

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE



Māris Lauberts

**POLIFENOLU IZDALĪŠANA NO DAŽĀDIEM AUGU
BIOMASAS PĀRSTRĀDES ATLIKUMIEM AR VIDEI
DRAUDZĪGĀM EKSTRAKCIJAS METODĒM UN IEGŪTO
PRODUKTU VISPUSĪGA RAKSTUROŠANA**

Promocijas darbs

Doktora grāda iegūšanai ķīmijas nozarē

Apakšnozare: Analītiskā ķīmija

Zinātniskie vadītāji:

Dr. chem., prof. Arturs Vīksna

Dr. habil. chem. Tatjana Dižbite

Rīga

2018

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Valsts Koksnes ķīmijas institūtā Lignīna ķīmijas laboratorijā un Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes Analītiskās ķīmijas katedrā no 2012. gada līdz 2017. gadam ar iepriekš veiktām iestrādnēm.



**LATVIJAS
UNIVERSITĀTE**
ANNO 1919



Darba forma:

Promocijas darbs ķīmijas zinātnes nozarē, analītiskās ķīmijas apakšnozarē

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. chem., prof. Arturs Vīksna (Latvijas Universitāte)

Dr. habil. chem., vadošā pētniece Tatjana Dižbite (LV Koksnes ķīmijas Institūts)

Darba recenzenti:

Dr. habil. chem., prof. Māris Kļaviņš (Latvijas Universitāte)

Dr. chem., vadošais pētnieks Uģis Cābulis (LV Koksnes Ķīmijas Institūts)

Dr. chem., docents Andrey Pranovich (Abo Akadēmija, Somija)

Darba aizstāvēšana paredzēta Latvijas Universitātes Ķīmijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2018. gada 10. maijā pulksten 16.00 Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē, Jelgavas ielā 1.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Daudznozaru bibliotēkā, Raiņa bulvārī 19.

LU ķīmijas zinātņu nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs

_____/Andris Zicmanis/

(paraksts)

promocijas padomes sekretārs

_____/Jāzeps Logins/

(paraksts)

© Latvijas Universitāte, 2018

© Māris Lauberts, 2018

SATURS

KOPSAVILKUMS	6
ANOTATION.....	7
SAĪSINĀJUMI.....	8
IEVADS	10
1. LITERATŪRAS APSKATS	21
1.1. Augu biomasa, kā vērtīga izejviela vērtīgu polifenolu ieguvei	21
1.2. Augu izcelsmes polifenolu izmantošana	25
1.3. Zemmolekulārie polifenolu savienojumi augu biomasā.....	26
1.3.1. Lignāni.....	27
1.3.2. Stilbenoīdi.....	29
1.3.3. Diarilheptanoīdi	29
1.4. Lielmolekulārie augu polifenolu savienojumi	31
1.4.1. Lignīns	31
1.4.2. Tehniskie lignīni	34
1.4.3. Kondensētie tanīni	38
1.5. “Zaļās” ķīmijas pamatprincipi polifenolu savienojumu ieguvē no augu biomasas.....	40
1.6. Biorafinēšana	40
1.7. Augu biomasas paraugu sagatavošana polifenolu savienojumu ieguvei.....	41
1.8. Augu biomasas ekstrakcijas metodes polifenolu savienojumu ieguvei.....	44
1.8.1. Ekstrakcijas metodes polifenolu savienojumu ieguvei no augu biomasas	44
1.8.2. Ekstrakcijas metodes polifenolu savienojumu attīrīšanai.....	44
1.9. Ekstrakcijas parametru ietekme uz iegūstamo ekstraktuvielu sastāvu	46
1.9.1. Augu biomasas ekstraktvielu šķīdība dažādos šķīdinātājos	46
1.9.2. Temperatūras ietekme.....	47
1.9.3. Ekstrakcijas laiks	47
1.10. Ekstrakcijas metodes	48
1.10.1. Soksleta ekstrakcija	48
1.10.2. Superkritiskā šķidrums ekstrakcija.....	48
1.10.3. Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija.....	50
1.10.4. Frakcionēšana/ekstrakcija ar jonu šķīdriem	51
1.10.5. Ekstrakcija mikroviļņos	53
1.10.6. Torefikācija.....	55
1.11. No augu biomasas iegūto polifenolu savienojumu saturošu ekstraktu un lignīna pētīšanas metodes	56
1.12. Antioksidantās aktivitātes pētīšanas metodes.....	59
1.13. Literatūras apskata kopsavilkums	61

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	63
2.1. Pētāmie objekti	65
2.2. Izmantotā aparātūra un reaģenti	66
2.3. Paraugu pirms sagatavošana	69
2.3.1. Sārma lignīna izdalīšana no melnalkšņa un oša koksnes	69
2.4. Jonu šķidrums sintēze	69
2.5. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas pārstrādes blakusproduktiem	70
2.5.1. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar Soksleta ekstrakciju	70
2.5.2. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar cietvielas-šķidrums ekstrakciju	71
2.5.3. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar virstošā slāņa ekstrakciju	71
2.5.4. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar paātrinātā šķīdinātāja ekstrakciju	72
2.5.5. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar superkritisko CO ₂ ekstrakciju	73
2.5.6. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar macerāciju	73
2.6. Augu biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu secīga ekstrakcija ar organiskajiem šķīdinātājiem, izmantojot ekstrakciju ultraskaņā	73
2.7. Augu biomasas pārstrādes blakusproduktu ekstrakcija ar jonu šķidrums	74
2.8. Iegūto polifenolu savienojumu sastāva un struktūras pētījumi	76
2.8.1. Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija	76
2.8.2. Analītiskā pirolīze	77
2.8.3. Metoksilgrupu satura noteikšana	78
2.8.4. Hidroksilgrupu noteikšana	80
2.8.5. Molekulmasas noteikšana	80
2.8.6. Kopējo fenolu satura noteikšana ekstraktos	82
2.8.7. Proantocianidīnu noteikšana	82
2.8.8. Augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija	82
2.8.9. Ultra efektīvā šķidrums hromatogrāfija - masspektrometrija	83
2.9. Termiskā analīze	83
2.10. Iegūto savienojumu antioksidantās aktivitātes noteikšana	84
2.10.1. Antioksidantās aktivitātes noteikšana ar (ABTS ^{•+}) radikāļu inhibēšanas metodi	84
2.10.2. Antioksidantās aktivitātes noteikšana ar (DFPH [•]) radikāļu inhibēšanas metodi	85
2.10.3. DFPH <i>on-line</i> tests	86
2.10.4. Antioksidantās aktivitātes noteikšana ar (ORAC) metodi	86
2.10.5. Antioksidantās aktivitātes noteikšana tauku un eļļu saturošās sistēmās	87
2.10.6. Polifenolu saturošu ekstraktvielu ievadīšana modeļkompozītmateriālā un antioksidantā efekta noteikšana	88
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	89
3.1. Polifenolu savienojumu ekstrakcija no alkšņu mizām	89
3.1.1. Ekstrakcijas metodes un šķīdinātāja ietekme uz ekstraktvielu iznākumu	89

3.1.2. Alkšņu mizas sagatavošanas, ievākšanas laika, augšanas vietas ietekme uz ekstrahēšanas iznākumu.....	96
3.2. Alkšņu mizas un to polifenolu saturošu ekstraktvielu ķīmiskais raksturojums	97
3.2.1. Alkšņu mizas polifenolu saturošu ekstraktvielu raksturojums	99
3.2.2. Alkšņu mizas polifenolu saturošu ekstraktu antioksidantā aktivitāte.....	108
3.2.3. Alkšņu mizas ekstraktu procesu mērogošana	110
3.3. Polifenolu savienojumu ekstrakcija no priedes koksnes	111
3.3.1. Ekstrahēšanas metodes un šķīdinātāja ietekme uz pinosilvīnu savienojumu saturu priedes koksnes izdalītos ekstraktos	111
3.3.2. Pinosilvīnu saturoša ekstrakta, PS un PSM saturs atkarībā no priedes morfoloģiskās daļas, paraugu sagatavošanas un augšanas vietas.....	114
3.4. Priedes koksnes ekstraktvielu ķīmiskais raksturojums.....	116
3.5. Priedes koksnes rūpnieciskie atlikumi kā pinosilvīnu ieguves avots	118
3.5.1. Priedes rūpniecisko blakusproduktu secīga ekstrakcija.....	119
3.5.2. Priedes rūpniecisko blakusproduktu ekstraktu analīze.....	121
3.5.3. Priedes rūpniecisko blakusproduktu 60 % etanola ūdens ekstraktu antioksidatīvā aktivitāte	123
3.6. Pinosilvīnu saturošu ekstraktu ieguves mērogošana L.E.V. ekstraktvielu rūpnīcā	123
3.7. Augu biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu secīga ekstrakcija ar dažādas polaritātes šķīdinātājiem, izmantojot ultraskaņas aktivāciju	123
3.7.1. Augu biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu secīgas ekstrakcijas rezultātā iegūto ķīmisko frakciju raksturojums	124
3.7.2. Augu biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu secīgas ekstrakcijas rezultātā iegūto ķīmisko frakciju antioksidantās aktivitātes novērtēšana	127
3.7.3. <i>Kraft LignoBoost</i> lignīna ietekme uz PU kompozītmateriāla termooksidēšanas destrukciju	129
3.8. Augu biomasas blakusproduktu ekstrakcija/frakcionēšana ar jonu šķīdriem vērtīgu polifenolu savienojumu ieguvei	130
3.8.1. Ar lignīnu bagātu lignocelulozes biorafinēšanas blakusproduktu šķīšanas procesa pētījumi dažādos jonu šķīdumos	130
3.8.2. JŠ izšķīdušā lignocelulozes materiāla frakcionēšana ar dažādiem “antisolventiem” un iegūto frakciju raksturošana	133
SECINĀJUMI	139
LITERATŪRAS SARAKSTS	141
PIELIKUMI.....	157

KOPSAVILKUMS

Polifenolu izdalīšana no dažādiem augu biomasas pārstrādes atlikumiem ar videi draudzīgām ekstrakcijas metodēm un iegūto produktu vispusīga raksturošana. Lauberts M., zinātniskie vadītāji: *Dr. chem.*, prof. A. Vīksna; *Dr. habil. chem.* T. Dižbite. Promocijas darbs, 165 lappuses, 65 attēli, 29 tabulas, 209 literatūras avoti, 7 pielikumi. Latviešu valodā.

POLIFENOLU SAVIENOJUMI, LAPKOKU MIZAS, LIGNOCELULOZE, SKUJKOKU KOKSNES PĀRSTRĀDES ATLIKUMI, EKSTRAKCIJAS, DIARILHEPTANOĪDI, STILBENOĪDI, LIGNĪNS, FRAKCIONĒŠANA, JONU ŠĶIDRUMI, ANTIOKSIDANTI.

Darbā ir izstrādāta metodoloģija augu polifenolu savienojumu ekstrakcijai no dažādiem augu biomasas pārstrādes atlikumiem: mizas, koksnes atlikumiem un biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktiem. Izmantojot dažādas ekstrakcijas metodes (Soksleta, ASE, CŠE, FBE, ME, macerācija) un to parametru optimizāciju (ekstrakcijas laiks, temperatūra, spiediens, šķīdinātājs, ciklu skaits, tieša vai secīga ekstrakcija) noteikti vispiemērotākie polifenolu ieguves apstākļi no priedes koksnes un alkšņu mizām. Izveidots vispusīgs un detalizēts polifenolu mērķsavienojumu (galvenokārt diarilheptanoīdu, stilbēnu, lignīnu) raksturojums. Iegūtais raksturojums izmantots analītiskā analīžu kompleksa izstrādei, kas tālāk tiek izmantots kā polifenolu novērtēšanas rīks. Parādīta šo paraugu sagatavošanas parametru (izejmateriāla ņemšanas vieta, homogenizācijas pakāpe, morfoloģisko daļu attiecība paraugā) ietekme uz polifenolu savienojumu ķīmisko kompozīciju, izmantojot Folina-Čikolto metodi, GC-FID-MS/MS, LC-UV-MS/MS, FTIR metodes, kā arī antioksidantās aktivitātes noteikšanu ar DFPH[•], ABTS^{•+} radikāļiem, ORAC un OXIPRES metodēm. Veikta diarilheptanoīdu un stilbenoīdu iegūšanas mērogošana industriāliem apjomiem. Veikti augu biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu, kur galvenais komponents ir lignīns (polifenola dabas), pētījumi, izmantojot frakcionēšanu, tai skaitā apstrādi ar jonu šķīdriem, samazinot to heterogenitāti un padarot tos izmantojamus kā dabīgos antioksidantus. Izvērtēta jonu šķīdriem piemērotība lignīna frakcionēšanai salīdzinājumā ar organiskajiem šķīdinātājiem un noteiktas iegūto frakciju izmantošanas iespējas kā antioksidantiem dažādās sistēmās. Darbā ir parādīta visa veiktā analītiskā procesa ķēde, no parauga ņemšanas līdz pilnai analīzei, uzsverot iegūšanas procesa ietekmes izvērtējumu uz polifenolu savienojumu ieguvī, kompozīciju un antioksidanto aktivitāti. Papildus analītiskajā procesā ir integrēta ilgtspējīga attīstība, kur samazināta toksisko un bīstamo vielu lietošana ieguves procesos, aizstājot tos ar videi draudzīgākām.

ANOTATION

Isolation of polyphenols from different plant biomass processing residues applied environmentally friendly extraction methods and comprehensive characterization of the products obtained. Lauberts M., supervisors: *Dr. chem.*, prof. A. Viksna; *Dr. habil. chem.* T. Dizhbite. PhD thesis, 165 pages, 65 figures, 29 tables, 209 literature references, 7 appendices. In Latvian.

POLYPHENOL COMPOUNDS, HARDWOOD BARK, LIGNOCELLULOSE, CONIFEROUS WOOD PROCESSING RESIDUES, EXTRACTIONS, DIARYLHEPTANOIDS, STILBENOIDS, LIGNIN, FRACTIONATION, IONIC LIQUIDS, ANTIOXIDANTS.

In the work the methodology for the extraction of plant polyphenol compounds from various plant biomass residues: bark, wood residues and by-products of biomass chemical processing, was developed. The optimal conditions for extracting polyphenols from pine wood and alder bark were determined using different extraction methods (Soxhlet, ASE, SLE, FBE, ME maceration) and optimization of their parameters (extraction time, temperature, pressure, solvent, number of cycles, direct or sequential extraction). A comprehensive and detailed description of the polyphenol target compounds (mainly diarylheptanoids, stilbenes, lignins) has been developed. The obtained characterization is used for development of analytical analysis complex, which is further used as a tool for evaluation of polyphenols. It is demonstrated the effect of the sample preparation parameters (sampling point, degree of homogenization, morphological proportion in the sample) on the chemical composition of polyphenol compounds using the Folin-Chicoloto method, GC-FID-MS/MS, LC-UV-MS/MS, FTIR methods, as well as antioxidant activity with DFPH[•], ABTS^{•+} radicals, ORAC and OXIPRES methods. Carred out the (polyphenol nature) investigations regarding to characterization of the plant biomass processing by-products, where the main component is lignin, using fractionation, including treatment with ionic liquids, reduce of their heterogeneity and making them usable as natural antioxidants. The suitability of ionic liquids for the fractionation of lignin in comparison with organic solvents has been evaluated and the potential of the obtained fractions has been determined as antioxidants in various systems. The work shows the whole chain of analytical process performed, from sampling to full analysis, emphasizing the evaluation of the effect of the extraction process on the target polyphenol compounds, their composition and antioxidant activity. In addition, the analytical process integrates sustainable development, which reduces the use of toxic and hazardous substances in extraction processes, replacing them with more environmentally friendly ones.

SAĪSINĀJUMI

- ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolīn-6-sulfonskābes) diamonija sāls
- ASE – paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija (accelerated solvent extraction)
- BHA – butilhidroksianizols
- BHT – butilēts hidroksitoluols
- BL – Bjorkmana lignīns
- C₆C₃ – fenilpropāna vienība
- CŠE – cietvielas-šķidruma ekstrakcija
- DAD – Diožu matricas detektors (diode-array detector)
- DFPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazils
- DMSO – dimetilsulfoksīds
- DSK – diferenciāli skenējošā kalorimetrija
- FBE – pseido virstošā slāņa ekstrakcija (fluidized-bed extraction)
- FID – Liesmas jonizācijas detektors (flame ionization detector)
- FLD – Fluorescences detektors;
- FPV – fenilpropāna vienība
- FTIR – Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija (Fourier-transform infrared spectroscopy)
- GPC – gelfiltrācijas hromatogrāfija (gel permeation chromatography)
- HPLC – augsti efektīvā šķidruma hromatogrāfija (high-performance liquid chromatography)
- IK₅₀ – nepieciešamā antioksidanta koncentrācija, lai uz pusi samazinātu brīvo radikāļu daudzumu
- IP – indukcijas periods (induction period)
- JŠ – jonu šķidrums
- KĶI – Koksnes ķīmijas institūts
- LC-MS/MS – šķidruma hromatogrāfija tandēma-masspektrometrija (liquid chromatography tandem-mass spectrometry)
- LLU – Latvijas Lauksaimniecības Universitāte
- LVMI – Latvijas Valsts mežzinātnes institūts
- MASL – no melnalkšņa koksnes izdalīts sārma lignīna saturošs preparāts
- ME – ekstrakcija mikroviļņos
- M_n – vidējā skaitliskā molekulmasa
- MS – masspektrometrija
- M_w – masas vidējā molekulmasa
- NET AUC – laukumu starpība zem oksidēšanas kinētiskajām līknēm

NMR – kodolmagnētiskās rezonances spektrometrija (nuclear magnetic resonance)
ORAC – skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitāte (oxygen radical absorbance capacity)
PBS – fosfāta buferšķīdums (phosphate buffered saline)
PDI – polidispersitāte
PEG – polietilēna glikols
PF – aizsardzības faktors (protection factor)
PG – propilgalāts
PS – pinosilvīns
PSM – pinosilvīna monometilēteris
Py-GC/MS – analītiskā pirolīze - gāzes hromatogrāfija - masspektrometrija
PU – poliuretāni
SFE – superkritiskā šķidrums ekstrakcija (supercritical fluid extraction)
SPE – cietfāzes ekstrakcija (solid phase extraction)
TBHQ – tetrabutilhdrohinons
TE – troloksa ekvivalenti
TG – termogravimetrija
THF – tetrahidrofurāns
UE – ekstrakcija ultraskaņā
UV/VIS – ultravioletā/redzamā gaisma (ultraviolet – visible light)
W_r – relatīvais mitruma saturs, %

IEVADS

Kokaugi ir nozīmīgs, līdz šim vēl nepilnvērtīgi izmantots resurss. Viena no tautsaimniecības jomām, kas strauji attīstās pēdējo desmit gadu laikā, ir bioloģiski aktīvu vielu ieguve no augu biomasas. Lielākā un pazīstamākā šo savienojumu grupa ir polifenolu savienojumi. Tie, kā bioloģiski aktīvas fitoķimikālijas, ir ieguvuši ievērojamu nozīmi, saistībā ar to veselību veicinošiem efektiem. Tomēr, polifenolu savienojumu dažādo struktūru dēļ, to ieguves efektivitāte ir atkarīga no izejas augu materiāla un ieguves metodēm, kā arī to parametriem. Tādējādi, atkarībā no vēlamām polifenolu savienojumu struktūrām, līdz ar to arī produktu īpašībām un izejas augu materiāla, ir nepieciešama individuāla ieguves metodikas izstrāde un/vai pielāgošana. Arvien palielinoties raizēm par apkārtējās vides stāvokli un pieaugot naftas cenām pasaules tirgū, tas izraisa vispārēju ieinteresētību par materiālu un ķīmikāliju ražošanas procesu attīstību no atjaunojamām izejvielām. Ņemot vērā, ka Latvija nav bagāta ar fosilajiem resursiem, un arī pasaulē to krājumi nav neizsmeļami, tāpēc, it īpaši Latvijā, ir nepieciešams attīstīt bioekonomiku, jo tās spēcīgākās tautsaimniecības nozares ir mežsaimniecība un lauksaimniecība. Augu biomasai ir liels potenciāls ieņemt nozīmīgu lomu bioekonomikas attīstībā. Pašlaik tikai maza daļa no visas pasaules saražotās augu biomasas tiek pārstrādāta pievienotās vērtības produktos. Lai iegūtu šo papildus vērtību augu biomasai, ražojot degvielu un dažādus vērtīgus ķīmiskus savienojumus, ir izveidota biorafinērijas koncepcija, kas specializējas augu biomasas “pilna cikla, nulles emisijas” frakcionēšanā, iegūstot produktus ar augstu pievienoto vērtību. Promocijas darba tēma ir saistīta ar dabīgu polifenolu kopumu, kas ir vienīgais aromātisko struktūru fotosintēzes procesā atjaunojamais avots, ar mērķi izstrādāt jaunus multifunkcionālus produktus daudzpusīgiem pielietojumiem.

