **Chiste RC, Mercadante AZ, Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC, Bragagnolo N.** *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. Food Chem 2011;127:419-26.
48. **Ciou J-Y, Wang C-CR, Chen J, Chiang P-Y.** Total phenolics content and antioxidant activity of extracts from dried water caltrop (Trapa taiwanensis nakai) hulls. J Food Drug Anal 2008;16:41-7.
49. **Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B ir kt.** Structure-activity relationship and classiﬁcation of ﬂavonoids as inhi­bitors of xantine oxidase and superoxide scavengers. J Nat Prod 1998;61:71-6.
50. **Cross CE, Reznick AZ, Packer L, Davis PA, Suzuki YJ, Halliwell B.** Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. Free Radic Res Commun 1992;15:347-52.
51. **Cuyckens F, Shahat AA, Pieters L, Claeys M.** Direct stereochemical assignment of hexose and pentose residues in ﬂavonoid O-glycosides by fast atom bombardment and electrospray ionization mass spectro­metry. J Mass Spectrom 2002;37:1272-9.
52. **Čekanavičius V, Murauskas G.** Statistika ir jos taikymas 2. Vilnius: TEV; 2002. p. 20-123.
53. **Dapkevičius A, van Beek TA, Lelyveld GP, van Veldhuizen A, de Groot A, Linssen JPH, Venskutonis R.** Isolation and structure eluci­dation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. J Nat Prod 2002;65:892-6.
54. **Dapkevičius A, van Beek TA, Niederlander HAG.** Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates. J Chromatogr A 2001;912:73-82.
55. **Davies KJ.** Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. J Biol Chem 1987;262:9895-901.
56. **De Beer D, Joubert E, Gelderblom WCA, Manley M.** Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical sca­venging. J Agric Food Chem 2003;51:902-9.
57. **Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD.** Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. J Assoc Physicians India 2004;52:794-804.
58. **Di Majo D, La Neve L, La Guardia M, Casuccio A, Giammanco M.** The influence of two different pH levels on the antioxidant properties of flavonols, flavan-3-ols, phenolic acids and aldehyde compounds analysed in synthetic wine and in a phosphate buffer. J Food Compos Anal 2011;24:265-9.
59. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases.** Report of a joint WHO/FAO expert consultation. World Health Organisation. Ge­neva. 2003.
60. **Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H.** Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. Free Radic Bio Med 2002;32:1102-15.
61. **Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM.** Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. Nutr Res Rev 2000;13:79-106.
62. **Europäisches Arzneibuch Nachtrag 2001.** Sttutgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2001.
63. **European pharmacopoeia.** 5th edition. Volume 2. Strasbourg: Coun­cil of Europe; 2005.
64. **Exarchou V, Fiamegos YC, van Beek TA, Nanos C, Vervoort J.** Hy­phenated chromatographic techniques for the rapid screening and iden­tification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. J Chromatogr A 2006;1112:293-302.
65. **Fan Z-L, Wang Z-Y, Liu J-R.** Cold-field fruit extracts exert different an-tioxidant and antiproliferative activities *in vitro*. Food Chem 2011;129:402-7.
66. **Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D ir kt.** Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the ﬂavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. FEBS Lett 1997;416:123-9.
67. **Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R, Marrosu G, Saso L.** Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. Biochim Biophys Acta 2005;1721:174-84.
68. **Fischer MA, Gransier TJ, Beckers LM, Bekers O, Bast A, Haenen GRMM.** Determination of the antioxidant capacity in blood. Clin Chem Lab Med 2005;43:735-40.
69. **Formica JV, Regelson W.** Review of the biology of quercetin and related bioﬂavonoids. Food Chem Toxicol 1995;33:1061-80.
70. **Foti MC, Daquino C, Geraci C.** Electron-transfer reaction of cinna­mic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. J Org Chem 2004;69:2309-14.
71. **Frankel EN, Meyer AS.** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. J Sci Food Agric 2000;80:1925-41.
72. **Fukuzawa K, Inokami Y, Tokumura A, Terao J, Suzuki A.** Rate constants for quenching singlet oxygen and activities for inhibiting lipid peroxidation of carotenoids and α-tocopherol in liposomes. Lipids 1998;33:751-6.
73. **Garrett AR, Murray BK, Robison RA, O'Neill KL.** Measuring antioxidant capacity using the ORAC and TOSC assays. Methods Mol Biol 2010;594:251-62.
74. **Gorinstein S, Leontowicz M, Leontowicz H, Najman K, Namiesnik J, Park Y-S ir kt.** Supplementation of garlic lowers lipids and increa­ses antioxidant capacity in plasma of rats. Nutr Res 2006;26:362-68.
75. **Grootveld M, Halliwell B.** Measurement of allantoin and uric acid in human body ﬂuids. A potential index of free-radical reactions in vivo? Biochem J 1987;243:803-8.
76. **Grune T, Reinheckel T, Davies KJ.** Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. FASEB J 1997;11:526-34.
77. **Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-Garcia O, Vicente V, Rivera J.** Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. J Thromb Haemost 2005;3:369-76.
78. **Gungor N, Ozyurek M, Guclu K, Cekic SD, Apak R.** Comparative evaluation of antioxidant capacities of thiol-based antioxidants measu­red by different *in vitro* methods. Talanta 2011;83:1650-8.
79. **Haldar S, Rowland IR, Barnett YA, Bradbury I, Robson PJ, Powell J ir kt.** Influence of habitual diet on antioxidant status: a study in a population of vegetarians and omnivores. Eur J Clin Nutr 2007;61:1011-22.
80. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free Radicals in Biology and Medicine. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2007.
81. **Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI.** Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. Crit Rev Food Sci 1995;35:7-20.
82. **Halliwell B, Rafter J, Jenner A.** Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? Am J Clin Nutr 2005;81:268S-76S.
83. **Halliwell B, Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacol 2004;142:231-55.
84. **Halliwell B.** Antioxidant characterization: methodology and mecha­nism. Biochem Pharmacol 1995;49:1341-8.
85. **Halliwell B.** Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? Cardiovasc Res 2007;73:341-7.
86. **Halliwell B.** Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. Mutat Res 1999;443:37-52.
87. **Halliwell B.** Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? Trends Biochem Sci 2006;31:509-15.
88. **Halvorsen BL, Blomhoff R.** Validation of a quantitative assay for the total content of lipophilic and hydrophilic antioxidants in foods. Food Chem 2011;127:761-8.
89. **Havsteen BH.** The biochemistry and medical significance of the flavo­noids. Pharmacol Ther 2002;96:89-97.
90. **Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ.** Flavonoid antioxidants: che­mistry, metabolism and structure-activity relationships. J Nutr Biochem 2002;13:572-84.
91. **Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN.** 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. Methods Enzymol 1999;300:156-66.
92. **Henriquez C, Aliaga C, Lissi E.** Formation and decay of the ABTS derived radical cation: a comparison of different preparation procedu­res. Int J Chem Kinet 2002;34:659-65.
93. **Hollman PCH, Arts ICW.** Flavonols, ﬂavones and ﬂavanols – nature, occurrence and dietary burden. J Sci Food Agric 2000;80:1081-93.
94. **Hollman PCH.** Evidence for health beneﬁts of plant phenols: local or systemic effects? J Sci Food Agric 2001;81:842-52.
95. **Hrbac J, Kohen R.** Biological redox activity: its importance, methods for its quantification and implication for health and disease. Drug Develop Res 2000;50:516-27.
96. **Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B.** Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. J Lab Clin Med 1993;121:257-62.
97. **Huang D, Ou B, Prior RL.** The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem 2005;53:1841-56.
98. **Hung TM, Na M, Thuong PT, Su ND, Sok D, Song KS ir kt.** Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. J Ethnopharmacol 2006;108:188-92.
99. **Ibrahim AY, Shaffie NM, Motawa HM.** Hepatoprotective and thera­peutic activity of *Origanum syriacum* aqueous extract in paracetmol induced cell damage in albino mice. J Am Sci 2010;6:449-58.
100. **Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T.** Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. J Ethnopharmacol 2005;96:145-50.
101. **Yang R-Y, Tsou SCS, Lee T-C, Wu W-J, Hanson PM, Kuo G ir kt.** Distribution of 127 edible plant species for antioxidant activities by two assays. J Sci Food Agric 2006;86:2395-403.