Polifenolu savienojumu ieguves metodes tiek attīstītas, pilnveidotas ar mērķi tās tālāk izmantot dažādās nozarēs, tādās kā kosmētika, pārtika, farmācija, u.c. Daudzi organiskas izcelsmes materiāli, pārtikas produkti, cilvēku veselības aprūpes līdzekļi, kosmētika, u.c., ir pakļauti oksidatīvai degradācijai. Gandrīz visiem oksidēties spējīgiem organiskiem substrātiem ir nepieciešams pievienot antioksidantus, lai aizsargātu to īpašības un pagarinātu izmantošanas laiku. Pēdējā desmitgadē ļoti lielu interesi ir izraisījuši pētījumi par inovatīvu antioksidantu iegūvi no augu biomasas. Daudzas zinātnieku grupas ir orientējušās uz bioloģiski aktīvu savienojumu ekstrakciju no augiem un agro-industriāliem blakusproduktiem, kā arī biomasas mehāniskās un ķīmiskās pārstrādes atlikumiem, kas mūsdienās tiek neracionāli izmantoti, neatbilstoši to vērtībai. Vidēji tikai ap 4 % no visas gadā iegūtās augu biomasas tiek pārstrādātas pievienotās vērtības produktos, ierindojot šo tēmu kā nozīmīgāko starp veicamajiem pētījumiem pasaulē. Vieni no perspektīvākajiem augu izcelsmes antioksidantiem ir polifenolu savienojumi, to globālā tirgus vērtība 2015. gadā tika novērtēta apmēram 757 miljonu dolāru

vērtībā, tiek prognozēts, ka 2022. gadā tā sasniegts pat 1,121 miljardus dolāru, ar kopējo gada pieauguma koeficientu 8,3 % gadā no 2014. līdz 2022. gadam. Mūsdienās arvien populārāka kļūst ne tikai individuālu, no augiem iegūtu un attīrītu polifenolu savienojumu izmantošana, bet arī kompleksa augu ekstraktu, kuru pamatā ir dabiskās izcelsmes polifenolu kompozīcijas (ar sinerģisko bioloģisko aktivitāti) iekļaušana dažādās sistēmās kā funkcionālām sastāvdaļām. Augu biomasas mehāniskās, ķīmiskās un bioķīmiskās pārstrādes blakusproduktu valorizācija, iekļaujot polifenolu ieguvu un to izmantošanu kā antioksidantus, paver iespēju panākt maksimālu kopējās izejvielas pievienotās vērtības sasniegšanu. Tādēļ darbā ir veiktas dažādu tipu augu biomasas polifenolu ekstrakcijas un iegūto produktu antioksidantās aktivitātes pētījumi.

Viens no nozīmīgākajiem etapiem koku mizas pievienotās vērtības rašanā ir moderna un racionāla polifenolu ieguve. Par valsts ieinteresētību šajā virzienā liecina īstenotā Valsts pētījumu programma, kuras ietvaros, sadarbojoties vairākiem institūtiem (LVMI "Silava", LLU, LV KĶI), īstenots projekts "Jauni produkti un inovatīvas meža apsaimniekošanas, meža koksnes un nekoksnes produktu ražošanas tehnoloģijas, racionāli izmantojot meža resursus un būtiski palielinot produkcijas pievienoto vērtību".

Analītiskā ķīmija, kas ietver paraugu sagatavošanu un analīzi, ir ceļš kā var ieviest inovatīvas, videi draudzīgas uz "zaļās" ķīmijas pamatprincipiem balstītas vērtīgu savienojumu ieguves metodes gan laboratorijas praksē, gan industriālos apjomos. Darba pētījumiem fundamentālā jomā ir svarīgā nozīme arī sarežģītu dabisku augu ekstraktu analīžu tālākai attīstībai. Kopumā, darbā veiktie pētījumi parāda visu analītiskā procesa ciklu no parauga ņemšanas līdz analīzes rezultātam/zināšanām.

Saglabāt un apsaimniekot atjaunojamos dabas resursus ir svarīgs uzdevums, lai veicinātu ilgtspējīgu bioekonomikas attīstību 21. gadsimtā.

Promocijas darba mērķis ir ekoloģiski droša un efektīva polifenolu selektīva ekstrakcija/frakcionēšana/attīrīšana no augu biomasas blakusproduktiem, izmantojot inovatīvus šķīdinātājus un metodes, lai iegūtu produktus ar augstāku pievienoto vērtību, kurus var piedāvāt kā bioķīmikālijas un dabas izcelsmes antioksidantus/stabilizatorus dažādos materiālos.

Šī mērķa realizācija var palielināt Latvijas meža industrijas sektora produkcijas sortimentu ar palielinātu pievienoto vērtību.

Darba uzdevumi

1. Pētāmo augu biomasas paraugu izvēle, sagatavošana, to raksturošana un kondicionēšana frakcionēšanai.

2. Jonu šķidrumu atlase polifenolu selektīvai ekstrakcijai no lignocelulozes. Lignocelulozes biorafinēšanas produktu, kas ir bagāti ar lielmolekulāriem polifenoliem, frakcionēšana izmantojot ekstrakciju ar izvēlētiem jonu šķidrumiem (JŠ).
3. Augu biomasas mehāniskās un ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu (alkšņu mizas, priedes koksnes atlikumi, tehniskie lignīni) paraugu ekstrakcija/frakcionēšana/attīrīšana, izmantojot dažādus šķīdinātājus, tajā skaitā jonu šķidrumus.
4. Lignocelulozes mijiedarbības raksturojums ar JŠ, izmantojot pētījumiem ATR-FTIR un kalorimetrijas metodes.
5. Frakcionēšanas produktu un iegūto ekstraktvielu analīze: sastāva un struktūras raksturojums, izmantojot analītisko pirolīzi (Py-GC/MS), FTIR un UV/VIS spektrometriju, LC-MS/MS, GPC, funkcionālo grupu noteikšanu un antioksidantās aktivitātes noteikšana, izmantojot divus neatkarīgus testus: stabilo 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskābes katjonradikāļu (ABTS^{•+}) un 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikāļu (DFPH[•]) deaktivēšanas metodes, kā arī ORAC un OXIPRES metodes.
6. Dažādu ekstrakcijas paņēmieni efektivitātes izvērtēšana, pamatojoties uz analīzes rezultātiem.
7. Iegūto perspektīvāko polifenolu frakciju koncentrēšana, izmantojot efektīvākos lignocelulozes biomasas un mizas frakcionēšanas/ekstrakcijas/attīrīšanas metodes/režīmus, un eksperimentālo partiju izstrāde to saturošu produktu ieguvei.
8. Biomasas pārstrādes atlikumos dominējošo lielmolekulāro un zemmolekulāro polifenolu (lignīni, diarilheptanoīdi, stilbenoīdi) un to saturošo ekstraktu ķīmiskais raksturojums, to izvērtējums kā tehniskiem antioksidantiem kompozītu PU materiālos (izmantojot termiskās analīzes metodes) un antioksidanta potenciāls dažādos substrātos kā kosmētiskos līdzekļos, pārtikas sistēmās.

Rezultātu zinātniskā nozīmība, inovācijas potenciāls

- Veikti jauni sistemātiski pētījumi, kas saistīti ar lielmolekulāro polifenolu (lignīni) un zemmolekulāro polifenolu bagātu lignocelulozes biorafinēšanas produktu frakcionēšanu, salīdzinot ar esošajām tradicionālajām ekstrakcijas metodēm. Ekstrakcijai ir izmantotas mūsdienīgas ekstrakcijas metodes, tajā skaitā paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija (ASE) un ekstrakcija ar jonu šķidrumiem (JŠ) izmantojot uz imidazola bāzētu jonu šķidrumu virkni, kas atšķiras ar polaritāti un hidrofobitāti.
- Ir izstrādātas jaunas vērtīgu produktu virknes (multiproduktu *portfolio*) ar paaugstinātu pievienoto vērtību, to iegūšanu no augu izejmateriālu mehāniskās un ķīmiskās pārstrādes blakusproduktiem. Mērķsavienojumu un pievienotās vērtības produktu ieguvei

laboratorijas apstākļos ir pierādīta ASE efektivitāte polifenolu savienojumu iegūšanai, izveidojot multiproduktu virkni ar perspektīvu pārnesi rūpniecībā.

- Ir izpētīts un pierādīts, ka lignocelulozes biomasas mijiedarbība ar JŠ uz imidazolija bāzes ir eksotermisks process un parādīts, ka JŠ anjonam ir vadošā loma gan celulozes, gan lignīna šķīšanai un ir noteikts, ka lignocelulozes apstrāde ar JŠ, noved pie lignīnam “*in situ*” raksturīgām alkil-arilēteru saišu saraušanās un jaunu C-C saišu veidošanās.
- Izveidotas jaunas metodes biomasas ķīmiskās/bioķīmiskās pārstrādes blakusproduktu - tehnisko lignīnu attīrīšanai, izmantojot JŠ (“zaļi” šķīdinātāji), kas dod iespēju iegūtos pievienotās vērtības produktus izmantot kā perspektīvus polimēru antioksidantus.
- Izstrādātas efektīvas metodes augstvērtīgu mazmolekulāro polifenolu: diarilheptanoīdu un stilbēnu iegūšanai no augu biomasas mehāniskās pārstrādes atlikumiem ar pietiekamu tīrības pakāpi.
- Ir izveidots vispusīgs un detalizēts mērķsavienojumu un dominējošo polifenolu savienojumu raksturojums iegūtajos jaunajos produktos, iekļaujot to sastāva un struktūras (Py-GC/MS/FID, FTIR, LC-MS/MS, NMR), funkcionālo grupu (-OCH₃, -OH_{fen}, -COOH) analīzi un ir noteikts molekulārās masas sadalījums (GPC), noraksturotas fizikāli-ķīmiskās īpašības (DSK, TGA), kā arī noteikta to sastāva atkarība no ieguves metodes un apstākļiem.
- Izmantojot testus ar dažādiem brīvajiem radikāļiem un kinētisko ORAC metodi, kā arī OXIPRES ir izpētītas jauno produktu antioksidantās īpašības. Antioksidantās īpašības tika pierādītas, ievadot tos reālās sistēmās: poliuretānu kompozītmateriālā, dažādos tauku un eļļu saturošos substrātos. Inovācijas potenciāls ir arī secīgas ekstrakcijas nozīmības pierādījums multiproduktu ieguvē, tādējādi attīstot un ievērojami papildinot lapkoku mizas un lignocelulozes biorafinēšanas klasterus, veicot augu biomasas valorizāciju. Darba rezultāti dod nozīmīgu ieguldījumu koku mizas (alkšņu), koksnes (priedes) mērķsavienojumu (diarilheptanoīdu, stilbenoīdu) sistemātiskā raksturojumā, atkarībā no izejvielas parametriem (izejmateriālu ņemšanas laika, vietas, augstuma) un ekstrakcijas apstākļiem (ekstrakcijas metodes, laika, temperatūras, šķīdinātāju izvēles, homogenizācijas pakāpes, spiediena).

Izstrādātie frakcionēšanas procesi ir sekmīgi izmantoti biomasas rafinēšanai, iegūstot pievienotās vērtības produktus. Darbā veiktie polifenolu savienojumu ieguves procesi ir iekļauti kā nozīmīga daļa koku mizas biorafinēšanas klasteru izveidē un/vai papildināšanā un novērtēti ar meža nozares augstāko atzinību par nozīmīgiem sasniegumiem un ieguldījumu nozares attīstībā piešķirot “Zelta čiekura” gada balvu 2016. (1. pielikums)

Rezultātu praktiskā nozīmība

- Kā izpētes objekti ir izmantoti Latvijā un Ziemeļeiropā plaši izplatītu lapkoku un skuju koku mehāniskās un ķīmiskās pārstrādes blakusprodukti, kuri ir pieejami rūpnieciskos apjomos un kuru racionālai izmantošanai ir nepieciešams veikt to valorizāciju.
- Izstrādātie paņēmieni polifenolu savienojumu ekstrakcijai/fracionēšanai/attīrīšanai sniedz ieguldījumu Eiropas Savienības stratēģisko uzdevumu risinājumā: ekonomikas radīšanā, kas orientēta uz maksimālu atjaunojamu izejvielu izmantošanu (bio-bāzēta ekonomika).
- Sekmīgi norit sadarbība ar ekstraktvielu rūpnīcu L.E.V. (Latvija, Glūdas pag.) par izstrādāto bioloģiski aktīvo savienojumu (diarilheptanoīdu un stilbenoīdu) ieguves metodes pārņemšanai no laboratorijas uz rūpnieciskiem apjomiem.
- LV KĶI Lignīna ķīmijas laboratorijai ir aktīva sadarbība ar SIA “FIDE” pie jaunu produktu izstrādes. Ir izstrādāti un laisti Latvijas tirgū pieejami produkti kā pārtikas piedeva Orvital un kosmētiskais krēms pēc sauļošanās, kā arī izstrādāti divi pavisam jauni saules aizsargkrēmi, kuru pamatā ir promocijas darbā iegūto polifenolu ekstrakti (lignīns un zem molekulārie polifenoli) kā UV-A un UV-B starojuma absorbējošā aktīvā sastāvdaļa.
- Pamatojoties uz KĶI institūta darbības stratēģiju (2015. - 2020. gadam), viena no vājām pusēm ir pilotiekārtu trūkums, tādēļ infrastruktūras attīstībai ir paredzēta angāra būvniecība un iekārtu iegāde tuvāko 2 gadu laikā. Pamatojoties uz polifenolu ekstrakcijas veikto pētījumu rezultātiem, ir izstrādāta specifikācija pilotiekārtas paātrinātā šķīdinātāja ekstraktoram šajā angārā.

Pētījuma rezultātu aprobācija

Iegūtajiem rezultātiem ir svarīgs ieguldījums šādu projektu realizācijā:

1. H2020 Projekts *US4 GREENCHEM* “*Combined ultrasonic and enzyme treatment of lignocellulosic feedstock as substrate for sugar based biotechnological applications*”, (2015. - 2019. g.) pētnieks.
2. Valsts pētījumu programma ResProd projekta Nr. 3 “Meža un zemes dzīvīgu resursu izpēte, ilgtspējīga izmantošana – jauni produkti un tehnoloģijas” (2014. - 2018. g.) pētnieks.

3. LZP Fundamentālo un tematisko pētījumu projekts Nr. 564/2012 „Koksnes biomasas frakcionēšana, izmantojot jonu šķīdumus un izdalot vērtīgus polifenolu un celulozes produktus” (2013. - 2016. g.) pētnieks.
4. „PINOBIO” projekts „*Pinosylvins as novel Bioactive Agents for Food Applications*” (kas apstiprināts ar projekta ERANET, projekta „*WoodWisdom*” *Net-2 Research Programme* (2011. - 2014. g.) pētnieks.
5. ES 7. Programmas ietvaros sadarbības projekts „BIOCORE” („*Biocommodity refinery*”). Contract Nr.241566 (2010. - 2014. g.) zinātniskais asistents/pētnieks.
6. Valsts pētījumu programma NatRes Nr.2010.10-4/VPP projekta Nr.2.2.4. apakšprojekta „Maztonnāžas produkti ar augstu pievienoto vērtību no koksnes ar biorafinērijas tehnoloģijām, materiāli ar uzlabotām ilgizturības īpašībām, sadaļa „Funkcionāli produkti un ķīmikālijas ar augstu pievienoto vērtību no koku mizām”, (2010. - 2013. g.) zinātniskais asistents/pētnieks.

Publicitāte

Periodikā ar aprēķinātu citējamību (Hirša indekss 4):

1. Aminzadeh, S., Lauberts, M., Dobeles, G., Ponomarenko, J., Mattsson, T., Lindström, M., Sevastyanova, O. Membrane filtration of kraft lignin: Structural properties and antioxidant activity of low-molecular-weight fraction. *Industrial Crops and Products*, **2018**, 112, 200 - 209. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.042> (Impact Factor: 3,181).
2. Lauberts, M., Lauberte, L., Arshanitsa, A., Dizhbite, T., Dobeles, G., Bikovens, O., Telysheva, G. Application of analytical pyrolysis for search of mechanisms of biomass components transformation induced by microwave torrefaction. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **201X**, (Resubmitted after minor revision).(Impact Factor: 3,471).
3. Lauberts, M., Telysheva, G., Venskutonis, P.R., Lauberte, L., Dizhbite, T., R.Kazernavičiūte, R., Pukalskas, A. Diarylheptanoid-rich extract of grey and black alder barks: an effective dietary antioxidant in mayonnaise. *Chemical Papers*, **2017**, 71, 1007 – 1012. doi:10.1007/s11696-016-0017-3. (Impact Factor: 1,258).

4. Lauberts, M., Sevastyanova, O., Ponomarenko, J., Dizhbite, T., Dobeles, G., Volperts, A., Lauberte, L., Telysheva, G. Fractionation of technical lignin with ionic liquids as a method for improving purity and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, Available online 11 November **2016**, *95*, 512 - 520. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.004> (Impact Factor: 3,181).
5. Ponomarenko, J., Dizhbite, T., Lauberts, M., Volperts, A., Dobeles, G., Telysheva, G. Analytical pyrolysis - a tool for revealing of lignin structure-antioxidant activity relationship. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2015**, *113*, 360 - 369. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2015.02.027> (Impact Factor: 3,471).
6. Ponomarenko, J., Lauberts, M., Dizhbite, T., Lauberte, L., Jurkane, V., Telysheva, G. Antioxidant activity of various lignins and lignin related phenylpropanoid units with high and low molecular weight. *Holzforschung*, **2015**, *69*, (6), 795 - 805. <https://doi.org/10.1515/hf-2014-0280> (Impact Factor: 1,868).
7. Ponomarenko, J., Dizhbite, T., Lauberts, M., Viksna, A., Dobeles, G., Bikovens, O., Telysheva, G. Characterization of Softwood and Hardwood LignoBoost Kraft Lignins with Emphasis on their Antioxidant Activity. *Bioresources*, **2014**, *9*,(2), 2051 - 2068. (Impact Factor: 1,334).
8. Arshanitsa, A., Ponomarenko, J., Dizhbite, T., Andersone, A., Gosselink, R. J. A., Putten, J.V., Lauberts, M., Telysheva, G. Fractionation of technical lignin as a tool for improvement of their antioxidant properties. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2013**, *103*, 78 - 85. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2012.12.023> (Impact Factor: 3,471).
9. Lebedeva, G., Roze, L., Lauberts, M., Jasina, L., Rancane, S., Telysheva, G. Effect of Lignosilicon on the content and antioxidant activity of the polyphenols of buckwheat *Fagopyrum esculentum* Moench. *Vide. Tehnologija. Resursi - Environment, Technology, Resources*. **2013**, *1*, 138 - 144.
10. Dizhbite, T., Ponomarenko, J., Andersone, A., Dobeles, G., Lauberts, M., Krasilnikova, J., Mironova-Ulmane, N., Telysheva, G. Role of paramagnetic polyconjugated clusters in lignin antioxidant activity (in vitro). *Material Sciences and Engineering and Integrated Ferroelectrics*, **2012**, *38*, 012033.

Cita veida periodikā:

1. Aminzadeh, S., Lauberts, M., Dobeles, G., Ponomarenko, J., Mattsson, T., Sevastyanova, O., Lindström, M. Membrane filtration of LignoBoost kraft lignin: properties of the low-molecular-weight fraction. Proceedings of the 19th International Symposium on Wood, Fibre and Pulp Chemistry, August 30 - September 1, **2017**, Brazil, Porto Seguro, pp. 246 - 250.
2. Tagami, A., Gioia, C., Lauberts, M., Dobeles, G., Dizhbite, T., Lindström, M., Sevastyanova, O. The Impact of the Fractionation Method on the Chemical Structure and Reactivity of Industrial Kraft Lignins. Proceedings of the 7th Nordic Wood Biorefinery Conference, March 28 - 30, **2017**, Stockholm, Sweden, pp. 169 - 171.
3. Aminzadeh, S., Lauberts, M., Dobeles, G., Ponomarenko, J., Mattsson, T., Sevastyanova, O., Lindström, M. Membrane Filtration of LignoBoost Kraft lignin: Fouling Phenomena and Properties of the Low-Molecular-Weight Fraction. Proceedings of the 7th Nordic Wood Biorefinery Conference, March 28 - 30, **2017**, Stockholm, Sweden, pp. 220 - 222.
4. Lauberts, M., Lauberte, L., Dizhbite, T., Volperts, A., Ponomarenko, J., Jurkane, V., Telysheva, G. Ionic liquids as a tool for technical lignins valorisation. Proceedings of the 14th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp (EWLP-2016), June 28 - July 1, **2016**, Autrans, France, pp. 249-252.
5. Janceva, S., Papadopoulou, S.E., Kulinsh, L., Lauberts, M., Dizhbite, T., Telysheva, G. Evaluation of grey alder bark tannin as phenol substitute in the synthesis of phenolformaldehyde resins suitable for plywood. Proceedings of the 13th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp (EWLP-2014), June 24 - 27, **2014**, Seville, Spain, pp. 443 - 446.
6. Ponomarenko J., Trouillas P., Dizhbite T., Lauberts M., Roze L., Jurkane V., Krasilnikova J., Telysheva G. Structure-antioxidant activity relationship for low-molecular and high-molecular plant phenylpropanoids: acyclic diarylheptanoids and lignins. Proceedings of the 13th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp (EWLP-2014), June 24 - 27, **2014**, Seville, Spain, pp. 671-674.