102. **Yanishlieva NV, Marinova E, Pokorny J.** Natural antioxidants from herbs and spices. Eur J Lipid Sci Technol 2006;108:776-93.
103. **Yoshino K, Higashi N, Koga K.** Antioxidant and anti-inflammatory activities of oregano extract. J Health Sci 2006;52:169-73.
104. **Yoshino K, Ogawa K, Miyase T, Sano M.** Inhibitory Effects of the C-2 Epimeric Isomers of Tea Catechins on Mouse Type IV Allergy. J Agric Food Chem 2004;52:4660-3.
105. **Young IS, Woodside JV.** Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 2001;54:176-86.
106. **Yu H-C, Kosuna K, Haga M.** Perilla: The genus *Perilla*. London: Taylor & Francis Group; 1997.
107. **Yu J, Wang L, Walzem RL, Miller EG, Pike LM, Patil BS.** Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. J Agric Food Chem 2005;53:2009-14.
108. **Jakštas V.** Lietuvoje augančių gudobelės (*Crataegus* L.) genties augalų fitocheminės sudėties įvertinimas. Kaunas: Daktaro disertacija; 2005.
109. **Jenner P.** Oxidative stress in Parkinson's disease. Ann Neurol 2003;53:S26-S38.
110. **Jezek P, Hlavata L.** Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. Int J Biochem Cell Biol 2005;37:2478-503.
111. **Jones DP.** Radical-free biology of oxidative stress. Am J Physiol Cell Physiol 2008;295:C849-C868.
112. **Kancheva VD.** Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chain-breaking activity: a comparative study. Eur J Lipid Sci Technol 2009;111: 1072-89.
113. **Karadag A, Ozcelik B, Saner S.** Review of methods to determine antioxidant capacities. Food Anal Methods 2009;2:41-60.
114. **Kasprzak KS.** Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. Free Radic Bio Med 2002;32:958-67.
115. **Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M.** Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chem 2006;94:550-7.
116. **Kaur C, Kapoor HC.** Antioxidants in fruits and vegetables – the millen-nium's health. Int J Food Sci Tech 2001;36:703-25.
117. **Kazakevich Y, Lobrutto R.** HPLC for pharmaceutical scientists. New Jersey: A John Wiley & Sons, Inc.; 2007. p. 15-197.
118. **Keys SA, Zimmerman WF.** Antioxidant activity of retinol, gluta­thione, and taurine in bovine photoreceptor cell membranes. Exp Eye Res 1999;68:693-702.
119. **Kettle AJ, Winterbourn CC.** Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. Redox Rep 1997;3:3-15.
120. **Kim D-O, Lee CY.** Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. Crit Rev Food Sci Nutr 2004;44:253-73.
121. **Kim D-O, Lee KW, Lee HJ, Lee CY.** Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J Agric Food Chem 2002;50:3713-7.
122. **Kohen R, Nyska A.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol 2002;30:620-50.
123. **Koleva II, Niederlander HA, van Beek TA.** An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. Anal Chem 2000;72:2323-8.
124. **Koleva II, Niederlander HAG, van Beek TA.** Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. Anal Chem 2001;73:3373-81.
125. **Kontush A, Spranger T, Reich A, Djahansouzi S, Karten B, Braesen JH ir kt.** Whole plasma oxidation assay as a measure of lipoprotein oxidizability. Biofactors 1997;6:99-109.
126. **Korkina LG.** Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. Cell Mol Biol 2007;53:15-25.
127. **Kosar M, Dorman D, Baser K, Hiltunen R.** An improved HPLC post-column methodology for the identification of free radical scaven­ging phytochemicals in complex mixtures. Chromatographia 2004;60:635-8.
128. **Kosar M, Dorman HJD, Bachmayer O, Baser KHC, Hiltunen R.** An improved on-line HPLC-DPPH method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts of *Lamiaceae* plants. Chem Nat Comp 2003;39:161-6.
129. **Kosar M, Dorman HJD, Baser KHC, Hiltunen R.** Screening of free radical scavenging compounds in water extracts of *Mentha* samples using a postcolumn derivatization method. J Agric Food Chem 2004;52:5004-10.
130. **Krause K-H.** Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. Jpn J Infect Dis 2004;57:S28-S29.
131. **Kusznierewicz B, Piasek A, Bartoszek A, Namiesnik J.** The optimisation of analytical parameters for routine profiling of antioxidants in complex mixtures by HPLC coupled post-column deri­vatisation. Phytochem Anal 2011;22:392-402.
132. **Kvasnicka F, Biba B, Sevcik R, Voldrich M, Kratka J.** Analysis of the active components of silymarin. J Chromatogr A 2003;990:239-45.
133. **Larson RA.** Naturally Occurring Antioxidants. CRC Press LLC, Boca Raton: Lewis publishers; 1997. p. 1-3.
134. **Lass A, Sohal RS.** Electron transport-linked ubiquinone-dependent recycling of α-tocopherol inhibits autooxidation of mitochondrial membranes. Arch Biochem Biophys 1998;352:229-36.
135. **Lemanska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffers AEMF, Rietjens IMCM.** The influence of pH on antioxidant proper­ties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. Free Radic Bio Med 2001;31:869-81.
136. **Levine RL, Stadtman ER.** Oxidative modification of proteins during aging. Exp Gerontol 2001;36:1495-502.
137. **Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM.** Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. Biochem Biophys Res Commun 2000;276:534-8.
138. **Li S-Y, Yu Y, Li S-P.** Identification of antioxidants in essential oil of radix *Angelicae sinensis* using HPLC coupled with DAD-MS and ABTS-based assay. J Agric Food Chem 2007;55:3358-62.
139. [**Liu RH.** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J Nutr 2004;134:3479S-3485S.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15570057)
140. **Lotito SB, Frei B.** Consumption of ﬂavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphe­nomenon? Free Radic Bio Med 2006;41:1727-46.
141. **May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF.** Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. J Biol Chem 1998;273:23039-45.
142. **May JM, Qu Z-C, Whitesell RR, Cobb CE.** Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. Free Radic Biol Med 1996;20:543-51.
143. **Manach C, Mazur A, Scalbert A.** Polyphenols and prevention of cardio-vascular diseases. Curr Opin Lipidol 2005;16:77-84.
144. **Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L.** Polyphe­nols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 2004;79:727-47.
145. **Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P.** Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. J Chromatogr B 2005;827:65-75.
146. **Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C.** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem 2005;16:577-86.
147. **McCaughan JS.** Photodynamic therapy: a review. Drug Aging 1999;15:49-68.
148. **Mejia-Meza EI, Yanez JA, Remsberg CM, Takemoto JK, Davies NM, Rasco B, Clary C.** Effect of dehydration on raspberries: polyphe­nol and anthocyanin retention, antioxidant capacity, and antiadipogenic activity. J Food Sci 2010;75:5-12.
149. **Meral A, Tuncel P, Surmen-Gur E, Ozbek R, Ozturk E, Gunay U.** Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. Pediatr Hematol Oncol 2000;17:687-93.
150. **Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC.** The effects of plant ﬂavonoids on mammalian cells: implications for inﬂammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev 2000;52:673-751.
151. **Miguel MG.** Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. Flavour Frag J 2010;25:291-312.
152. **Milardovic S, Ivekovic D, Grabaric BS.** A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. Bioelectrochemistry 2006;68:175-80.
153. **Milardovic S, Ivekovic D, Rumenjak V, Grabaric BS.** Use of DPPH•/DPPH redox couple for biamperometric determination of antioxidant activity. Electroanal 2005;17:1847-53.
154. **Miliauskas G, van Beek TA, de Waard P, Venskutonis RP, Sudhol­ter EJR.** Identification of radical scavenging compounds in *Rhaponti­cum carthamoides* by means of LC-DAD-SPE-NMR. J Nat Prod 2005;68:168-72.
155. **Miliauskas G, van Beek TA, Venskutonis RP, Linssen JPH, de Waard P, Sudholter EJR.** Antioxidant activity of *Potentilla fruticosa.* J Sci Food Agric 2004;84:1997-2009.