7. Roze, L., Lauberts, M., Dizhbite, T., Willför, S., Telysheva, G. Scots pine growing in Latvia as a source of pinosylvin stilbenes. Proceedings of the 13th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp (EWLP-2014), June 24 - 27, **2014**, Seville, Spain, pp. 723-726.
8. Teliševa, G., Dižbite, T., Krasilņikova, J., Ponomarenko, J., Janceva, S., Bikovens, O., Roze, L., Lauberts, M., Andersone, A. Latvijas koku sugu mizas valorizācija fitoķīmikāliju un biomateriālu ar pievienoto vērtību ieguvei. Vietējo resursu (zemes dziļu, meža, pārtikas un transporta) ilgtspējīga izmantošana - jauni produkti un tehnoloģijas (NatRes) Valsts pētījuma programma, 2010. - 2013. rakstu krājums, **2013**, 136 - 140.

Konferenču tēzes:

1. Lauberte, L., Telysheva, G., Lauberts, M., Dizhbite, T., Viksna, A. Diarylheptanoid-type phenolic composition of grey and black alder bark. EcoBalt 2016, October 9 - 12, **2016**, Tartu, Estonia, p.71.
2. Lauberts, M., Telysheva, G., Lauberte, L., Dizhbite, T., Viksna, A. Polyphenolic rich extracts obtained from different species of Salix. EcoBalt 2016, October 9 - 12, **2016**, Tartu, Estonia, p. 74.
3. Lauberte, L., Arshanitsa, A., Lauberts, M., Dizhbite, T., Jashina, L., Telysheva, G. Alteration of the yields and composition of the polyphenolics extracted from plant biomass after it treatment in the microwave field. Green Extraction of Natural Products (GENP2016), May 30 - June 1, **2016**, Turin, Italy, pp. 45 - 46.
4. Krasilņikova, J., Zalomonson, M., Doudkinsky, T., Madesova, V., Teliševa, G., Lauberte, L., Lauberts, M., Dižbite, T. Influence of Different Oregonins on Pancreatic Lipase Activity. Rīgas Stradiņa universitātes 15. zinātniskā konference, 17-18 maijs, **2016**, pp. 42.
5. Lauberts, M., Arshanitsa, A., Dizhbite, T., Bikovens, O., Jurkjane, V., Telysheva, G. Application of analytical pyrolysis for search of mechanisms of biomass components transformation induced by microwave torrefaction. 21th International Symposium on Analytical and Applied Pyrolysis, May 9 - 12, **2016**, Nancy, France, pp. 61.
6. Lauberts, M., Ponomarenko, J., Sevastjanova, O., Dižbite, T., Dobele, G., Jurkjane, V., Teliševa, G. Purification of Technical Lignins with Ionic Liquids. 18th International

Symposium on Wood, Fibre and Pulping Chemistry, September 9 - 11, **2015**, Austria, Vienna, pp. 85 - 86.

7. Dizhbite, T., Jashina, L., Andersone, A., Lauberts, M., Lauberte, L., Telysheva, G. Evaluation of lignin and low molecular phenylpropanoids as a green ingredient of cosmetic sunscreens. 9th World Congress on Polyphenols Applications, June 3 - 5, **2015**, St. Julian's, Malta, pp. 90.
8. Lauberts, M., Lauberte, L., Dizhbite, T., Kazernaviciute, R., Venskutonis, P.R., Telysheva, G. Evaluation of oxidative resistance of mayonnaise enriched with alder bark extract. FoodBalt 2015, May 21 - 22, **2015**, Kaunas, Lithuania, pp. 72.
9. Lauberts, M., Antaina, L., Ponomarenko, J., Dižbite, T., Teliševa, G. Lignin extraction and purification with ionic liquids. EcoBalt 2014, October 8 - 10, **2014**, Rīga, Latvija, pp. 38.
10. Ponomarenko, J., Trouillas, P., Lauberts, M., Dizhbite, T., Telysheva, G. Experimental and quantum chemistry calculations study of the structure - antioxidant activity relationship for diarylheptanoids from *Alnus* spp. bark. Proceedings of the 5th Nordic Wood Biorefinery Conference, March 25 - 27, **2014**, Stockholm, Sweden, pp. 257 - 258.
11. Roze, L., Lauberts, M., Dizhbite, T., Telysheva, G. Pinosylvin and its derivatives in Latvian pine. Proceedings of the 5th Nordic Wood Biorefinery Conference, March 25 - 27, **2014**, Stockholm, Sweden, pp. 259 - 260.
12. Ponomarenko, J., Dizhbite, T., Lauberts, M., Volperts, A., Dobeles, G., Telysheva, G. Analytical pyrolysis - a tool for revealing of lignin structure - antioxidant activity relationship. Abstracts of 20th International Symposium on Analytical and Applied Pyrolysis, PYRO2014, May 19 - 23, **2014**, Birmingham, UK, p. 58.
13. Lauberts, M., Ponomarenko, J., Dizhbite, T., Telysheva, G., Viksna, A. Fractionation of kraft lignin from hardwood for its valorization as antioxidant. EcoBalt2013, October 25 - 27, **2013**, Vilnius, Lithuania, pp. 57.

PATEICĪBAS

Promocijas darba autors izsaka īpašu pateicību zinātniskā darba vadītājiem: LV KĶI vadošajai pētniecei *Dr. habil. chem.* Tatjanai Dižbitei un *Dr. chem.*, prof. Arturam Vīksnam par nenovērtējamu atbalstu, konsultācijām, padomiem un uzmundrinājumiem darba izstrādes gaitā un publikāciju tapšanas procesā.

Liels paldies LV KĶI Lignīna ķīmijas laboratorijas vadītājai *Dr. habil. chem.*, Gaļinai Teliševai par neatsveramu atbalstu un palīdzību zinātnisko pētījumu veikšanas procesos, datu interpretācijā, kā arī iedvesmā un motivēšanā pilnveidot savas zināšanas attīstot prasmes, nekad neapstājoties pie sasniegtā.

Autors pateicas visiem, kas palīdzējuši sasniegt darba rezultātus, īpaši Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes *Dr. habil. chem.*, prof. Andrim Zicmanim, LV KĶI pētniecei *Dr. chem.* Jevgenijai Ponomarenko, Kauņas Tehniskās Universitātes Ķīmiskās tehnoloģijas fakultātes *Dr. chem.*, prof. Rimantam Venskutonim, Stokholmas Karaliskā Tehnoloģiju Institūta (KTH) *Dr. chem.*, Olenai Sevastjanovai, RSU *Dr. med.*, prof. Jeļenai Krasilņikovai.

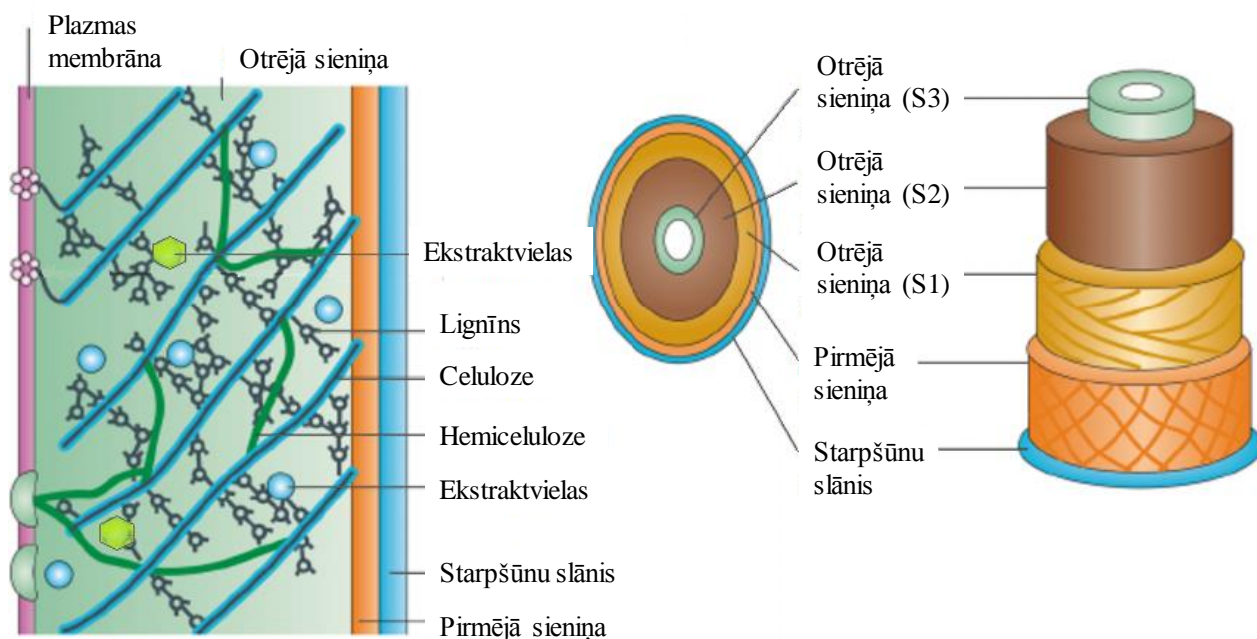
Sirsnīgi pateicos LV KĶI Lignīna ķīmijas laboratorijas kolektīvam, īpaši Vilhelmīnei Jurkjānei un Lilijai Jašinai.

Neizsakāmi liels paldies manam dēlam, sievai, vecākiem, brālim un māsām par neizsīkstošo pacietību, atbalstu un sapratni visu šo gadu garumā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Augu biomasa, kā vērtīga izejviela vērtīgu polifenolu ieguvei

Pazīstamie atjaunojamie resursi mūsdienu sabiedrībai visvairāk asociējas ar saules un vēja enerģiju, nereti augu biomasu atstājot novārtā. Augu biomasa ir vēsturiski senākais atjaunojamais enerģijas ieguves avots, ko izsenis izmantojusi cilvēce enerģijas ieguvei un veselības aprūpē - etnomedicīnā. Biomasa ir atjaunojams resurss, kas reprezentē atjaunojamas izejvielas plašam spektram biomateriālu. Augu biomasa ir universāls resurss ar potenciālu pielietojumu aizstāt neatjaunojamus fosilos resursus biodegvielas (biokurināmo), biopolimēru un bioķīmikāliju ražošanā [1]. Pat ņemot vērā, ka augu biomasas materiāli, kā piemēram, lignocelulozes materiāli, ir plaši izplatīti, to izmantošana ilgtspējīgā veidā vēl joprojām ir ierobežota. Biomasas - bāzētiem produktiem tuvākajā nākotnē būs liels tirgus potenciāls. Piemēram, Amerikas Savienotajās Valstīs nacionālā vīzija ir izmantot biomasu kā izejmateriālu 25 % ķīmikāliju ražošanai, kas tiks saražotas līdz 2030. gadam [2]. Lai palielinātu biomasas īpatsvaru ķīmikāliju ražošanā, ir nepieciešams attīstīt tās efektīvu rafinēšanu. Augu biomasas rafinēšana, zināma kā biorafinēšana, tiek klasificēta kā ilgtspējīga atjaunojama videi draudzīga alternatīva naftas rafinēšanai [1, 3]. Pamatojoties uz nacionālo atjaunojamās enerģijas laboratoriju [4], biorafinēšana ir definēta kā "spēja integrēt biomasas konversijas procesus un aprīkojumu, lai ražotu biomasas produktu klāstu kā degvielu, enerģiju un ķīmikālijas". Augu biomasu veido strukturālie pamatkomponenti: celuloze, hemiceluloze, lignīns un nestrukturālie komponenti: blakus vielas, kuras neveido koksnes šūnu struktūru, bet tikai piepilda šūnu "tukšumus" ir ekstraktvielas, dažādas ūdenī un citos šķīdinātājos šķīstošas organiskas vielas kā arī neorganiskas vielas. Atkarībā no augu biomasas veida strukturālie pamatkomponenti veido nenoteiktu trīsdimensionālu struktūru ar dažādu pamatkomponentu relatīvo sastāvu, skatīt 1.1. attēlā. Ekstraktvielas ir unikālas tādā ziņā, ka katrai koku sugai tās pēc sava ķīmiskā sastāva ir atšķirīgas un tās var noderēt par sava veida "vizītkarti" katrai koku sugai. Ekstraktvielu dažāda sastāvs un saturs variē atkarībā no koku sugas, augšanas vietas un citiem apstākļiem.



1.1.att. Koksnes shematiskā struktūra [5]

Augu biomasas matrica ir trīs mijiedarbību rezultāts, ko veido lignīna ūdeņraža saites, lignocelulozes saites un lignīna ētera un C-C saites [6]. Tādējādi absolūti selektīva koksnes materiālu destrukcija nav iespējama, piemēram, kokaugu biomasai galvenokārt raksturīga lēna augšana, un tās sastāvu veidojošās šķiedras ir stingri saistītas, veidojot ļoti blīvu un stingru auga pamatstruktūru, turpretī zālaugu biomasu raksturo ātrāka augšana, un tās sastāvu veidojošās šķiedras ir brīvāk saistītas. Tas ir izskaidrojams ar lignīna saturu šajos augu biomasas materiālos. Jo vairāk lignīns ir saistīts ar celulozi, jo stingrāka auga struktūra. Relatīvais celulozes un lignīna saturs ir noteicošais faktors augu sugām, lai tās izmantotu kā enerģijas kultūru. Kā piemēru var minēt etanola bioķīmisko iegūvi no biomasas, tradicionāli izmanto cukura/cietes saturošu izejvielu, piemēram zālaugus. Celuloze tiek pārvērsta glikozē, izmantojot, piemēram, skābes/enzimātisko hidrolīzi, kam seko glikozes fermentācijas process, iegūstot etanolu. Biomasai ar lielāku celulozes un mazāku lignīna saturu ir vieglāk konvertēt šos procesus [7, 8].

Viens no visvairāk izplatītākajiem un daudzveidīgākajiem dabas materiāliem ir koksne, tā iedalās divās plašās grupās: skuju kokos un lapu kokos. Abu koku veidi sastāv no sekojošām morfoloģiskajām daļām: celmu/sakņu daļas, stumbra (sastāv no koksnes un mizas), koku vainaga (dzīva/atmiruša zara), zaļeņa (lapas/skujas), ziediem un augļiem [9].

Augu biomasu galvenokārt iedala četros veidos [10 - 13]:

- Kokaugos;
- Zālaugos/graudzālēs;

- Īdensaugos;
- Augu biomasas pārstrādes blakusprodukti:

Lignocelulozes saturoši materiāli, piemēram zemas vērtības mežsaimniecības un lauksaimniecības atlikumi, ir daudzsološa izejviela pievienotās vērtības produktu ieguvei. Kaut gan daži produkti, galvenokārt, biodegviela, tiek iegūta no lignocelulozes saturošām izejvielām, tomēr pastāv vairākas iespējas izmantot tās potenciālu pilnīgāk, iegūstot plašāku spektru ar produktiem. Šāda atkritumvielu pārstrāde dod iespēju uzlabot dažādu tautsaimniecības nozaru kompetenci, kā piemēram, integrēt šo pieeju tradicionālajās celulozes un papīra ražotnēs [14, 15].

No augu biomasas iegūtie polifenolu savienojumi, galvenokārt, atrodas ekstraktvielās. Liels daudzums ekstraktvielu koncentrējas mizā, zaļēnī, saknēs, savukārt koksne ekstraktvielu saturs, salīdzinājumā ar citām augu morfoloģiskajām daļām, ir mazs, tomēr atzarojumu vietās koksne var koncentrēt ievērojams daudzums ekstraktvielu, galvenokārt fenola savienojumi, tāpēc to daudzums atzarojumu vietu koksne ir ievērojami lielāks nekā citās koksnes morfoloģiskajās daļās [16]. Ekstraktvielu daudzums dažādās koku sugu mizās var veidot pat vairāk kā 40 % no sausnas. Vidēji koku mizās polārās ekstraktvielas (tanīni, polifenoli, glikozīdi u.c.) ir divas līdz piecas reizes vairāk, nekā nepolārās vielas (vaski, taukvielas, terpēni u.c.). Ekstraktvielu saturs un sastāvs ir atkarīgs no koku sugas, gadalaika, koka augšanas vietas, klimatiskajiem apstākļiem un citiem faktoriem.

Skatoties uz naftas produktu ieguvei un patēriņu mūsdienās, kā arī ņemot vērā, ka tiek apgūtas jaunas naftas ieguves iespējas un vietas, tā tiks plaši izmantota arī tuvākajā nākotnē [17]. Fosilās izejvielas ir plaši izmantots enerģijas un ķīmikāliju ieguves avots visā pasaulē [18]. Izvērojot šo resursu plašo izmantošanu un nelabvēlīgo ietekmi uz apkārtējo vidi, šis faktors pēdējos gados aktualizē bioekonomikas jautājumu visā pasaulē par nefosilo (augu biomasas) atjaunojamo izejvielu izmantošanu, lai to pārvērstu pievienotās vērtības produktos, arī enerģijas un ķīmikāliju ieguvei, izmantojot inovatīvus un efektīvus paņēmienus [19]. Bioekonomika paredz augu biomasas noslēgta cikla apriti. Ņemot vērā, ka Latvijā nav fosilo resursu ieguves, tad nozīmīgi ir attīstīt bioekonomiku Latvijā, jo Latvijas tautsaimniecības spēcīgākās nozares ir mežsaimniecība un lauksaimniecība. Tāpēc augu biomasas izmantošanas pielāgošana pievienotās vērtības produktu ieguvei ir viena no galvenajām risināmajām problēmām 21. gadsimtā [20].

Papildu ekonomiskai nepieciešamībai pēc naftas izejvielu nomaiņas ar citiem resursiem, kā alternatīvu izmantojot augu biomasu, kas ir atjaunojams resurss, iegūtu arī labvēlīgu ietekmi uz vidi, visizteiktāk tiktu samazināts gāzu siltumnīcas efekts pasaulē. Ja salīdzina enerģijas ieguvei no neatjaunojamiem resursiem, augu biomasu ir alternatīva un svarīga izejviela. Tā

pieejama lielos apjomos, ir atjaunojama un nerada CO₂, kā arī citus kaitīgus gāzu izmešus, salīdzinot ar fosilo kurināmo, pie noteikuma, ja to efektīvi pārstrādā. Eiropas komisija ir izvirzījusi ilgtermiņa mērķi attīstīt konkurētspējīgu, resursu efektīvu un zema oglekļa emisijas ekonomiku līdz 2050. gadam. Šī „zaļā” ekonomikas koncepcija tiks iekļauta visā Eiropas Savienības politikā. „Zaļo” ekonomiku definē kā zemas oglekļa emisijas, atjaunojamo resursu efektīvas pārstrādes un sociāli integrētas sabiedrības shēmas izveidi, lai uzlabotu cilvēka labklājību, vienlaikus samazinot apkārtējās vides riskus [21]. Būtisks faktors ir biomasas pieejamība, tādēļ tās cena ir mazākā mērā atkarīga no politiskās nestabilitātes pasaulē [22, 23]. Šobrīd visplašāk, lai iegūtu vērtīgus produktus, tiek izmantota augu biomasas, kas sevī iekļauj koksni un no pārtikas augiem iegūtu biomasu [24, 25].

Augu biomasas ķīmiskā aspektā ir ļoti daudzveidīgs materiāls, salīdzinot ar naftas izejvielu, tās sastāvs nav viendabīgs, skatīt 1.1. tabulu. Tā kā augu biomasas izejvielas ir dažādas, tad arī to ķīmiskās kompozīcijas ir dažādas, un sastāv, galvenokārt, no C, H, O dažādās attiecībās, kā arī no citiem savienojumiem, kā N un S saturošiem savienojumiem. Augu biomasas ir ļoti heterogēns maisījums, kas padara to par sarežģītu objektu ar priekšrocībām un trūkumiem, salīdzinot ar fosilām izejvielām, piemēram, no augu biomasas var iegūt lielāku produktu skaitu, salīdzinot ar naftas izejvielu, bet tas prasa daudzveidīgāku pārstrādes tehnoloģiju, pie kā mūsdienās aktīvi strādā liels skaits zinātnieku lielā daļā attīstīto valstu, lai atrisinātu šīs problēmas [26].

1.1. tabula

Augu biomasas un naftas kompozīcijas salīdzinājums [26]

	Augu biomasas, %	Nafta, %
Ūdens	15	-
Celuloze	32 - 45	-
Hemiceluloze	22 - 27	-
Lignīns	17 - 28	-
Ekstraktvielas	3 - 13	-
Pelni	0,3 - 10	-
C	44 - 50	83 - 87
H	5	10 - 14
O	38 - 42	0,1 - 1,5
N	Līdz 0,6	0,1 - 2
S	Līdz 0,7	0,5 - 6

Komponentsastāvs un to savstarpējā attiecība var būt ļoti atšķirīga, atkarībā no tā, kāda augu biomasas tiek izmantota, kurā gadalaikā ievākta, no kuras koka morfoloģiskās daļas iegūta un pat vēl vairāk no kādas augšanas vietas tā ir ievākta [24, 27 - 29].

Lielākā daļa no izstrādātajām metodēm, vērtīgu ķīmikāliju ieguvei no augu biomasas, izmanto procedūras un šķīdinātājus, kuri nekādi nav klasificējami kā videi draudzīgi. Līdz ar to

ir nepieciešams izstrādāt izmaksu ziņā lētu, videi draudzīgu un energoefektīvu veidu augu biomasas pārstrādei, lai iegūtu vērtīgas ķīmikālijas. Optimāla polifenolu, kas ir promocijas darba mērķsavienojumi, ieguves metode būtu videi draudzīga, ar mazu šķīdinātāju patēriņu, ātra un selektīva, kas dotu lielu ražību īsā laikā. Tomēr šādas universālas metodes nav pieejamas, tādēļ ir nepieciešams rast kompromisu metodi mērķsavienojumu/enerģijas ieguvei no augu biomasas.

1.2. Augu izcelsmes polifenolu izmantošana

Dzīvnieku valsts organismi, atšķirībā no augiem, spēj pārvietoties un primāri sevi aizsargāt no potenciālām briesmām, savukārt augiem nav šo spēju, tāpēc evolūcijas gaitā tie paši ir izstrādājuši aizsardzības mehānismus, lai cīnītos ar nevēlamu iedarbību uz tiem. Šo aizsardzības mehānismu nodrošina augos sintezētie sekundārie metabolīti, galvenokārt fenola tipa savienojumi. Fenola savienojumi ir vērtīgas vielas, kuras dabā atjaunojas līdz ar augu biomasu. Pēdējā laikā ļoti liela uzmanība tiek pievērsta tieši biomasas atlikumiem, īpaši augu un lauksaimniecības atlikumiem, kā polifenolu savienojumu izejvielai ar augstu antioksidanto aktivitāti. Šiem savienojumiem ir augsts potenciāls tikt piedāvātiem kā cilvēku uzturā lietojamiem un veselību veicinošiem antioksidantiem [30]. Lauksaimniecības rūpnieciskie notekūdeņi galvenokārt vīna darītavu un vīnogu pārstrādes notekūdeņi [31], kā arī olīvu pārstrādes notekūdeņi tiek uzskatīti par visizplatītākajiem avotiem, kuri ir bagāti ar vērtīgiem fenolu savienojumiem [32].

Polifenolu savienojumi augos parasti vislielākajās koncentrācijās ir zaļenī, mizā un saknēs, kā arī ļoti lielā daudzumā koncentrējas atzarojumu vietās koksnē un mazākā daudzumā koncentrēti savienojumi atrodas arī kodolkoksē [33, 34].

Primārā augu biomasas polifenolu savienojumu funkcija ir nodrošināt auga aizsardzību pret apkārtējās vides kaitīgo ietekmi: zālējūdzem, kukaiņiem, mikroorganismiem, ieskaitot baktērijas, sēnītes un vīrusus, aizsardzība pret citiem augiem, konkurējot par barības vielām un gaismu, kā arī pret UV starojumu. Augu izcelsmes izejvielas ir dabas polifenolu ieguves avots, kas ir dominējošie aktīvie komponenti, un šos augus cilvēce izmanto jau no civilizācijas aizsākumiem kā uzturu un tautas medicīnas līdzekļus. Pasaules atšķirīgos reģionos dzīvojošās civilizācijas ir uzkrājušas pieredzi un zināšanas par dažādu dabas produktu bioloģisko aktivitāti un medicīnisko potenciālu. Vecākie medicīniskā satura raksti nāk no senās Mezopotāmijas ap 2600. gadu pirms mūsu ēras. Tie apraksta ap 1000 augu un no augiem izdalītas vielas, piemēram eļļu no ciedras vai no magoņu sēklām iegūtu sulu. Hipokrāts ir apkopojis aptuveni 400 dabas izcelsmes augu un aprakstījis to pielietojumu medicīnā, kā piemēram, melones sulas izmantošana kā caurejas līdzekli vai beladonnas iegūtā ekstrakta izmantošana kā anestēzijas

līdzekli [35, 36]. Daudzus no šiem augiem izmanto tieši tāpat arī mūsdienās. Mūsu senči, lai mazinātu sāpes, košļāja noteiktus augus, vai, lai uzlabotu dažādu brūču dzīšanu, tās aptina ar dažādu augu daļām. Mūsdienās tik labi zināmās dabas medicīnas izmantošana ārstēšanā un veselības uzlabošanā, kā no Indijas nākusi arjurvēda un ķīniešu tradicionālā medicīna, izmanto vienīgi un tikai dabas izcelsmes izejvielas. Neskatoties uz augu izejvielu plašo izmantošanu, atkarībā no vajadzībām, tika runāts tikai par augu, jo nebija vēl zināšanas par to ķīmisko sastāvu līdz 18. un 19. gadsimtam, kad strauji attīstījās modernā ķīmija. Attīstoties analītiskās un struktūras ķīmijai, kas ļāva noteikt dabas izcelsmes savienojumu struktūras, ļāva spriest par šo savienojumu ietekmi uz cilvēka organismu. 1805. gadā vācu farmaceits Fridrihs Vilhelms Sertners (1783 - 1841) pirmais izdalīja morfiju no opija un tas kļuva par pirmo izdalīto medicīnas preparātu no dabas vielām. Dabas produkti tūkstošiem gadu bija vienīgie medicīnas un veselību veicinošie līdzekļi. Attīstoties ķīmiskai rūpniecībai 20. gadsimtā, pasauli pārņēma sintētiskie materiāli, kas atstāja novārtā dabiskos izejmateriālus [37, 38]. Pēdējo gadu pētījumi ir parādījuši, ka no dabiskiem avotiem izdalītie savienojumi labvēlīgāk ietekmē dzīvos organismus, nekā to sintezētie analogi. Tas skaidrojams ar dabā esošo savienojumu savstarpējo mijiedarbību, bioloģiskās aktivitātes pastiprināšanu, kur viens savienojums, pat niecīgā daudzumā, pastiprina cita savienojuma darbību, un šis fenomens ir atjaunojis interesi izmantot dabas izcelsmes izejvielas dažādu zāļu izveidē [39].

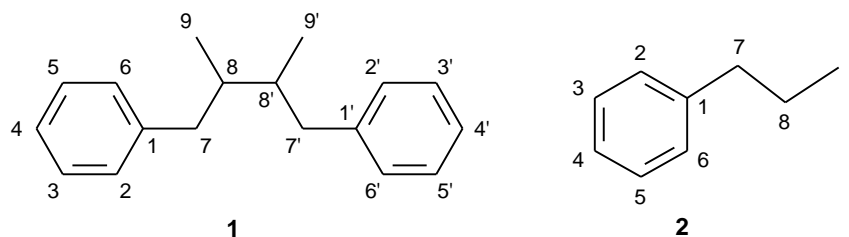
1.3. Zemmolekulārie polifenolu savienojumi augu biomasā

Īpaši koku miza un kodolkoksne satur plašu skaitu aromātiskas dabas ekstraktvielu, lielākā daļa no tām ir fenolu savienojumi, un daudzi ir atvasināti no fenilpropanoīdu struktūras. Vārds "ekstraktvielas" ir kopīgs apzīmējums ļoti plašai augu biomasas ķīmisko savienojumu grupai, vielām, kuras ir šķīstošas neitrālos šķīdinātājos vai ūdenī. Polifenolu savienojumi ir vieni no nozīmīgākajiem augu ekstraktvielu savienojumiem, jo tiem piemīt daudzpusīga spēja aizsargāt augus [39, 40]. Vairāki tūkstoši fenolu savienojumu ir identificēti un plaši izplatīti augu polifenolu savienojumi, kā lignāni, flavanoīdi, stilbenoīdi, diarilheptanoīdi, arī tanīni ir zināmi savienojumi ar veselību veicinošu ietekmi. Lielā mērā augu ekstraktu bioloģiskā, t.sk. antioksidantā aktivitāte, tiek saistīta ar polifenolu savienojumu esamību augu biomasā. To spēja deaktivēt brīvos radikāļus samazina riskus saslimt ar slimībām, ko tie izraisa. Polifenolu savienojumi piesaista uzmanību, pateicoties to labvēlīgajai iedarbībai uz cilvēku. Ir pierādīts, ka iekļaujot tos uzturā, tie veicina veselības uzlabošanu, kā piemēram, palīdz cīņā pret dažādām slimībām, kā vēzi, insultu un daudzām citām. Tie ir visplašāk lietotie antioksidanti cilvēku uzturā. Tiek lēsts, ka cilvēks dienā patērē aptuveni vienu gramu dažādus polifenolu savienojumus [30]. Polifenolu savienojumiem ir svarīga nozīme augu attīstībā, augšanā un

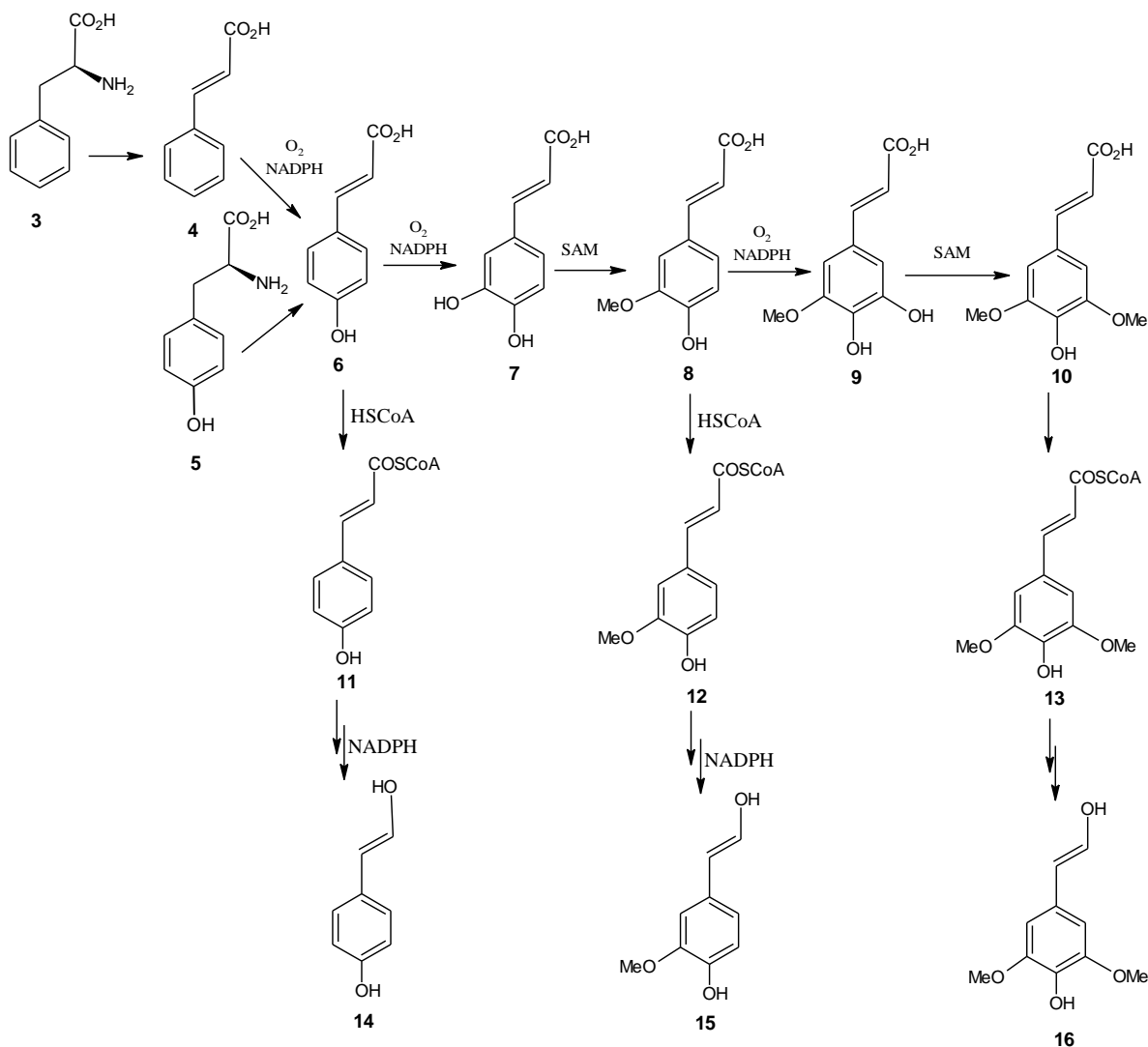
aizsardzības mehānismu nodrošināšanā pret infekcijām un bojājumiem. Ir pierādīts, ka daudzi polifenolu savienojumi ir spēcīgāki antioksidanti par C un E vitamīniem [41, 42]. Polifenoli tiek iedalīti vairākās grupās, gan pēc fenola gredzenu skaita, gan pēc struktūras, kas saista šos gredzenus, un izcelsmes avota, utt. Galvenās augu fenolu klases ir: fenolskābes, stilbēni, lignāni, flavanoīdi, tanīni, diarilheptanoīdi un to atvasinājumi, u.c. Tālāk apskatītas polifenolu savienojumu grupas, kas ir pētītas promocijas darbā, ir cieši saistītas ar Latvijā iegūstamu izejas materiālu pieejamību, tos padarot par pievienotās vērtības produktiem:

1.3.1. Lignāni

Termins lignāns pirmo reizi ir minēts 1948. gadā kā dimērs fenilpropanoīds, kur divas C₆-C₃ grupas ir saistījušās ar C₈ oglekļa atomiem. Lignāni veidojas enzīmu kontrolē oksidatīvi dimerizējoties divām fenilpropāna vienībām (skatīt 1.2. attēlā.), tās ir polifenolu dabas ekstraktvielas, kuras izdala no augiem ar karstu ūdeni, polāriem šķīdinātājiem (etanolu), sārnu. Lignāni ir svarīga augu biomasas sekundāro metabolītu klase. Šo klašu struktūru un bioloģisko aktivitāšu klāsts ir plašs. Aktīvi tiek veikti šo grupu bioloģiskie pētījumi, tie uzrāda spēcīgu pretiekaisumu, pretvīrusu, antioksidantu efektu un potenciālu kā pretvēžu līdzekļu radīšanai, jo tie spēj inhibēt noteiktus enzīmus, kas atbild par konkrētu slimību izraisīšanu [43, 44]. Pēdējos gados ir parādīts ka šo grupu pārstāvji nav genotoksiski un tiem piemīt neuro aizsargājošs efekts [45]. Nosaukums jau norāda uz šo vielu radniecību lignīnam, jo to abu struktūras pamatā ir metoksilētas fenilpropāna vienības jeb monolignoli, norādot, ka šo sekundāro metabolītu biosintēzes pirmie posmi ir vienādi [46]. 1.3. attēlā redzams, kā no aromātiskām aminoskābēm L -fenilanalīna (**3**) un L - tirozīna (**5**), kas sintezējušies no šikīmskābes, tālāk tiek iegūti kanēļskābes atvasinājumi. Šo kanēļskābju atvasinājumu reducēšanā iesaistās koenzīms A, tos pārvēršot trīs spirtu formās *p*-kumarilspirtā (**14**), koniferilspirtā (**15**) un sinapilspirtā (**16**).



1.2. att. Lignāna (**1**) un fenilpropāna vienību (FPV) veidojoša struktūra (**2**)



1.3. att. Hidroksikanēļskābju spirtu monomēru biosintēze, prekursori lignānu un lignīnu biosintēzei

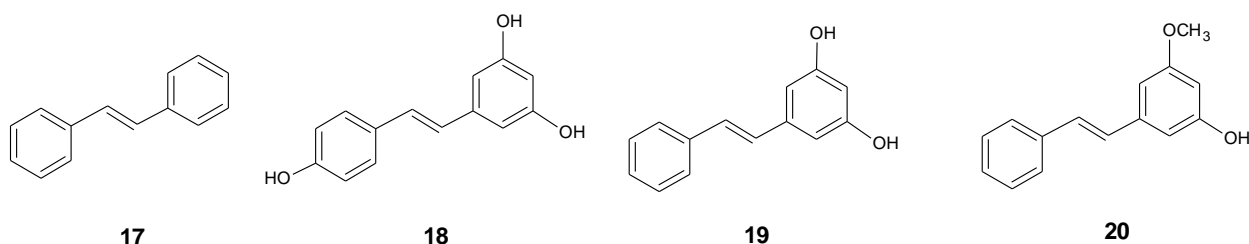
3- L - fenilalanīns, 4- kanēļskābe, 5- L - tirozīns, 6- *p* - kumarīnskābe, 7- *trans* - kofeīnskābe, 8- ferulskābe, 9- 5 - hidroksiferulskābe, 10- sinapīnskābe, 11- *p* - kumarilCoA, 12- ferulCoA, 13- sinapilCoA, 14- *p*-kumarilspirts, 15- koniferilspirts, 16- sinapilspirts

Lignāni ir fenilpropānu dimēri, bet lignīnā šīs vienības ir saistītas lielmolekulārā struktūrā. Lignānu aromātiskie atlikumi var būt vienādi abām fenilpropāna vienībām vai arī dažādi. Raksturīgākā saite starp fenilpropāna vienībām lignānos ir 8-8' (β - β') saite propāna sānu ķēdē (skatīt 1.2. attēlā (1)). Saskaņā ar literatūru [47] lignāni atrodas vairāk kā 60 vaskulāro augu grupās un ir izdalīti no dažādām morfoloģiskām daļām. Lignānus var uzskatīt par sava veida lignīna zemmmolekulāru atzaru. Oligolignāni var saturēt trīs, četras, piecas vai vairāk fenilpropāna vienības [48].

1.3.2. Stilbenoīdi

Stilbenoīdi arī ir augu biomasas sekundārie metabolīti, hidroksilēti stilbēnu atvasinājumi (skatīt 1.4. attēlā), kuru pamatstruktūru veido 1,2-difeniletilēna vienība (C₆-C₂-C₆) un ir raksturīga zema molekulmasa (200 - 300 g·mol⁻¹). Augos stilbenoīdi veic aizsardzības aģentu lomu pret vīrusiem un mikrobu infekcijām, pārlietu lielu UV starojumu un dažādām augu slimībām, tādēļ šo savienojumu biosintēze tiek īpaši aktivizēta biotisko un abiotisko stresu gadījumos. Tiem ir raksturīga augsta pretmikrobu un antibakteriālā aktivitāte, pateicoties tam šos savienojumus plaši izmanto veselības veicinošu līdzekļu ieguvei, kā bioloģiski aktīvās sastāvdaļas. Šo savienojumu grupas pazīstamākais pārstāvis ir resveratrols, kam ir pierādīta pretvēža, pretiekaisuma un augsta antioksidantā aktivitāte [49].

Bagātīgs dabas stilbenoīdu avots ir priedes koksne, tās kodolkoksnē var saturēt līdz pat 2 % un atzarojumu vietas koksnē līdz pat 5 % stilbenoīdu [50, 51]. Šo savienojumu iegūvi no priedes apgrūtina lipofīlie savienojumi, tādēļ ir ieteicams veikt secīgu ekstrakciju, lai iegūtu ekstraktus ar lielāku stilbenoīdu koncentrāciju.