156. **Milivojevic J, Maksimovic V, Nikolic M, Bogdanovic J, Maletic R, Milatovic D.** Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. J Food Qual 2011;34:1-9.
157. **Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans CA.** Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. J Agric Food Chem 1995;43:1794-801.
158. **Miller NJ, Rice-Evans CA, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A.** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci 1993;84:407-12.
159. **Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA.** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. FEBS Lett 1996;384:240-2.
160. **Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jen­nings KR.** Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. Free Radic Res 2002;36:1199-208.
161. **Mladenka P, Zatloukalova L, Filipsky T, Hrdina R.** Cardiovascular effects of ﬂavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic Bio Med 2010;15:963-75.
162. **Molyneux P.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol 2004;26:211-9.
163. **Mondolot L, La Fisca P, Buatois B, Talansier E, De Kochko A, Campa C.** Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocaliza­tion during *Coffea canephora* leaf development. Ann Bot 2006;98:33-40.
164. **Moore J, Yin JJ, Yu LL.** Novel fluorometric assay for hydroxyl radi­cal scavenging capacity (HOSC) estimation. J Agric Food Chem 2006;54:617-26.
165. **Morrissey PA, Sheehy PJA.** Optimal nutrition: vitamin E. Proc Nutr Soc 1999;58:459-68.
166. **Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di Felice M, Scaccini C.** Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. Free Radic Bio Med 1995;19:541-52.
167. **Niederlander HA, van Beek TA, Bartasiute A, Koleva II.** Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. J Chromatogr A 2008;1210:121-34.
168. **Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM.** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr 2001;74:418-25.
169. **Nilsson J, Pillai D, Onning G, Persson C, Nilsson A, Akesson B.** Comparison of the 2,2′-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to asses the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. Mol Nutr Food Res 2005;49:239-46.
170. **Nuengchamnong N, de Jong CF, Bruyneel B, Niessen WMA, Irth H, Ingkaninan K.** HPLC coupled on-line to ESI-MS and a DPPH-based assay for the rapid identification of anti-oxidants in *Butea superba.* Phytochem Anal 2005;16:422-8.
171. **O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G.** Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. Mutat Res 2004;551:245-54.
172. **Olsson ME, Gustavsson KE, Andersson S, Nilsson A, Duan RD.** Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. J Agric Food Chem 2004;52:7264-71.
173. **Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK.** Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. J Agric Food Chem 2002;50:3122-8.
174. **Ozcelik B, Lee JH, Min DB.** Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. J Food Sci 2003;68:487-90.
175. **Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller R.** Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picryl­hydrazyl (DPPH) methods. J Agric Food Chem 2006;54:1151-7.
176. **Ozyurek M, Guclu K, Apak R.** The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. Trend Anal Chem 2011;30:652-64.
177. **Payet B, Sing ASC, Smadja J.** Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. J Agric Food Chem 2005;53:10074-9.
178. **Parejo I, Bastida J, Viladomat F, Codina C.** Acylated quercetagetin glycosides with antioxidant activity from *Tagetes maxima*. Phytoche­mistry 2005;66:2356-62.
179. **Parr AJ, Bolwell GP.** Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phe­nols content or proﬁle. J Sci Food Agric 2000;80:985-1012.
180. **Pazourek J, Vaclavik J, Zemlicka M.** An optimised method for the rapid measurement and calculation of radical scavenger proﬁles in plant extracts by HPLC. Food Chem 2011;125:785-90.
181. **Pellegrini N, Del Rio D, Colombi B, Bianchi M, Brighenti F.** Application of the 2,2’-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. J Agric Food Chem 2003;51:260-4.
182. **Perry G, Cash AD, Smith MA.** Alzheimer disease and oxidative stress. J Biomed Biotechnol 2002;2:120-3.
183. **Petersen M, Simmonds MSJ.** Rosmarinic acid. Phytochemistry 2003;62: 121-5.
184. **Pietta P-G.** Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod 2000;63:1035-42.
185. **Prior RL, Cao G.** Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. Hortscience 2000;35:588-92.
186. **Prior RL, Cao G.** In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radical Bio Med 1999;27:1173-81.