1.4. att. Stilbēna (17), resveratrola (18), pinosilvīna (19) un pinosilvīna monometilētera (20) struktūrformulas

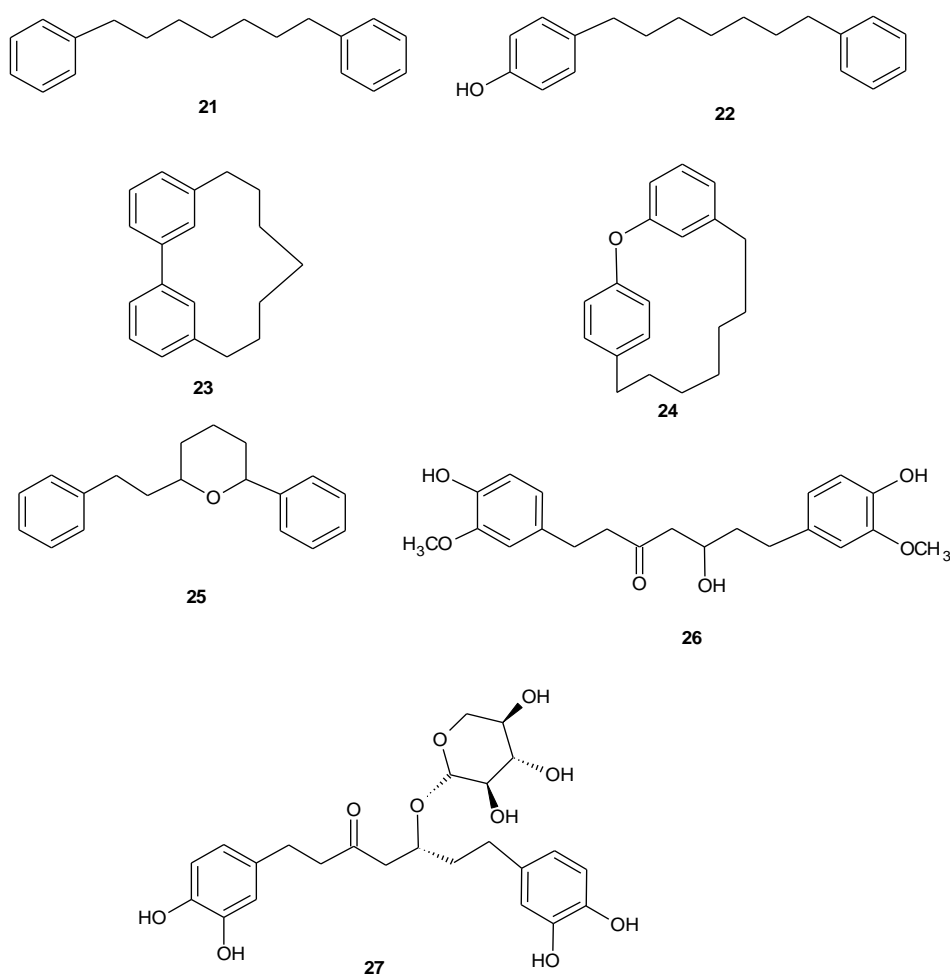
Darbā tuvāk ir apskatīti priedēs dominējošie stilbenoīdi - pinosilvīns (19) un pinosilvīna monometilēteris (20). Pēc struktūras tie ir līdzīgi resveratrolam (18), pētījumi liecina, ka tiem piemīt spēcīgāka bioloģiskā, antibakteriālā un pretsēnīšu aktivitāte [52].

1.3.3. Diarilheptanoīdi

Diarilheptanoīdi ir savienojumu grupa, kas sastāv no 1,7-difenil heptāna skeleta. Balstoties uz to ķīmisko struktūru, diarilheptanoīdus iedala piecās grupās: skatīt 1.5. attēlu.

- ne-fenola lineārie diarilheptanoīdi (21);
- fenolu lineārie diarilheptanoīdi (22);
- makrocikliskie diarilheptanoīdi (23);
- makrocikliskie diarilētera heptanoīdi (24);
- diarilheptanoīdi, kas ciklizēti C₇ ķēdē (25).

Lineāros fenolu diarilheptanoīdus vēsturiski sauc par kurkuminoīdiem, un zināmākais šīs klases pārstāvis ir kurkumīns (**26**), kas savu nosaukumu ieguvis 1815. gadā, kad to pirmo reizi izdalīja no kurkuma (*Curcuma longa*) saknēm. To plaši izmanto jau izsenis dažādās jomās, kā piemēram, tas ir sen zināms līdzeklis Ajūrvēdas medicīnā [53, 54], kosmētisko un medicīnisko preparātu sastāvā un kā pārtikas piedeva ar marķējumu E-100 [55]. Diarilheptanoīdi pētījumos aizvien vairāk pierāda sevi kā daudzsoļu terapeitisko līdzekļu aktīvo sastāvdaļu, jo iesaistās daudzos fizioloģiskos procesos, kā piemēram, pretiekaisuma, pretaudzēju, estrogēnu, aknu darbības, nervu sistēmas u.c. darbību uzlabošanā [56, 57]. Promocijas darbā tuvāk tiek apskatīts diarilheptanoīds - oregonīns (**27**) (1.5. attēlā), kas ir plaši pazīstamā savienojuma - kurkumīna (**26**) analogs.



1.5. att. Diarilheptanoīdu struktūrformulas

Diarilheptanoīdi galvenokārt ir sastopami bērzu (*Betula*) un alkšņu (*Alnus*) dzimtas kokos, galvenokārt koncentrējoties to mizās. Dažādās alkšņu sugās, kā sarkanajā alksnī (*Alnus rubra*), Japānas alksnī (*Alnus japonica*) u.c., ir izdalīti un identificēti dažādi diarilheptanoīdi, gan kā glikozīdi, kur cukura atlikums pievienots pie alifātiskās ķēdes piektā oglekļa, gan kā diarilheptanoīdu glikozīdi ar vairākiem cukura atlikumiem, gan kā diarilheptanoīdi bez cukura

atlikumiem [58 - 60]. Savukārt mūsu platuma grādos augošos alkšņu sugas, kā baltalksnis (*Alnus incana*) un melnalksnis (*Alnus glutinosa*) nav tik labi izpētītas kā citas alkšņu sugas citviet pasaulē, tāpēc darbā ir pētīti tieši mūsu platuma grādos augošie alkšņi. Ir pierādīts, ka vairums šie fenolu savienojumu augos veic dažādas aizsargfunkcijas. Bojātos augu audos tie pārveidojas par aktīvām aizsargvielām.

1.4. Lielmolekulārie augu polifenolu savienojumi

Tāpat kā zemmmolekulārie biomasas savienojumi, arī lielmolekulārie biomasas polifenolu savienojumi sastāv no fenola atvasinājumiem, veidojot sarežģītākas struktūras savienojumus ar lielu molekulāro masu. Darbā ir izpētīti lignīns un kondensētie tanīni, kaut gan pašlaik lignīni netiek izmantoti adekvāti to potenciālai vērtībai. Pieaugot sabiedrības satraukumam par mazmolekulāro sintētisko antioksidantu ietekmi uz cilvēku veselību un toksicitāti, pasaulē aizvien vairāk pieaug pieprasījums pēc dabisko antioksidantu lietošanas, un šeit lielu lomu spēlē tieši lielmolekulārie augu biomasas savienojumi, kā lignīns.

1.4.1. Lignīns

Lignīns ir aromātisks polimērs ar neregulāru struktūru, ko veido monolignoli, nejauši saistoties, t.sk. dažādām saitēm saistot kopā metoksil aizvietotas fenilpropāna vienības. Prekursori lignīna biosintēzei ir *p*-kumarilspirts (**14**), koniferilspirts (**15**) un sinapilspirts (**16**) (1.3. attēlā) [61, 62]. Lignīnu, galvenokārt, var iedalīt trīs grupās atkarībā no izcelsmes avota: skujkoksnes, lapkoksnes un graudzāļu. *p*-kumarilspirts procentuāli dod vismazāko ieguldījumu kā prekursors skujkoksnes un lapkoksnes lignīna biosintēzei. Koniferilspirts ir galvenais prekursors skujkoksnes lignīna biosintēzei, savukārt koniferilspirts un sinapilspirti ir galvenie prekursori lapkoksnes sastāvā esošā lignīna biosintēzei, tāpat atkarībā no izcelsmes avota ir atšķirīgi citi parametri, kā funkcionālo grupu atšķirības un galveno veidojošo saišu tipi, skatīt 1.2. tabulu [63].

1.2. tabula

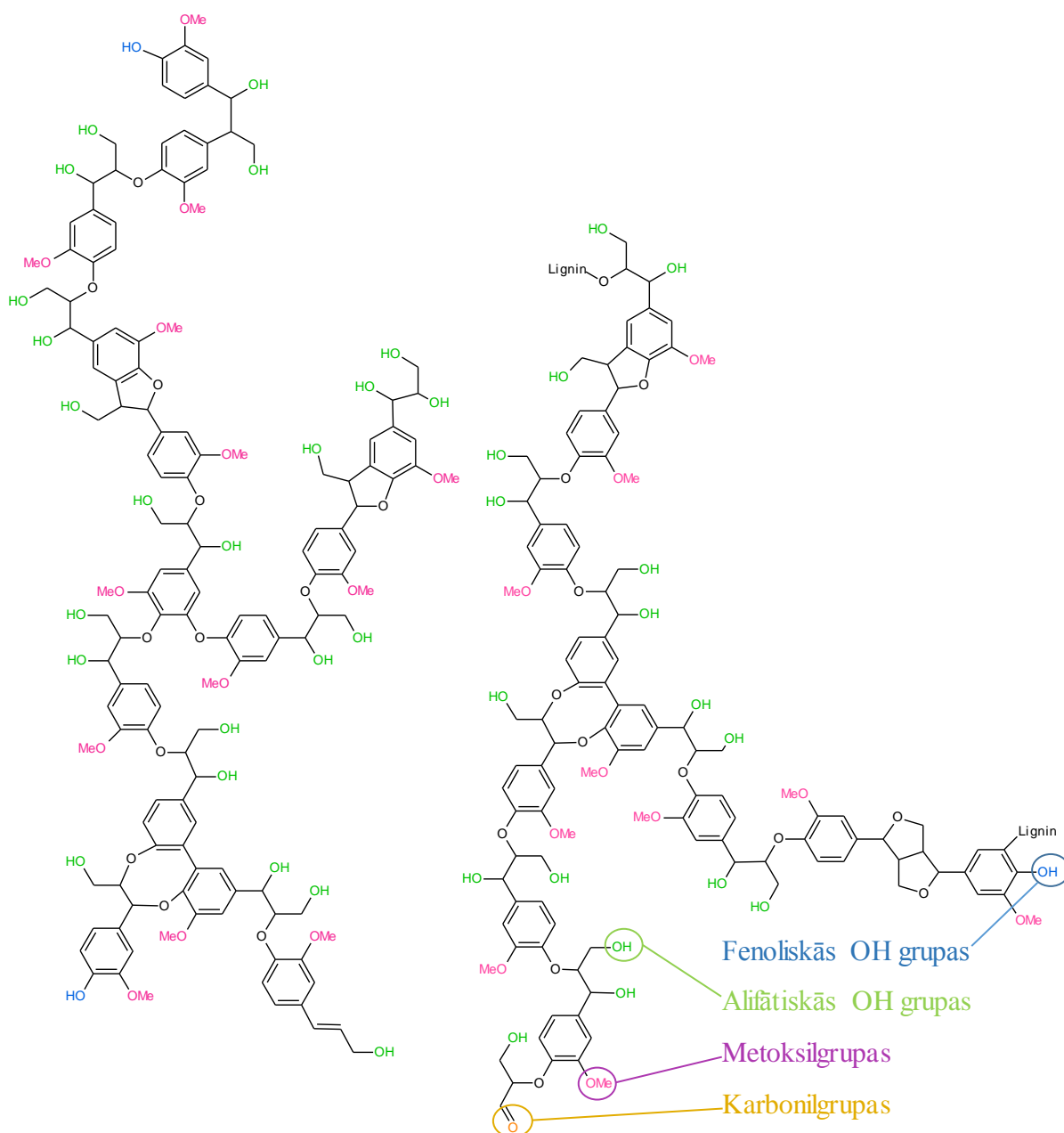
Lignīna galveno veidojošo monolignolu saturs (%) dažādas izcelsmes lignīnos

Izcelsme	<i>p</i> -kumarilspirts (14)	koniferilspirts (15)	sinapilspirts (16)	-OCH ₃ uz 100 C ₆ C ₃ vienībām
Skujkoksne	4	95	1	92 - 97
Lapukoksne	≈ 2	≈ 50	≈ 50	139 - 158
Viengadīgie augi	5	70	25	≈ 100

Šie monolignoli ir savā starpā saistīti ar dažāda veida saitēm, un veidotais polimērs ir ar lielu molekulāro masu.

Dabas lignīns ir aromātisks polimērs, kas ir viens no augu biomasas pamatkomponentiem. Augstākiem augiem lignīns galvenokārt atrodas lamellā un sekundārajā šūnapvalkā un spēlē galveno lomu augu konstrukcijas īpašību veidošanā, dod augiem mehānisko izturību un stingrību, kā arī izturību pret apkārtējās vides nelabvēlīgajiem faktoriem, kā oksidatīvo stresu, mikroorganismu uzbrukumiem u.c. [64]. Lignīna saturs skujkokos variē robežās no 24 līdz 33 %, mērenā zonā augošiem lapkociem robežās no 19 līdz 28 %, savukārt tropos augošiem lapu kociem lignīna saturs ir no 26 līdz 35 %. Viengadīgiem augiem (kultūraugiem) lignīna saturs ir zemāks, svārstās no 3 % kokvilnas, linu un kaņepju lūksnas šķiedrās, no 11 līdz 15 % sisalai un džutai. Stiebrzālēs, kā piemēram, graudu salmos, bambusos un cukurniedrēs lignīna saturs ir no 15 līdz 25 % [65, 66].

No ķīmiskā aspekta lignīns tiek uzskatīts par sarežģītu polifenolu, jo, neskatoties uz daudziem pētījumiem, tā ķīmija un biosintēze nav pilnībā izprasta. Vēl mūsdienās lignīna struktūra nav precīzi definēta, kaut gan jauno fizikāli - ķīmisko metožu attīstīšana polimēru struktūras pētīšanai (piemēram, 2D un 3D NMR metodes) dod zinātniekiem iespēju precizēt dažādu lignīnu uzbūvi, bet vēl ne līdz galam [67]. Viena no jaunākām pamatstruktūrām, kura labi demonstrē saišu un funkcionālo grupu dažādību lignīna makromolekulā, ir parādīta 1.6. attēlā.



1.6. att. Skujkoksnes lignīna struktūra pēc Brunova modeļa

Galvenās funkcionālās grupas lignīna makromolekulā ir alifātiskās un aromātiskās hidroksilgrupas, metoksil- un karbonilgrupas. Galvenais saišu tips (apmēram divas trešdaļas) dabas lignīna struktūrā ir C-O-C ētera saites, kas saista fenilpropāna vienības savā starpā, pārsvārā β -O-4, savukārt viena trešdaļa veido C-C saites starp šīm vienībām [64]. Lignīnam “*in situ*” vistuvākais no izdalītiem lignīniem ir Bjorkmana lignīns (BL). Šis lignīna preparāts būtiski atšķiras no citiem ar to, ka tā izdalīšana notiek bez aktīvu ķīmisku reaģentu (skābes, sārmu, oksidētāju u.tml.) iedarbības. Fitomasas miltus ilgstoši maļ bumbu vibrodzirnāvās inertā vidē, parasti toluola suspensijā, pēc tam ekstrahē ar dioksānu.

Tā kā Bjorkmana lignīns pēc savas ķīmiskās struktūras ir vistuvākais lignīnam “*in situ*”, tas visvairāk tiek izmantots lignīna ķīmiskās struktūras pētījumos. Vienīgais iebildums ir tas,

ka Bjorkmana lignīns neprezentē visu koksnes lignīnu, tā iznākums atkarībā no koka sugas ir 30 - 50 % no lignīna “*in situ*”. Arī jāatzīmē, ka Bjorkmana lignīnu nevar uzskatīt par absolūti neizmainītu protolignīnu, jo tā izšķīdināšana izsauc saišu mehanoķīmisko destrukciju.

Egles Bjorkmana lignīnam ir raksturīgas 15,6 % metoksilgrupu, 2,9 % fenola hidroksilgrupu, 9,3 % alifātisko hidroksilgrupu un 3,1 % karbonilgrupu, savukārt no bērza koksnes izdalītā Bjorkmana lignīna, tā metoksilgrupu saturs ir 21,4 %, kas ir skaidrojams ar 1.2. tabulā esošo lignīna veidojošo monolignolu saturu dažādas izcelsmes kokos.

1.4.2. Tehniskie lignīni

Koksne un citi lignocelulozes saturoši materiāli galvenokārt tiek izmantoti, lai no tiem iegūtu celulozes šķiedras kā izejvielu, galvenokārt, papīra industrijā. Pāri palikušais lignīns ir ķīmiski modificēts šajos celulozes iegūšanas procesos un pārsvarā tiek izmantots enerģijas iegūšanai uz vietas šajās celulozes pārstrādes rūpnīcās [68, 69]. Liela daļa, līdz pat 40 %, no fotosintēzes rezultātā sintezētajiem oglekļa savienojumiem augu biomasā tiek neefektīvi pārstrādāti, un kā gala produkts atmosfērā tiek emitēts CO₂. Attīstoties biorafinēšanas koncepcijai, attīstās arī lignocelulozes biomasas kompleksā pārstrāde, lai iegūtu biodeģvijas un citus vēlamos produktus, kā piemēram, “zaļās” ķīmikālijas un biopolimērus [70].

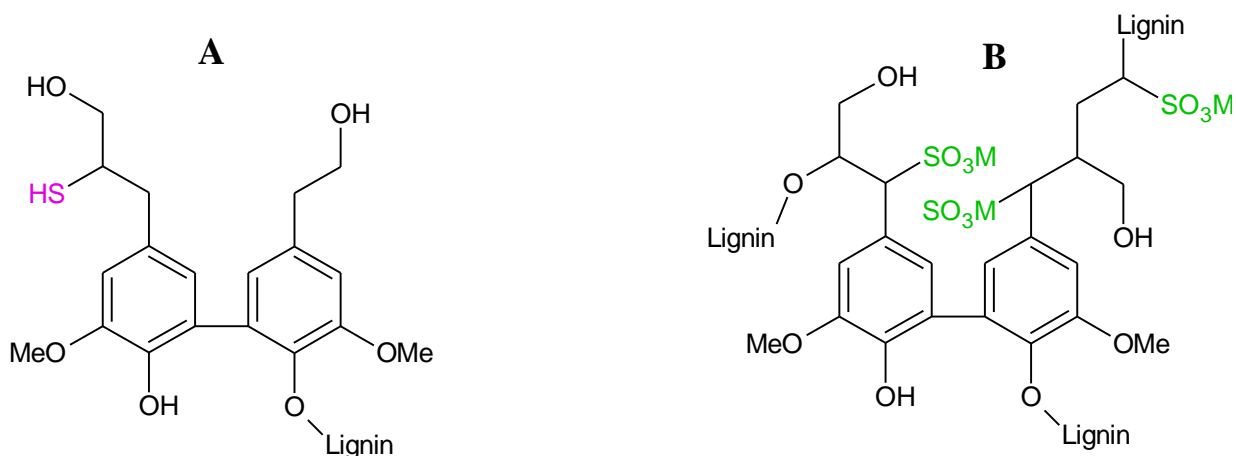
Lignīnu nevar izdalīt no augu audiem, neizmainot tā struktūru. Lignīnu izolēšanas rezultātā pieaug to heterogenitāte. Neizmainītu lignīnu, kas atrodas koksnes šūnu sienīnās, sauc dažādi: “*in situ*”, protolignīns, dabiskais lignīns. Jau 1931. gadā izcilais koksnes ķīmiķis K. Freudenbergis tēlaini salīdzināja koksnes šūnu sienīnās ar dzelzsbetonu, kurā celulozes fibrillām piemīt armatūras funkcija, bet lignīnam un hemicelulozēm - saistvielas (cementa) funkcija. Šo priekšstatu tālāk zinātniski pamatoja un attīstīja Koksnes ķīmijas institūtā Pēteris Eriņš, kurš attēloja koksnes šūnas sienīnās virsmolekulāro modeli kā kompozītmateriālu, kurā celulozes armatūra iebūvēta lignīna - hemiceluložu matricā. Tādējādi koksni var raksturot kā triju komponentu savstarpēji cauraustu tīklveida struktūru, kuru saista ūdeņraža saites starp komponentu hidroksilgrupām. Kompozīta mehāniskās īpašības papildus nosaka makromolekulu segmentu “saķeršanās”. Koksnes ķīmiskajā pārstrādē nepieciešams šo kompozītu struktūru noārdīt vairāk vai mazāk dziļi. Lignīnus lielos daudzumos iegūst kā blakusproduktus dažādos augu biomasas ķīmiskās pārstrādes tehnoloģiskajos procesos, piemēram, celulozes vārīšanā un bioetanolā ražošanā. Lignīnus, kurus iegūst dažādos augu biomasas ķīmiskās pārstrādes procesos, sauc par tehniskajiem lignīniem. Šādi tehniskie lignīni būtiski atšķiras pēc struktūras, funkcionalitātes, molekulāriem izmēriem un šķīdības no lignīna “*in situ*” un savā starpā, tie satur neorganisko savienojumu un ogļhidrātu piemaisījumus [71, 72].