187. **Prior RL, Wu X, Schaich K.** Standardized methods for the determina­tion of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supple­ments. J Agric Food Chem 2005;53:4290-302.
188. **Prochazkova D, Boušova I, Wilhelmova N.** Antioxidant and prooxidant properties of ﬂavonoids Fitoterapia 2011;82:513-23.
189. **Pukalskas A, van Beek TA, de Waard P.** Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE-NMR sys­tem for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts. J Chromatogr A 2005;1074:81-8.
190. **Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F.** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. J Agric Food Chem 2000;48:3396-402.
191. **Pulido R, Hernandez-Garcia M, Saura-Calixto F.** Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. Eur J Clin Nutr 2003;57:1275-82.
192. **Puupponen-Pimia R, Nohynek L, Meier C, Kahkonen M, Heinonen M, Hopia A ir kt.** Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. J Appl Microbiol 2001;90:494-507.
193. **Radušienė J, Ivanauskas L, Janulis V, Jakštas V.** Composition and variability of phenolic compounds in *Origanum vulgare* from Lithua­nia. Biologija 2008;54:45-9.
194. **Rahman K.** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clin Interv Aging 2007;2:219-36.
195. **Randhir R, Lin Y-T, Shetty K.** Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. Asia Pac J Clin Nutr 2004;13:295-307.
196. **Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans CA.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Bio Med 1999;26:1231-7.
197. **Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G.** Structure-antioxidant activity relationships of ﬂavonoids and phenolic acids. Free Radic Bio Med 1996;20:933-56.
198. **Rice-Evans CA.** Formation of free radicals and mechanism of action on normal biochemical processes and pathological states. In: Rice-Evans CA, Burdon RH, editors. Free Radical Damage and its Control. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1994. p. 131-51.
199. **Sadik CD, Sies H, Schewe T.** Inhibition of 15-lipoxygenases by flavo­noids: structure-activity relations and mode of action. Biochem Phar­macol 2003;65:773-81.
200. **Salmon TB, Evert BA, Song B, Doetsch PW.** Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharo­myces cerevisiae*. Nucleic Acids Res 2004;32:3712-23.
201. **Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J Sci Food Agric 1998;76:270-76.
202. **Sanchez-Moreno C.** Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Sci Tech Int 2002;8:121-37.
203. **Sastre J, Pallardo FV, Vina J.** Glutathione, oxidative stress and aging. Age 1996;19:129-39.
204. **Saura-Calixto F, Goni I.** Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. Food Chem 2006;94:442-7.
205. **Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L.** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit Rev Food Sci Nutr 2005;45:287-306.
206. **Scott SL, Chen W-J, Bakac A, Espenson JH.** Spectroscopic parame­ters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions. J Phys Chem 1993;97:6710-4.
207. **Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG ir kt.** In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegra­nate juice. J Nutr Biochem 2005;16:360-7.
208. **Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA.** A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J Nutr Biochem 2007;18:567-79.
209. **Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H.** Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. J Agric Food Chem 2005;53:7749-59.
210. **Shi H, Noguchi N, Niki E.** Comparative study on dynamics of antioxidative action of α-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and α-tocopherol against lipid peroxidation. Free Radic Bio Med 1999;27:334-46.
211. **Singh U, Jialal I.** Oxidative stress and atherosclerosis. Pathophysio­logy 2006;13:129-42.
212. **Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JLFC, Reis S, Borges F.** Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids – a structure-activity relationship study. Free Radic Res 2006;40:433-42.
213. **Sombie PAED, Hilou A, Mounier C, Coulibaly AY, Kiendrebeogo M, Millogo JF ir kt.** Antioxidant and anti-inflammatory activities from galls of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). J Med Plants Res 2011;5:448-61.
214. **Stalmach A, Mullen W, Nagai C, Crozier A.** On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. Braz J Plant Physiol 2006;18:253-62.
215. **Stanner SA, Hughes J, Kelly CN, Buttriss J.** A review of the epidemio-logical evidence for the 'antioxidant hypothesis'. Public Health Nutr 2004;7: 407-22.
216. **Stasko A, Brezova V, Biskupic S, Misik V.** The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. Free Radic Res 2007;41:379-90.