Visi izolētie lignīni satur vairāk vai mazāk aizvietotus benzola gredzenus ar metoksilgrupām, fenoliskajām hidroksilgrupām un alifātiskajām ķēdēm, kas saistītas ar funkcionālajām grupām: nepiesātinātām C=C dubultsaitēm, ēteriem, karbonil-, hidroksil- un karboksilgrupām, kuru relatīvais daudzums variē atkarībā no izdalīšanas metodes [65].

Lignīna izdalīšanas procesā norit konkurējošas destrukcijas un kondensācijas reakcijas, kā arī dažādi citi procesi, būtiski izmainot lignīna struktūru. Piemēram, kondensācijas reakciju rezultātā, kas notiek lignīna izdalīšanas gaitā, palielinās C-C saišu daudzums [73]. Ēterisko saišu destrukcijas rezultātā novērojama fenolisko hidroksilgrupu saturs palielināšanās. Eliminēšanas reakcijas pazemina alifātisko hidroksilgrupu saturu. Oksidēšanas reakciju rezultātā var ievērojami palielināties karboksilgrupu saturs. Metoksilgrupu saturs var samazināties to atšķelšanas rezultātā [63, 73].

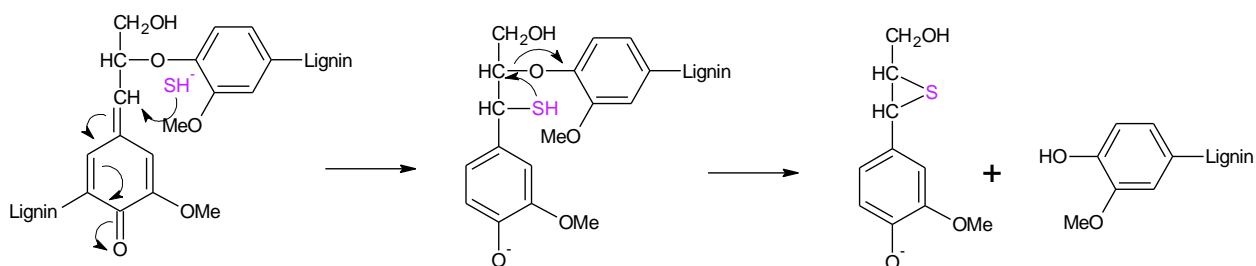
Kraft process

Sulfāt vai *kraft* lignīni rodas rūpnieciskajā celulozes ieguves, t.s. *kraft* (sulfātvārīšanas) procesā (ar šo celulozes vārīšanas metodi darbojas vairāk nekā 90 % no visas pasaules celulozes vārīšanas ražotnēm). *Kraft* lignīnu iegūst kā blakusproduktu celulozes ieguves rūpnīcās no skuju un lapu koku koksnes, apstrādājot tās ar Na₂S sārmainā - NaOH vidē. *Kraft* procesā lignīns daļēji tiek sašķelts un veidojas tiolu grupas propāna ķēdes β pozīcijā monolignolu struktūrā, kā tas redzams 1.7. attēlā (A), kas rezultātā izsauc lignīna šķīšanu. Turpretī sulfātvārīšanas procesā, kur pH kontrolēšanai izmanto sēra dioksīdu un sēraskābes sāļus, iegūst citus lignīna preparātus ar citām īpašībām, jo sulfonātgrupas atrodas monolignolā propānu ķēdes α pozīcijā (1.7. attēlā (B)) un šis lignīns ir ūdenī šķīstošs un atšķirīgs no citiem lignīna preparātiem. Bet šī pārstrādes tehnoloģija nav selektīva un efektīva, lai to komerciāli izmantotu celulozes šķiedru iegūšanai rūpnieciskos apjomos, tāpēc jau no 20. gadsimta četrdesmitajiem gadiem, par dominējošo kļuva sulfātvārīšanas (*kraft*) metode celulozes šķiedru iegūšanai [74].



1.7.att. Vienkāršota *kraft* lignīna (A) un sulfātvārīšanas procesā iegūtā lignīna (B) struktūras

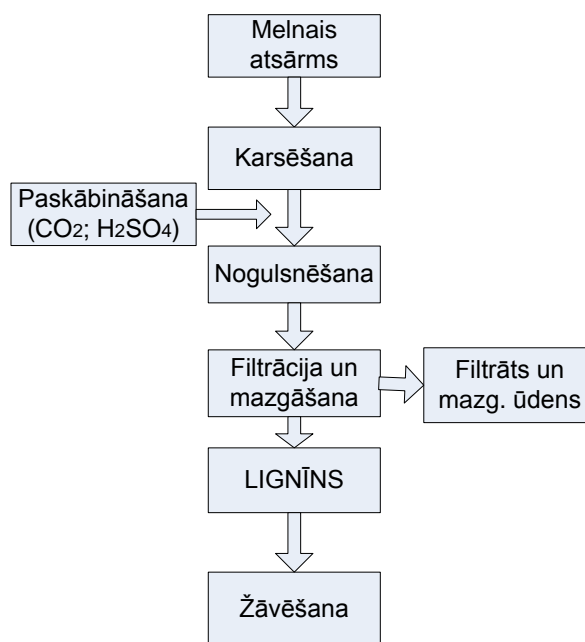
Sasmalcināta koksne tiek vārīta lielā spiedienā bioreaktorā, un tipiskai delignifikācijai nepieciešamas vairākas stundas 130 - 180 °C temperatūrā. Pēc šīs vārīšanas lignīna un hemiceluložu kondensācijas produkti ir šķīstoši sārma šķīdumā (celuloze šai šķīdumā neizšķīst) un pāri palikušo šķīdumu sauc par “melno atsārmu” (nosaukums aizgūts šķīduma krāsas dēļ). Tas satur lignīnu, ogļhidrātus, hemicelulozes, Na₂SO₄, Na₂CO₃ un citus neorganiskos sāļus [27, 75]. Apstrādes rezultātā lignīns pāriet šķīdumā. Procesā izmantotie ķīmiskie reaģenti intensīvi sašķel makromolekulu α-O-4 un β-O-4 saišu vietās un notiek ievērojama saišu destrukcija, kas ir viens no galvenajiem ķīmisko reakciju nosacījumiem. Ētera saišu šķelšanās ar nukleofīlo sulfīdu HS⁻ jonu redzama 1.8. attēlā.



1.8.att. Ētera β-O-4 saišu destrukcija un tiolu grupu veidošanās *kraft* procesā

Aromātisko un alifātisko konjugēto saišu un hidroksilgrupu klātbūtne nodrošina lignīna makromolekulas augsto reaģēt spēju un uz tā balstās lielākā daļa stratēģiju lignīna kā makromonomēra izmantošanā [63, 69].

Lignīnu izdala, paskābinot rūpniecisko t.s. “melno atsārmu” ar sērskābi vai CO₂. Izgulsnēts lignīns satur organiski saistītu sēru līdz 3 %. *Kraft* - lignīniem piemīt hidrofobās īpašības, tie šķīst sārma šķīdumos un dažos organiskos šķīdinātājos, piemēram, dimetilsulfoksīdā un dioksānā [76, 77]. Lignīna ieguve no “melnā atsārma” *kraft* procesā attēlota 1.9. attēlā.



1.9. att. Lignīna ieguve no melnā atsārma kraft procesā

Lignīnu saturošais “melns atsārms” tiek karsēts un tam tiek pievienots paskābinošais aģents - tas var būt oglekļa dioksīds vai sērskābe. Šajā procesā tiek pazemināts šķīduma pH, kā rezultātā veidojas nogulsnes, kas satur lignīnu. Nākamajā procesā, kad nogulsnes ir izveidojušās, tās tiek nofiltrētas un mazgātas ar ūdeni, uz filtriem palikušais lignīns tiek žāvēts [69, 78].

LignoBoost tehnoloģija

LignoBoost koncepcija attīstās saskaņā ar Nākotnes Resursu Pielāgotas pārstrādes (FRAM2) programmu. *LignoBoost* procesā, atšķirībā no tradicionālā kraft procesa, lignīns tiek izgulsnēts, paskābinot “melno atsārmu” tikai un vienīgi ar CO₂. Pēc filtrēšanas tas tiek mazgāts pēc tradicionālās shēmas (nogulšņu mazgāšanas tankā ar paskābinātu ūdeni). Pēc atmazgāšanas filtrāts atkārtoti tiek paskābināts un šī masa tiek atkārtoti filtrēta un mazgāta.

Kad filtrāts ir dispersēts šķīdumā, pH un temperatūra tiek kontrolēta. pH izmaiņām nevajadzētu būt lielām, jo tas var izsaukt jonu spēka izmaiņas un samazināt lignīna šķīdību - tāpēc mazgājamam ūdenim ir pievienota sērskābe, lai pH nebūtu stipri bāzisks [79].

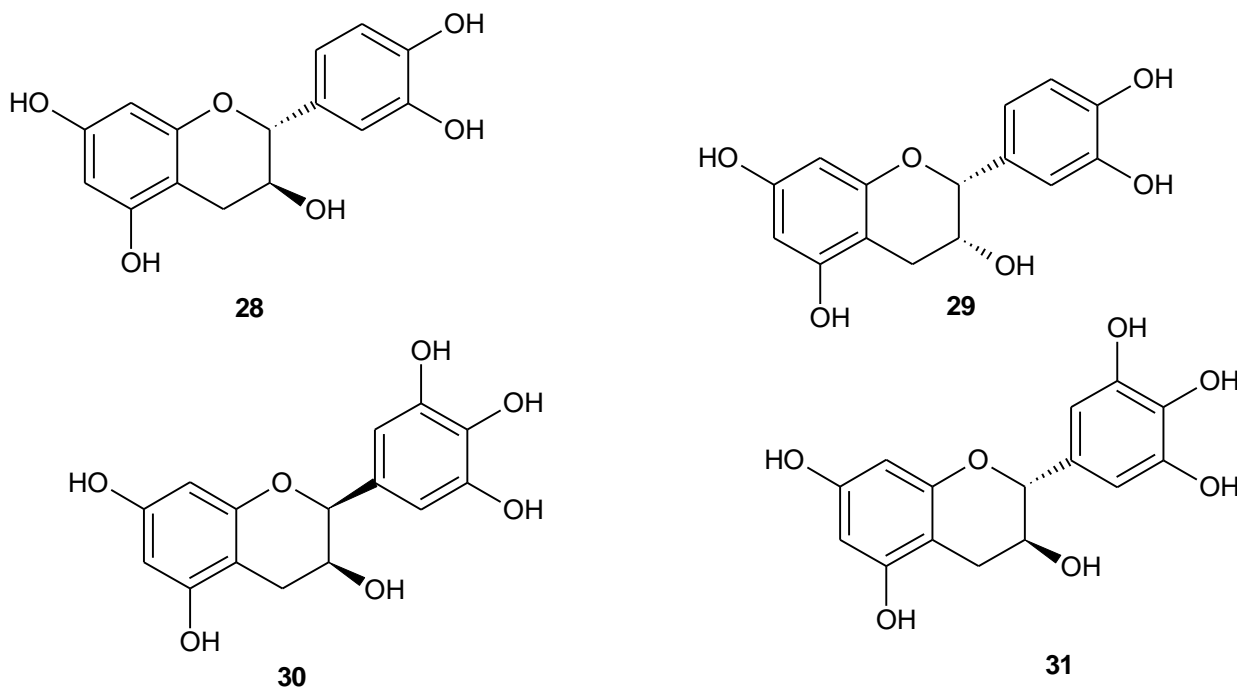
Viens no nosacījumiem ir lietot CO₂ tīrā veidā, ko viegli var ievadīt melnajā atsārmā. Iegūtais lignīns no melnā atsārma pēc mazgāšanas tiek žāvēts. Žāvēšana ir labs veids, kā samazināt transporta izmaksas un izpildīt atbilstošās prasības produkcijas realizācijā. Iegūto sauso lignīnu izmanto celulozes rūpnīcās lai iegūtu enerģiju [80]. To arī kopā ar zāģa skaidām vai citiem materiāliem, pārstrādātu biogranulās, var izmanto kā biokurināmo, aizstājot fosilo kurināmo - izmantojot atjaunojamus resursus [79, 81]. Izdalītie lignīni ir ar lielu molekulāro masu un ar dažādiem piemaisījumiem (polisaharīdi, proteīni un citas makromolekulas, atkarībā no lignīna izcelsmes un izdalīšanas metodes). Šie piemaisījumi ietekmē lignīna īpašības un līdz

ar to izmantošanas iespējas. Tāpēc ir nepieciešama lignīna heterogenitātes samazināšana, nevēlamo piemaisījumu atdalīšana. Lai to panāktu, tiek veikta lignīna frakcionēšana. Viens no veidiem, lai samazinātu heterogenitāti un palielinātu lignīna tīrību, ir veikt frakcionēšanu ar organiskajiem šķīdinātājiem, lai iegūtu savienojumus ar uzlabotām īpašībām, kuras ir nepieciešamas, lai veicinātu to izmantošanu dažādās jomās, kā piemēram, antioksidantus u.c.

1.4.3. Kondensētie tanīni

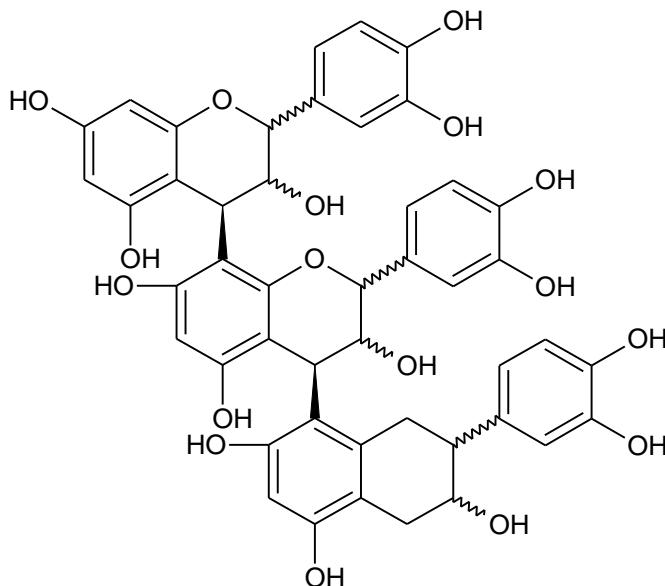
Tanīni ir savienojumu grupa, kas zināma jau izsenis, un to lietošana medicīnā dažādu slimību ārstēšanā un ādas mīcēšanā, sliecas krietni pirms mūsu ēras. Dabā tanīni ir sastopami dažādu augu valsts augstākajos augos visā pasaulē, kā piemēram, ozolos, kastaņos, priedēs, tropu augos, un citos. Augstās koncentrācijās tanīni atrodas dažādās augu morfoloģiskajās daļās kā mizā, augļos, saknēs u.c. un atkarībā no izcelsmes to ķīmiskā struktūra ir atšķirīga. Molekulārā masa svārstās no 300 līdz 20000 g·mol⁻¹ [82, 83]. Paaugstināts tanīnu saturs augos norāda uz auga stresa līmeni, jo tanīni tiek sintezēti kā atbildes reakcija augā, liecinot par apkārtējās vides nelabvēlīgo ietekmi uz to. Tanīni ir dabiskie antioksidanti gan vīnā, gan sulās un citos pārtikas produktos [84, 85]. Tanīnu ķīmiskā uzbūve ir ļoti sarežģīta un, neskatoties uz lielo pētījumu skaitu, joprojām pilnībā nav izpētīta [86]. Uz doto brīdi pasaulē komerciāli tiek ražoti tanīni no ozolu un Austrālijas akāciju mizām. Tanīnu saturs koksnē, mizā, saknēs, lapās var būt augsts > 30 %, vidējs 12 - 30 % vai zems < 12 %. Mizā ir visaugstākais tanīnu saturs [87].

Kondensētie tanīni ir proantocianidīnu oligomēri un polimēri, kas sastāv no flavān-3-olu vienībām (skat. 1.10. att.). Flavanoīdi ir augu sekundārie metabolīti, kas augos sintezējas no L - fenilalanīna (**3**) un acetilkoenzīma un augos veic svarīgas funkcijas, un ne mazāk svarīgu lomu spēlē dzīvnieku un cilvēku diētā [88]. Strukturāli tos var uzskatīt par flavān-3-olu, (+)-katehīna (**28**), (-)-epikatehīna (**29**), (+)-gallokatehīna (**31**) un (-)-epigallokatehīna (**30**) kondensācijas produktiem [89, 90].



1.10. att. Kondensēto tanīnu veidojošās katehīnu pamatvienības

Kondensēto tanīnu veidojošās katehīna pamatvienības savā starpā ir saistītas ar C-4 saiti pirmajā vienībā un C-8 saiti (nereti C-6) jau nākošā katehīna vienībā, veidojot blokus ar polimerizāciju no divām līdz pat vairāk kā 50 vienībām, kā redzams 1.11. attēlā.



1.11. att. Kondensēto tanīnu struktūrformula

Tīrā veidā tanīni atrodas cietā un parasti amorfā stāvoklī. Kondensētie tanīni ir ūdenī šķīstoši oligomēri ar polimerizācijas pakāpi 2 līdz 6, kā arī ar polimerizācijas pakāpi no 7 un augstāk šķīdība ūdenī nedaudz samazinās. Tanīni ar lielāku polimerizācijas pakāpi labi šķīst polāros

organiskajos šķīdinātājos (etanolā, acetonā) [91]. Kondensētie tanīni šķīst polāros šķīdinātājos - ūdenī, acetonā un spirtos, mazšķīstoši tie ir etilacetātā (tikai monomēri, daži dimēri) un tie ir nešķīstoši nepolāros šķīdinātājos, kā piemēram, heksānā vai hlороformā.

1.5. “Zaļās” ķīmijas pamatprincipi polifenolu savienojumu ieguvē no augu biomasas

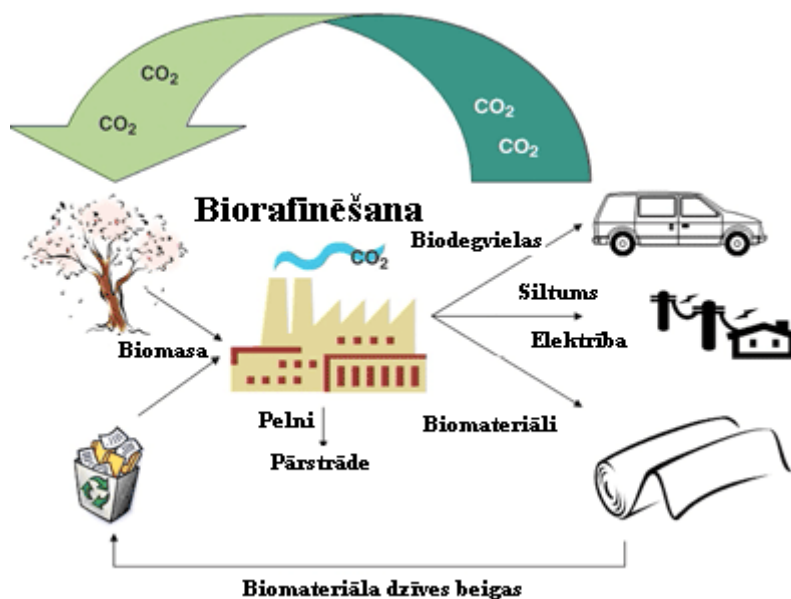
Cilvēku negatīvās darbības sekas, kā globālā sasilšana, ozona noārdīšanās augšējos atmosfēras slāņos, u.c., aizvien vairāk aktualizē jautājumu par vides aizsardzību. Apkārtējās vides piesārņojums ir iemesls šīm globālajām problēmām. “Zaļās” ķīmijas koncepcija paredz izmantot tādu ķīmiju, kas ir videi draudzīga un “tīra”. “Zaļās” ķīmijas uzdevumi ir samazināt atkritumus, izmantot mazāk bīstamas ķīmikālijas un metodes, lai iegūtu vēlamos produktus no atjaunojamiem resursiem, iegūstot pievienotās vērtības produktus īsos un efektīvos sintēzes/iegūšanas ceļos [92, 93]. “Zaļās” ķīmijas modernās metodes ir izmantojamas, lai sasniegtu mērķus, kā piemēram, superkritiskā CO₂ izmantošana tiek atzīta kā “zaļa” metode, jo CO₂ ir nedegošs, nav toksisks, ir pieejams kā blakusprodukts daudzos procesos un nedod šķīdinātāju atliekas, kas būtu jāutilizē. Citas perspektīvas “zaļās” metodes polifenolu savienojumu ieguvē no augu biomasas ir mikroviļņu un ultraskaņas pielietošana ekstrakcijas procesos, kā arī ekstrakcijas ar jonu šķīdriem, kas vairāk ir aprakstītas tālāk darbā [94, 95].

1.6. Biorafinēšana

Augu biomasas biorafinēšanas attīstība reprezentē atslēgu uz integrētu produktu klāstu izveidi, lai iegūtu virkni izejvielu un pievienotās vērtības produktu. Augu biomasas, tāpat kā naftas izejvielu krājumi, ir ķīmisks kokteilis, no kura iegūt produktus ir daudz grūtāk nekā no naftas, jo augu biomasas kompozīcija nav viendabīga un augu biomasas izejvielas ir ļoti atšķirīgas, kā piemēram, dažādas dabiskas izcelsmes izejvielas (koksne, zālaugi u.c.) vai to kādas pārstrādes procesa blakusprodukti tiek izmantoti. Kā izejvielas ir dabas kompozītmateriāli, kur esošie pamatkomponenti (1.1. tabulā), kas veido dažādus savienojumus, ir saistīti savā starpā ar dažādām ķīmiskajām saitēm [96]. Lai no šīm izejvielām iegūtu materiālus, degvielas, kurināmo un dažādus vērtīgus ķīmiskos savienojumus, tos ir nepieciešams apstrādāt [97]. Atslēga uz pēc iespējas efektīvāku augu biomasas, kurai ir neviendabīgs sastāvs, izmantošanu ir atbilstošas un ilgtspējīgas biorafinēšanas koncepcijas izstrāde, lai sadalītu augu biomasu tās dominējošos komponentos un iegūtu pēc iespējas lielāku pievienoto vērtību visām frakcijām. Terminu „biorafinēšana” var uzskatīt kā procesu/us, kas ietver konversijas procesus un iekārtas, lai iegūtu plašu produktu klāstu (kurināmo, jaudu un ķīmikālijas) no augu biomasas, pielietojot “zaļās” ķīmijas pamatnostādnes [26, 28].

Pamatojoties uz starptautiskās enerģijas aģentūras (IEA) informāciju [98], biorafinēšana tiek definēta kā ilgtspējīga augu biomasas pārstrāde, izmantojot plašas un efektīvas tehnoloģijas, lai iegūtu dažāda spektra tirgus produktus, kā enerģija, pārtika, barība, ķīmikālijas un dažādi materiāli. Augu biomasā polifenola dabas pamatkomponents lignīns un polifenolu savienojumu ekstraktvielas parasti atrodas šūnu iekšienē (1.1. attēlā), tādēļ, lai varētu izdalīt šos savienojumus, ir nepieciešams lietot dažādas metodes. Biorafinēšanas kontekstā ir nepieciešams sadalīt biomasu pamatkomponentos, lai iegūtu virkni pievienotās vērtības produktus, un viens no vispiemērotākajiem paņēmieniem ir izmantojot “zaļās” ķīmijas pamatnostādnes un principus [99].

Polifenolu ieguvē visnozīmīgākā ir ekstrakcija, kuru var iekļaut esošajās biorafinēšanas shēmās. Pirms ekstrakcijas ir nepieciešams strukturāli izmainīt šūnu membrānu, lai atvieglotu tālākos procesus. Parasti tas tiek veikts izmantojot ķīmisku vai mehānisku apstrādi, šo membrānu izjaukšanu atvieglo spiediena vai temperatūras izmantošana. Atkarībā no vēlamā produkta un pielietotās metodes, var veikt tiešu augu biomasas ekstrakciju, neapstrādājot to iepriekš, vai veicot priekšapstrādi [100]. Shematisks biorafinēšanas cikls ir parādīts 1.12. attēlā.



1.12. att. Biorafinēšanas cikla shematisks attēlojums [101]

1.7. Augu biomasas paraugu sagatavošana polifenolu savienojumu ieguvei

Veicot augu biomasas apstrādes procedūras, lai iegūtu dabas izcelsmes polifenolu savienojumus nereti tiek atstāts novārtā tik svarīgs solis, kā paraugu sagatavošana. Ir svarīgi zināt un prast novērtēt, cik nozīmīgs solis ir paraugu sagatavošana, ar ko jāsaprot paraugu ievākšana, paraugu priekšapstrāde un ekstrakcija (skatīt 1.13. attēlu). Tādēļ šie procesi ir

apskatīti tuvāk, mēģinot izskaidrot to nozīmību jeb ietekmi uz iegūtajiem rezultātiem. Ja kļūdas tiek ienestas pašā sākumā, tās tiks atspoguļotas arī gala rezultātā.



1.13. att. Augu biomasas paraugu analīzes cikls

Augu biomasas paraugu ievākšanas process ir ļoti svarīgs, jo ietekmē rezultātus kopumā. Nepareiza parauga ņemšana noved pie kļūdainiem rezultātiem un netiek atspoguļotas patiesās vērtības, kas noved pie nepareizas rezultātu interpretācijas. Nozīmīgākie parametri, kas ietekmē ieguves rezultātus, ir reprezentatīva parauga paņemšanas un ņemšanas metodes izvēle. Tādēļ ir svarīgi pirms paraugu ņemšanas skaidri definēt ņemšanas metodi un analīzes mērķi. Svarīgs faktors ir mērķsavienojumu izvietojums un sadalījums matricā, jo lielākā daļa augu biomasas paraugu ir heterogēni [17]. Augu biomasu sastāv no vairākām augu morfoloģiskām daļām, kas var apgrūtināt rezultātu interpretāciju, tāpēc svarīgi ir zināt pēc iespējas vairāk pieejamo informāciju par augu biomasas sastāvu. Konkrētu polifenolu savienojumu iegūšanai no kokaugiem būtu jāsaprot, kur tie koncentrējas, lai izvēlētos kuru morfoloģisko daļu ievākt, lai iegūtu selektīvu rezultātu, piemēram, ekstraktvielas, kuras sakoncentrējas mizā, nebūtu efektīvi iegūt no koksnes, kur to nav, kā arī no koku sugas, kurā attiecīgā savienojumu grupa netiek sintezēti kā sekundārie metabolīti [102, 103].

Svarīgs aspekts ir paraugu uzglabāšana. Augu biomasas materiāliem parasti ir liels ūdens saturs, tādēļ parasti pirms uzglabāšanas tie tiek izžāvēti gaisā sausi. Paraugus pēc ievākšanas ir jāuzglabā zemā temperatūrā saldētavā, lai nenotiktu nevēlamas izmaiņas, kā aktīvo savienojumu oksidācijas procesi un mikroorganismu nevēlama ietekme [17]. Paraugu priekšapstrāde ietver dažādas mehāniskās un ķīmiskās apstrādes tehnikas, piemēram, malšanu biomasas homogenitātes pakāpes samazināšanai vai parauga hidrolīzes veikšana, lai samazinātu parauga matricas efektus [104]. Neievērojot šos sākumu paraugu sagatavošanas un uzglabāšanas soļus, var iegūt nesalīdzināmus rezultātus.

Ir zināms, ka augu biomasas daļiņu izmērs augu biomasas ekstrakcijām, ar mērķi iegūt bioloģiski aktīvus savienojumus, ir būtisks faktors, jo tas būtiski ietekmē ekstrakcijas iznākumu. Ir pierādīts, ka, samazinot daļiņu izmēru, būtiski palielinās ekstrakcijas efektivitāte [105]. Ir noteikts, ka piemēram, bērzu mizas ekstrakcijai, izmantojot paātrinātā šķīdinātāja

ekstrakciju (ASE), polifenolu savienojumu iznākums, atkarībā no daļiņu izmēra, vislielākais ir mizai, kas samalta līdz pulverveida ($< 0,2$ mm) izmēram [106]. Tas ir skaidrojams ar to, ka mazu daļiņu paraugam ir lielāks virsmas laukums nekā lielāka izmēra daļiņu paraugiem, un tas būtiski ietekmē saskares virsmu starp analīti un šķīdinātāju. Liela saskares virsma dod mazus difūzijas attālumus, kā rezultātā palielinās masas pārnese ātrums un tiek iegūta lielāka ekstrakcijas efektivitāte un atgūstamība. Bet jāņem vērā tas, ka pārāk liela sasmalcināšanas pakāpe sadārdzina izmaksas un ekstrakcijas iznākums nepieaug tik ļoti daļiņu izmēram samazinoties.

Ar mērķi uzlabot ekstrakcijas efektivitāti un selektivitāti gan analītiskiem, gan preparatīviem nolūkiem, augu izcelsmes paraugiem tika veikta priekšapstrāde, izmantojot dažādas mehāniskās un ķīmiskās apstrādes tehnikas, piemēram, malšanu biomasas daļiņu izmēra samazināšanai vai parauga hidrolīzes veikšana. Inovatīvs veids ekstrakcijas efektivitātes un selektivitātes uzlabošanai ir augu biomasas apstrāde, izmantojot mikroviļņus vai ultraskaņu, kas veicina ķīmisko struktūru disociāciju [107, 108].

Promocijas darba specifika ir vērsta uz bioloģiski aktīvu savienojumu - dabas polifenolu savienojumu iegūvi un attīrīšanu, izmantojot dažādas ekstrakcijas metodes, arī “zaļo” ekstrakciju. Ar vārdiem “zaļā” ekstrakcija ir saprotams dabas polifenolu ieguves process, kas pamatojas uz dažādiem pētījumiem un atklājumiem, samazinot enerģijas patēriņu, izmantot alternatīvu (alternatīvu - aizstāt plaši lietotos organiskos šķīdinātājus, kas ir toksiski, gaistoši, videi kaitīgi) šķīdinātāju lietojumu un, izmantojot atjaunojamus dabīgus materiālus, kā arī, nodrošinot drošu un kvalitatīvu ekstraktu iznākumu [95]. Dabas vielu “zaļā” ekstrakcija pamatojas uz sešiem principiem:

- ✓ inovatīva atjaunojamo augu resursu un šķirņu izvēle;
- ✓ alternatīvu šķīdinātāju izmantošana;
- ✓ enerģijas patēriņa samazināšana, reģenerējot enerģiju un izmantojot inovatīvas tehnoloģijas;
- ✓ pievienotās vērtības produktu ieguve no procesu blakusproduktiem, iekļaujot bio- un agrorafinēšanu;
- ✓ veicamo darbību skaita samazināšana, veicinot drošību, robustumu un kontrolētus procesus.

Mērķis ir dabīgu produktu/ekstraktu ieguve bez piemaisījumiem ar vēlamajām mērķīpašībām [95].

1.8. Augu biomasas ekstrakcijas metodes polifenolu savienojumu ieguvei

Mūsdienās augu biomasas ekstrakcijai ir zināmas daudz un dažādas klasiskās un modernās ieguves tehnikas, kas iekļauj no biomasas izdalīto savienojumu ieguvei, kā arī savienojumu (ekstraktu) attīrīšanu. Zinātnieki no visas pasaules ir izstrādājuši daudz un dažādas polifenolu savienojumu ekstrakcijas metodes no augu biomasas, piemēram, literatūrā [109] ir apkopotas 33 dažādas ekstrakcijas procedūras, kurās ekstrakcijas laiks variē no 30 sekundēm līdz pat 96 stundām un šķīdinātāju tilpuma attiecība pret parauga masu variē no 2 līdz 200 reizēm [110].

1.8.1. Ekstrakcijas metodes polifenolu savienojumu ieguvei no augu biomasas

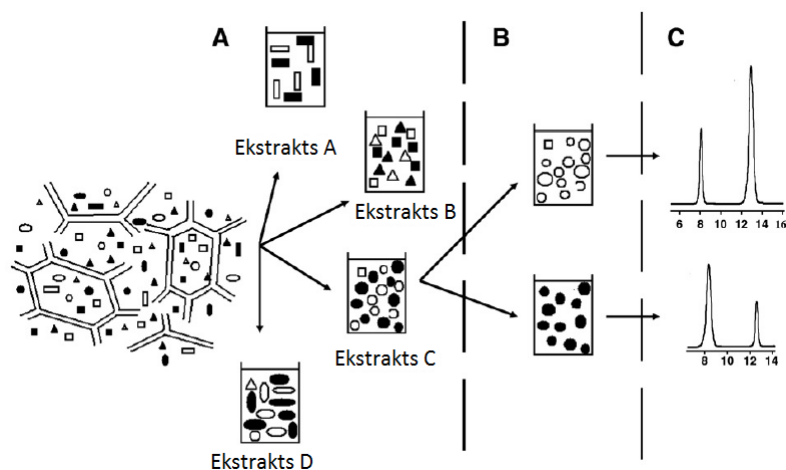
Ekstrakcijas metodes izvēle ir atkarīga no augu biomasas materiāla dabas un vēlamajiem mērķsavienojumiem. Tradicionāli no augu biomasas, lai iegūtu polifenolu savienojumus, izmanto dažādas ekstrakcijas metodes, kurās ietilpst: Soksleta ekstrakcija, ekstrakcija ar atces dzesinātāju (CŠE), tvaiku destilācija. Lai gan šīs klasiskās metodes tiek plaši lietotas, tām ir vairāki būtiski trūkumi: tās ir laikietilpīgas un tām ir nepieciešams samērā liels šķīdinātāju daudzums, kā arī tām ir liela temperatūras ietekme, kas var novest pie termiski nestabilu sekundāro metabolītu degradācijas [111, 112]. Fakts, ka viens augs var saturēt vairākus tūkstošus sekundāro metabolītu, rada nepieciešamību pēc augstas veikspējas un ātrām ekstrakcijas metodēm. Attīstoties tehnoloģiskajiem risinājumiem mūsdienās, ir izstrādātas un joprojām tiek uzlabotas modernās ekstrakcijas metodes, kā piemēram, superkritiskā CO₂ ekstrakcija, ekstrakcija mikroviļņos (ME), paaugstināta spiediena šķidrums ekstrakcijas metodes un citas [113]. Tās ir ātras un efektīvas ekstrakcijas metodes, lai no cietvielas matricām iegūtu ekstraktus. Svarīgi pieminēt arī ekstrakcijas ar jonu šķīdumiem, kas lielā mērā atbilst “zaļās” ķīmijas principiem un biomasas polifenolu savienojumu ekstrakcijas kontekstā nav daudz pētītas [114, 115].

1.8.2. Ekstrakcijas metodes polifenolu savienojumu attīrīšanai

Visvienkāršākā ekstrakcijas tehnika ir šķidrums - šķidrums ekstrakcija izmantojot divus dažādus šķīdinātājus, no kuriem viens parasti ir ūdens, bet otrs ir organiskas dabas šķīdinātājs, kas nejaucas ar ūdeni, piemēram, ūdens - heksāns, ūdens - dihlormetāns u.c. Lielākie trūkumi ir, ka tā ir videi nedraudzīga un izmaksu ziņā dārga, toksiska un ugunsbīstama [17, 116].

Cietfāzes ekstrakciju (SPE) var izmantot, lai izdalītu analītus, kuri ir izšķīdināti šķidrums maisījumā, tādējādi tos var izdalīt no plaša klāsta matricām, atbilstoši to fizikālām un ķīmiskām īpašībām. Ņemot vērā augu ekstraktvielu sastāva lielo daudzveidību, atsevišķu komponentu

izolēšana ir apgrūtināta. Lai šo procesu atvieglotu, var izmantot secīgu ekstrakciju ar dažādiem šķīdinātājiem ar pieaugošu polaritāti, ekstraktvielas sadalot frakcijās, kā parādīts 1.14. attēlā (ekstrakti A,B,C,D). Pilnībā atdalīt ekstraktvielas, kas iegūtas no augu biomasas, vienu no otras nav iespējams (1.14. attēlā B) bez tālākām vielu attīrīšanas procedūrām, kā piemēram, preparatīvā hromatogrāfija, cietfāzes ekstrakcija, šķidruma - šķidruma vai citām paraugu attīrīšanas metodēm.



1.14. att. Augu biomasas ekstraktvielu frakcionēšana

Pieaugot pieprasījumam un interesei par augu izcelsmes veselību veicinošiem un ārstnieciskiem līdzekļiem, kas satur dabiskus augu izcelsmes polifenolu savienojumus. Globālais polifenolu tirgus 2015. gadā sasniedza 757 miljonus eiro un ir paredzēts, ka tas sasniegs 1,12 miljardus 2022. gadā ar ikgadējo tirgus pieaugumu aptuveni 8 % gadā [117]. Pašlaik komercializēta polifenolu savienojumu ieguve tiek veikta, izmantojot tradicionālās ieguves metodes, ieskaitot Soksleta ekstrakcijas, cietviela-šķidruma (CŠE) ekstrakciju, kā arī macerāciju. Šīs metodes ir saistītas ar vairākiem lieliem mīnusiem: lielu šķīdinātāju patēriņu, ilgu ieguves laiku un paaugstinātu risku termiski nestabilu savienojumu degradācijai. Soksleta ekstrakcija ir visbiežāk izmantotā klasiskās ekstrakcijas metode, pat neskatoties uz to, ka tā ir laikietilpīga (līdz 24 stundām un ilgāk) un ar lielu enerģijas patēriņu [118].

Polifenolu savienojumus no augu biomasas var ekstrahēt ar dažādiem šķīdinātājiem, iznākums ir atkarīgs no ekstrakcijas metodes, šķīdinātāja polaritātes, ekstrakcijas laika un temperatūras. Bieži izmanto ekstrakciju ar ūdeni, bet ir pierādīts, ka lielāku iznākumu dod etanola ūdens ekstrakcija, taču, neskatoties uz lielo iznākumu, nereti ir zema selektivitāte, tādēļ bieži izmanto arī etilacetātu vai acetonu polifenolu savienojumu ieguvei no augu biomasas [50].

Analītiskajā ķīmijā ideālā gadījumā ekstrakcijai vajadzētu būt:

- selektīvai attiecībā uz iegūstamiem savienojumiem;
- ātrai;

- vienkāršai;
- lētai;
- paredzētai ikdienas lietošanai;
- iespējām to automatizēt.

Pašlaik pasaulē aug pieprasījums pēc jauniem alternatīviem ekstrakcijas risinājumiem (lai no augu biomasas izdalītu pievienotās vērtības produktus), lai samazinātu ekstrakcijas laiku, šķīdinātāju patēriņu un samazinātu izmaksas, palielinot ražību un alternatīvu videi draudzīgu šķīdinātāju izmantošanu. Daļa no šīm mūsdienīgajām ekstrakcijas metodēm (izmantotas arī promocijas darba izstrādes gaitā) ir superkritiskā CO₂ ekstrakcija, paātrinātā šķīdinātāju ekstrakcija (ASE), ekstrakcija ultraskaņā (UE), ekstrakcija mikroviļņos (ME), kā arī pseido virstošā slāņa ekstrakcija (FBE) [119]. Apkopojot var secināt, ka ekstrakcija ir viens no svarīgākajiem soļiem, lai no augu biomasas izdalītu polifenolu savienojumus.

Mūsdienās plaši ir attīstījušās dažādas 1.10. nodaļā minētās ekstrakcijas metodes, kuras šobrīd aktīvi tiek izmantotas un uzlabotas. Tiek pētītas to izmantošanas iespējas bioloģiski aktīvu savienojumu izdalīšanai no augu biomasas [114, 115, 120].

1.9. Ekstrakcijas parametru ietekme uz iegūstamo ekstraktvielu sastāvu

1.9.1. Augu biomasas ekstraktvielu šķīdība dažādos šķīdinātajos

Labam šķīdinātājam, lai no dažādas augu biomasas ekstrakcijas ceļā iegūtu bioloģiski aktīvus savienojumus, jābūt ar zemu toksicitāti (videi draudzīgam), viegli neuzliesmojošam, viegli iztvaicējamam zemā temperatūrā, bioloģiski aktīvu vielu selektīvam, ar konservējošām īpašībām, ekstrakta pārmaiņas neveicinošam, ar parauga sastāvdaļām nereaģējošam, kā arī lētam. Parasti vislielākie polifenolu ekstrakcijas rezultāti no augu biomasas tiek iegūti ar etanolu vai metanolu un šo spirtu maisījumiem ar ūdeni, lai gan plaši tiek izmantoti arī citi šķīdinātāji, kā etilacetāts, acetons u.c.. Etanols, maisījumā ar ūdeni, ir visplašāk lietots polifenolu ekstrakcijai to pazeminātas toksicitātes un lielā ekstrakcijas iznākuma dēļ, papildus ieguvums ir to polaritātes modulēšana, izmantojot etanolu/ūdeni dažādās attiecībās, tāpat arī tā uzglabāšanai nav jāpievērš pastiprināta uzmanība. Lielākie trūkumi ekstrakcijai ar ūdeni ir salīdzinoši mazpolāru polifenolu mazais iznākums, tāpat ūdens veicina hidrolīzi un ir lieliska vide mikroorganismu augšanai. 1.3. tabulā ir parādīta no augu biomasas ar dažādiem šķīdinātājiem dažādu ekstraktvielu šķīdība, var labi redzēt, kā atšķiras šķīdinātāju izvēle atkarībā no mērķsavienojumiem.