217. **Stewart AJ, Mullen W, Crozier A.** On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic com­pounds in green and black tea. Mol Nutr Food Res 2005;49:52-60.
218. **Stocker R, Frei B.** Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In: Rice-Evans C, editors. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London: Academic Press; 1991. p. 213-43.
219. **Stohs SJ, Bagchi D.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic Bio Med 1995;18:321-36.
220. **Strube M, Haenen GR, Van den Berg H, Bast A.** Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity. Free Radic Res 1997;26:515-21.
221. **Subarnas A,Wagner H.** Analgesic and anti-inﬂammatory activity of the proanthocyanidins shellegueain A from Polypodium feei METT. Phytomedicine 2000;7:401-5.
222. **Surveswaran S, Cai Y-Z, Corke H, Sun M.** Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chem 2007;102:938-53.
223. **Szajdek A, Borowska EJ, Czaplicki S.** Effect of bilberry mash treat­ment on the content of some biologically active compounds and the antioxidant activity of juices. Acta Aliment Hung 2009;38:281-92.
224. **Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB.** Flavonoids as nutraceuticals: a review. Tropical J Pharm Res 2008;7:1089-99.
225. **Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T.** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chem 2007;104:1372-8.
226. **Temple NJ.** Antioxidants and disease: more questions than answers. Nutr Res 2000;20:449-59.
227. **The Pharmacopoeia Commission of PRC.** China: Pharmacopoeia of the people’s Republic of China; 1992. p. 18, 55, 78.
228. **The world health report 2002 – Reducing Risks, Promoting Heal­thy Life.** World Health Organisation. Geneva. 2002.
229. **Tsao R, Deng Z.** Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. J Chromatogr B 2004;812:85-99.
230. **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007;39:44-84.
231. **Valkonen M, Kuusi T.** Spectrophotometric assay for total peroxyl radical-trapping antioxidant potential in human serum. J Lipid Res 1997;38:823-33.
232. **van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, Bast A.** Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem 1999;66:511-7.
233. **van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, van der Vijgh W, Bast A.** The predictive value of the antioxidant capacity of structu­rally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capa­city (TEAC) assay. Food Chem 2000;70:391-5.
234. **Verma SK, Jain V, Verma D, Khamesra R.** *Crataegus oxyacantha* – a cardioprotective herb. J Herb Med Toxicol 2007;1:65-71.
235. **Vina J, Borras C, Miquel J.** Theories of ageing. IUBMB Life 2007;59:249-54.
236. **Walczak MM, Dryer DA, Jacobson DD, Foss MG, Flynn NT.** pH dependent redox couple: an illustration of the nernst equation. J Chem Educ 1997;74:1195-7.
237. **Weber JM, Ruzindana-Umunyana A, Imbeault L, Sircar S.** Inhibi­tion of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. Antivi­ral Res 2003;58:167-73.
238. **Widlansky ME, Duffy SJ, Hamburg NM, Gokce N, Warden BA,Wiseman S ir kt.** Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inﬂammation in patients with coronary artery disease. Free Radic Bio Med 2005;38:499-506.
239. **Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chem 2007;105:940-9.
240. **Wolfe KL, Liu RH.** Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. J Agric Food Chem 2007;55:8896-907.
241. **Wood LG, Gibson PG, Garg ML.** A review of the methodology for assessing *in vivo* antioxidant capacity. J Sci Food Agric 2006;86:2057-66.
242. **Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L.** Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. Food Res Int 2011;44:217-24.
243. **Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA.** Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. J Am Chem Soc 2001;123:1173-83.
244. **Zhang A, Fang Y, Wang H, Li H, Zhang Z.** Free-radical scavenging properties and reducing power of grape cane extracts from 11 selected grape cultivars widely grown in China. Molecules 2011;16:10104-22.
245. **Zhang Q, van der Klift EJC, Janssen H-G, van Beek TA.** An on-line normal-phase high performance liquid chromatography method for the rapid detection of radical scavengers in non-polar food matrixes. J Chromatogr A 2009;1216:7268-74.
246. **Zhu QY, Huang Y, Chen Z-Y.** Interaction between ﬂavonoids and α-tocopherol in human low density lipoprotein. J Nutr Biochem 2000;11:14-21.
247. **Zilic S, Serpen A, Akillioglu G, Gokmen V, Vančetovic J.** Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. J Agric Food Chem 2012;60:1224-31.
248. **Zulueta A, Esteve MJ, Frigola A.** ORAC and TEAC assays compari­son to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chem 2009;114:310-6.
249. **Zuo XL, Chen JM, Zhou X, Li XZ, Mei GY.** Levels of selenium, zinc, copper, and antioxidant enzyme activity in patients with leukemia. Biol Trace Elem Res 2006;114:41-53.

DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

**Straipsniai leidiniuose, įtrauktuose į Mokslinės informacijos instituto duomenų bazę:**

1. Raudonis R, Jakštas V, Burdulis D, Janulis V. Investigation of contribu­tion of individual constituents to antioxidant activity in herbal drugs using postcolumn HPLC method. *Medicina.* 2009; 45(5): 382-394.
2. Raudonis R, Bumblauskienė L, Jakštas V, Pukalskas A, Janulis V. Opti­mization and validation of post-column assay for screening of radical scavengers in herbal raw materials and herbal preparations. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217(49): 7690-7698.
3. Raudonis R, Raudonė L, Jakštas V, Janulis V. Comparative evaluation of post-column free radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays for screening of antioxidants in strawberries. *Journal of Chromatography A.* 2012; 1233: 8-15.

**Straipsniai recenzuojamoje Lietuvos tarptautinės konferencijos me-džiagoje:**

1. Raudonis R, Jakštas V, Bumblauskienė L, Janulis V. Determination of antioxidant activity in herbal raw materials using HPLC-PCR method. 3rd International conference "The Vital Nature Sign". *Proceedings: 22nd-23rd May 2009*, Vytautas Magnus University. Kaunas, Lithuania. 2009; 177.

**Konferencijų tezės:**

1. Raudonis R, Jakštas V, Burdulis D, Bumblauskienė L, Janulis V. HPLC-PCR method for determination of antioxidant activity in herbal raw materials and herbal preparations. NoSSS 2009 – 5th Conference on separation and Related Techniques by Nordic separation Science Society. 26-29 August, 2009. Abstract book and program. Tallinn university of technology. Tallinn, Estonia. p. 129.
2. Bumblauskienė L, Raudonis R, Jakštas V, Janulis V. Antioxidant activity evaluation of *Perilla* L. species and varieties cultivated in Lithuania using HPLC-PCR method. 5th International Conference on Polyphenols Applications "Bridging Bioefficacy to Innovations & Applications" & 6th International Conference on Skin-Ageing and Antioxidants. October 29-30 2009, Malta. International Society of Antioxidants in Nutrition & Health (ISANH). Satellite Symposium on p. 72-73.
3. Raudonis R, Bumblauskienė L, Jakštas V, Janulis V. *Perilla* L. genties augalų ir jų preparatų antioksidantinio aktyvumo tyrimas ESC-ABTS metodu. 3-oji nacionalinė mokslinė konferencija "Mokslas - žmonių sveikatai". Pranešimų tezės: 2010 balandžio 7 d, Kaunas, Kauno medicinos universitetas. p. 42.
4. Raudonis R, Bumblauskienė L, Jakštas V, Janulis V. Optimisation and validation of HPLC-ABTS assay for screening of radical scavengers. 4th International conference “The Vital Nature Sign”. Abstract book: 5th-6th June 2010, Vytautas Magnus University. Kaunas, Lithuania. 2010. p. 103-104.
5. Bumblauskienė L, Raudonis R. Antioxidant activity evaluation of *Perilla* L. species and varieties using HPLC-post column scavenging methods. 18th International Student Scientific Conference for Students and Young Doctors. Abstract book: 22-24 April 2010, Gdansk, Poland. p. 97.
6. Bumblauskienė L, Raudonis R, Janulis V. Study of the phenolic com­pound content in Perilla L. species and varieties herbal raw materials. The 19th International Student Scientific Conference for Students and Young Doctors. Abstract book:, 12nd-14th May 2011, Gdansk, Poland. p. 126.