No augu biomasas iegūtu ekstraktvielu šķīdība dažādos šķīdinātājos [121 - 125]

Ūdens	Etanols	Metanols	Hloroforms	Ēteris	Acetons
Terpenoīdi	Terpenoīdi	Terpenoīdi	Terpenoīdi	Terpenoīdi	Fenoli
Tanīni	Tanīni	Tanīni	Flavanoīdi	Alkaloīdi	Flavanoli
Antociāni	Polifenoli	Polifenoli		Kumarīni	Polifenoli
Cietes	Poliacetilēni	Antociāni		Taukskābes	
Saponīni	Flavanoli	Saponīni			
Polipeptīdi	Steroli	Flavoni			
Lektīni	Alkaloīdi	Kvazinoīdi			
	Propolis	Fenoni			

1.9.2. Temperatūras ietekme

Vispārzināms fakts ir, ka augsta temperatūra palielina ekstrakcijas efektivitāti, ātrumu un atgūstamību [126]. Liela ekstrakcijas temperatūra izmaina izšķīdušo vielu un matricas mijiedarbību un ietekmē šķīdinātāja īpašības. Paaugstinātā temperatūrā parasti tiek ievērojami uzlabota organisko vielu šķīdība, jo tiek palielināta kinētiskā enerģija, kas atvieglo iekšējo un iekšmolekulāro mijiedarbību pārraušanu, kā Van der Vālsa spēki, un vieglāk tiek pārrautas ūdeņraža saites un dipolu saistības, kas pastāv starp izšķīdušo vielu un matricu. Augsta temperatūra izmaina šķīdinātāja fizikālās īpašības, piemēram, samazina viskozitāti un virsmas spraigumu, veidojot labāku šķīdinātāja iekļūšanu matricā. Šīs īpašības uzlabo difūzijas koeficientu un, tādējādi uzlabo ekstrakcijas efektivitāti. Tomēr, paaugstinātai temperatūrai ir arī trūkumi - palielinās vielas modifikācijas un sadalīšanās risks un tiek ietekmētas arī matricas fizikālās īpašības, piemēram, var tikt inducētas neparedzētas reakcijas [127].

1.9.3. Ekstrakcijas laiks

Pamatā ekstrakcijas process ir sarežģīts, laba atgūstamība ir sasniedzama tikai ilgākā laikā. Tādēļ, bieži ekstrakcijas laiku definē kā otru svarīgāko parametru aiz temperatūras. Ekstrakciju var veikt divos veidos - statiski vai dinamiski - un ekstrakcijas iznākums, kā funkcija no laika, izskatās citādi abos veidos. Statiskā veidā veiktai ekstrakcijai atgūstamība pieaug lineāri ar laiku līdz tā sasniedz plato, kas norāda, ka ir sasniegts līdzsvars starp izšķīdušām vielām un šķīdinātāju. Dinamiskā veidā veiktai ekstrakcijai jeb plūsmas metodei līdzsvars nekad netiek sasniegts, jo visu laiku ir nepārtraukta šķīdinātāja plūsma, tad izšķīdušo vielu atgūstamība palielinās lineāri no ekstrakcijas sākuma laika [106, 128]. Kad ķīmiski

nestabilākās izšķīdušās vielas ir pārgājušas šķīdinātājā, tās var sākt degradēties, jo vairs nav matricas ietekmes, kas aizsargātu. Tādēļ īsāks ekstrakcijas laiks ir piemērotāks, lai nenotiktu savienojumu destrukcija. Nestabilu savienojumu ieguvē izmanto tiešo dzesēšanu, bet tas samazina atgūstamību. Ekstrakcijas metodes izvēle ir atkarīga no izejas materiāla dabas un vēlamajiem mērķsavienojumiem, nākamās nodaļās ir apskatītas biežāk lietotās ekstrakcijas metodes.

1.10. Ekstrakcijas metodes

1.10.1. Soksleta ekstrakcija

Ekstrakcija ir vismazāk attīstījies posms analītiskajās procedūrās un paraugu iegūšanā no augu biomasas kopš 1879. gada, kad Soksleta ekstrakcija pirmo reizi tika aprakstīta. Soksleta ekstrakcija ir cietvielas-šķidrums ekstrakcija un visvairāk lietotā ekstrakcijas metode organisko savienojumu ieguvē no augu biomasas [129].

Galvenās Soksleta ekstrakcijas priekšrocības ir:

- masas pārneses līdzsvara nobīde uz vielas šķīdības palielināšanu, jo tiek veikta izvilkšana vairākkārtīgi ar tīru šķīdinātāju, sakoncentrējot izšķīdušās vielas;
- relatīvi augstas ekstrakcijas temperatūras uzturēšana procesa gaitā, karsējot savācējkolbu;
- nav nepieciešams veikt parauga filtrēšanu;
- visā pasaulē, lai iegūtu bioloģiski aktīvas vielas no augu biomasas ar organiskiem šķīdinātājiem, vēl joprojām daudz izmanto Soksleta ekstrakcijas principu [130].

Lielākie trūkumi Soksleta ekstrakcijai ir iespējama mērķsavienojuma termiskā sadalīšanās, jo ekstrakcija notiek šķīdinātāja viršanas temperatūrā, un process ir laikietilpīgs. Dzesēšanai nepieciešams patērēt lielu daudzumu ūdens, ja nav alternatīva dzesēšana, un nepārtraukts enerģijas patēriņš, kas sadārdzina izmaksas.

1.10.2. Superkritiskā šķidrums ekstrakcija

Pamatā superkritiskā šķidrums ekstrakcija (SFE) ir cietvielas-šķidrums ekstrakcijas paveids, kur šķidrums aizstāts ar superkritisko šķidrums. Problēmas, ko sagādāja organisko šķīdinātāju patēriņš, toksicitāte un laika patēriņš, risina SFE metode, kas ir izstrādāta kopš 1980. -tajiem gadiem ar mērķi novērst šos klasisko ekstrakcijas metožu trūkumus. Superkritiskā šķīdinātāja ekstrakcija ir viena no relatīvi jaunām ekstrakcijas metodēm, kuras lielākais ieguvums, salīdzinot ar klasiskajām metodēm, ir organisko šķīdinātāju patēriņa samazinājums un parauga caurlaidības palielinājums [131]. Kad šķidrums tiek saspiests temperatūrā un

spiedienā virs to kritiskā punkta (skatīt 1.4. tabulu), tas kļūst par superkritisko šķidrumu. Šādos apstākļos superkritiskais šķidrums iegūst šķidruma un gāzes agregātstāvokļa īpašības, kā piemēram, blīvums šim superkritiskajam šķidrumam ir līdzīgs šķidrumam, bet viskozitāte ir līdzīga gāzes fāzei [115]. Superkritiskie šķidrumi parāda unikālas īpašības, kas ļauj tos izmantot kā šķīdinātājus. Šo šķidrumu blīvums ir salīdzinoši augsts, līdz ar to ir liela šķīdināšanas spēja, turklāt to ir viegli mainīt, variējot ar temperatūru un spiedienu kritiskā punkta robežu apgabalā.

1.4. tabula

Dažu šķidrumu fizikālie parametri, lai sasniegtu superkritisko stāvokli [115]

Šķīdinātājs	Temperatūra (°C)	Spiediens (atm)	Blīvums (g·mL ⁻¹)
Etēns	10,1	50,5	0,200
Ūdens	101,1	217,5	0,322
Metanols	-34,4	79,9	0,272
Oglekļa dioksīds	31,2	72,9	0,470
Etāns	32,4	48,2	0,200
Slāpekļa oksīds	36,7	71,7	0,460
Sēra heksafluorīds	45,8	37,7	0,730
n-Butēns	-139,9	36,0	0,221
n-Pentāns	-76,5	33,3	0,237

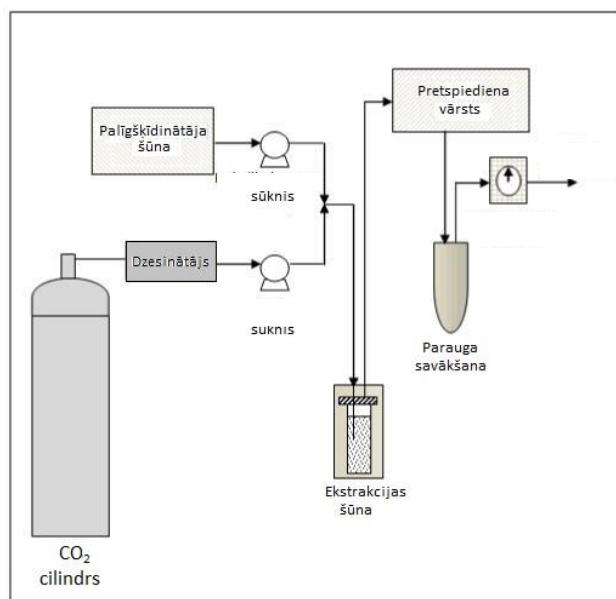
Galvenie parametri, kuri ir ietverti šajā metodē ir:

- 1) temperatūra - to palielinot var panākt analīta difūzijas atvieglošanu (ūdens difūzija 25 °C temperatūrā ir apmēram desmit reizes mazāka kā 200 °C temperatūrā), veicināt masas pārneses procesus, graujot iekšmolekulāros spēkus, samazināt viskozitāti (nodrošina labāku šķīdinātāju iekļūšanu matricā) un samazināt virsmas spraigumu (ļauj ūdenim labāk samitrināt matricu) [114].
- 2) spiediens līdz 400 atm;
- 3) parauga tilpums;
- 4) paraugu savākšana;
- 5) modificētāju (palīgšķīdinātāju) pievienošana;
- 6) plūsmas un spiediena kontrole.

SFE shēma attēlota 1.15. attēlā. Visbiežāk šajā metodē izmanto CO₂, lai iegūtu bioloģiski aktīvus komponentus no augu biomasas. Jaunākajos pētījumos CO₂ vietā izmanto arī argonu, propānu, butānu, dietilēteri u.c., kas arī ir salīdzinoši lēti, un daļēji atbilst “zaļās” analītiskās ķīmijas pamatprincipiem, kā CO₂ [132, 133]. CO₂ lietošanas priekšrocības ir:

- viegli sasniegt superkritisko stāvokli (31,2 °C un 72,9 atm);
- lēts, netoksisks, nedegošs šķīdinātājs;

- drošs, lai pēc ekstrakcijas šos ekstraktus tieši varētu izmantot pārtikas industrijā un pat medicīnā [134].



1.15.att. Superkritiskā šķīduma ekstrakcijas sistēma

Šķīdinātāja polaritāte ir svarīgs faktors, ekstrahējot polārus savienojumus, tādēļ CO₂ polaritātes robežu paplašināšanai tam pievieno organiskus šķīdinātājus līdz 15 % kā etanolu, metanolu un acetonu, lai iegūtu polifenolu saturošus savienojumus [135, 136]. Lielākās šīs metodes priekšrocības ir:

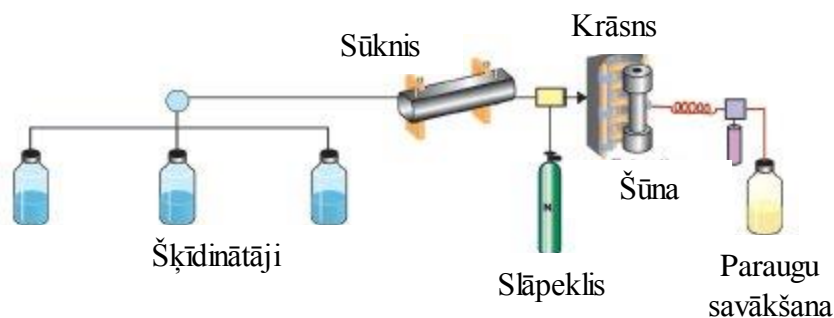
- ekstrakcija notiek zemā temperatūrā, kas samazina ekstrahējamo savienojumu destrukciju;
- nav šķīdinātāja atlikumu;
- videi draudzīga ekstrakcijas metode.

Lielākie šīs metodes trūkumi ir mazas variēšanas iespējas ar šķīdinātāju polaritātēm, līdz ar to nav pārāk plašs klāsts ar iegūstamiem polifenolu savienojumiem no augu biomasas.

1.10.3. Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija

Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija (ASE) ir cietviela-šķīduma ekstrakcijas process, kas tiek veikts paaugstinātā temperatūrā, visbiežāk no apkārtējās vides līdz 200 °C, spiedienā no 10 līdz 15 MPa un inertā atmosfērā. Paaugstinātā temperatūra atvieglo iekšmolekulāro spēku pārraušanu. Paaugstinoties temperatūrai, ūdeņraža saites pavājinās, paātrinot ekstrakcijas kinētiku - šķīstošās vielas atšķelšanu no matricas. Termālā enerģija samazina aktivācijas enerģiju desorbcijas procesam (ekstrakta izvilkšana no šūnu sienām), kas nodrošina izšķīstošo komponentu šķīšanu un pārnesi šķīdinātājā no matricas. Paaugstinoties temperatūrai, samazinās

šķīdinātāja viskozitāte, nodrošinot labāku šķīdinātāja iekļūšanu matricā, kas sekmē ekstrakcijas procesus. Paaugstinātais spiediens, ja tas ir pietiekams, saglabā šķīdinātāju šķidrā agregātstāvoklī un ļauj to lietot virs šķīdinātāja viršanas temperatūras [137, 138]. Spiediens palīdz tam iespieties matricā, tādējādi tiek panākta droša un ātra ekstrakcija [130]. ASE sistēma parādīta 1.16. attēlā.



1.16. att. Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas sistēma

Ierasti ASE metodē izmanto dažādus šķīdinātājus, bet var lietot arī šķīdinātāju maisījumus, tādējādi plašā diapazonā variējot ar šķīdinātāju īpašībām. [113]. Lielākās šīs metodes priekšrocības ir:

- iespējas lietot šķīdinātāju maisījumus;
- mazs šķīdinātāju un laika patēriņš.

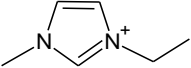
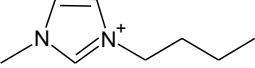
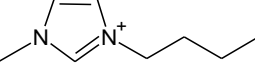
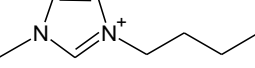
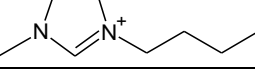
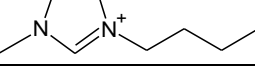
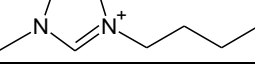
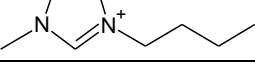
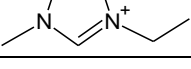
1.10.4. Frakcionēšana/ekstrakcija ar jonu šķīdumiem

Pēdējos trīsdesmit gados arvien vairāk gaistošos organiskos šķīdinātājus mēģina aizstāt ar videi draudzīgākiem šķīdinātājiem, kā piemēram, jonu šķīdumiem (JŠ). Uz JŠ pamatota savienojumu ieguves tehnoloģija no augu biomasas ir viena no daudzsolšākajām pēdējā laika biorafinēšanas tehnoloģijām, kas ir attīstījusies, pateicoties videi draudzīgai un homogēnai procesu metodoloģijai [139]. Biomasas izejvielas efektīva pārstrāde, lai iegūtu materiālus un ķīmikālijas, prasa padziļinātu izpratni par augu šūnas sienīņu dabisko struktūru/konstrukciju un sastāvdaļām, kas var virzīt biomasas vieglas priekšapstrādes tehnoloģisku un robustas katalīzes attīstību, lai sadalītu biomasu komponentos tālākām pārstrādēm, tāpēc efektīvai biorafinēšanas sasniegšanai ir vajadzīgas inovatīvas tehnoloģijas. Lai arī tradicionālais lignīna atdalīšanas un analīzes process no lignocelulozes materiāla ir Klāsona process, tajā izmanto agresīvus reaģentus, kas iznīcina strukturālo informāciju pēc hidrolīzes un nedod pilnu skaidrojumu par dabisko lignocelulozes materiāla struktūru, kas ir lielākais izaicinājums koksnes ķīmijā. Ir pierādīta lignocelulozes materiāla šķīdība jonu šķīdumos, un selektīvu komponentu izšķīdināšana tajos paver jaunas modernas pētniecības iespējas, lai novērtētu lignocelulozes un

lignīna struktūru. Ir pierādīts, ka anjonam ir primārā ietekme uz jonu šķīduma īpašībām un pēc tam seko katjona ietekme. Specifiski kombinējot anjonu un katjonu, ir iespējams iegūt parametrus ar atšķirīgiem termodinamiskiem un fizikāli ķīmiskiem parametriem, kurus var izmantot selektīviem mērķiem, piemēram, biomasas selektīvai komponentu šķīdināšanai. JŠ bieži tiek izcelti ar daudzām labām īpašībām kā necīgu tvaika spiedienu, augstu termisko stabilitāti, neuzliesmojamību, zemu toksicitāti u.c. JŠ tiek uzskatīti kā “zaļie šķīdinātāji”. JŠ ir ķīmiskas sistēmas, kas sastāv no vismaz diviem komponentiem, šajā darbā tuvāk tiks apskatīti tikai divu komponentu JŠ, jo tie tiek visbiežāk izmantoti augu biomasas apstrādei. JŠ ķīmiskajai struktūrai ir ievērojama ietekme uz to fizikāli ķīmiskajām īpašībām, kas nozīmīgi ietekmē mērķsavienojumu iznākumu [140]. JŠ piemīt spēja izšķīdināt augu biomasu saudzīgi, īpaši to neizmainot [141, 142]. Dabas vielu ekstrakcijai izmantoto dažādus JŠ ar atšķirīgām īpašībām, to piemēri ir doti 1.5. tabulā.

1.5. tabula

Bieži izmantotu JŠ fizikālās īpašības, kas ir nozīmīgas biomasas ekstrakcijai

Katjons	Anjons	Apzīmējums	Kušanas temperatūra (°C)	Blīvums (g·mL ⁻¹)	Molmasa (g·mol ⁻¹)
	Cl ⁻	[C ₂ C ₁ im]Cl (32)	77 - 79	1,11	146,62
	Cl ⁻	[C ₄ C ₁ im]Cl (33)	70 - 73	1,08	174,67
	Br ⁻	[C ₄ C ₁ im] Br (34)	65 - 75	1,30	219,12
	DMP ⁻	[C ₄ C ₁ im]DMP (35)	-21	1,16	264,26
	OAc ⁻	[C ₄ C ₁ im]OAc (36)	< - 20	1,055	198,26
	OTs ⁻	[C ₄ C ₁ im]OTs (37)	70	1,17	310,41
	BF ₄ ⁻	[C ₄ C ₁ im]BF ₄ (38)	-82	1,26	226,02
	HSO ₄ ⁻	[C ₄ C ₁ im]HSO ₄ (39)	38	1,277	236,29
	PF ₆ ⁻	[C ₂ C ₁ im]PF ₆ (40)	58 - 62	1,38	256,13

32- 1-etil-3-metilimidazolijs hlorīds, **33-** 1-butil-3-metilimidazolijs hlorīds, **34-** 1-butil-3-metilimidazolijs bromīds, **35-** 1-butil-3-metilimidazolijs dimetilfosfāts, **36-** 1-butil-3-metilimidazolijs acetāts, **37-** 1-butil-3-metilimidazolijs tozilāts, **38-** 1-butil-3-metilimidazolijs tetrafluorborāts, **39-** 1-butil-3-metilimidazolijs hidrogēnsulfāts, **40-** 1-etil-3-metilimidazolijs heksaflorborāts

Darbā uzmanība, galvenokārt, ir koncentrēta uz biopolimēru, pamatā lignīna, izolēšanu no augu biomasas ar JŠ. Biomasas šķīdināšana jonu šķīdumos tik aktīvi pētīta, lai selektīvi varētu sadalīt augu biomasas pamatkomponentus [143]. Ir pierādīts, ka celulozes šķīdību būtiski ietekmē JŠ anjons, svarīgs faktors ir JŠ spēja būt ūdeņraža saišu akceptoram un apslāpēt šo saišu donorus, jo galvenais nosacījums celulozes šķīšanā ir saskarsmē un iekšmolekulāro ūdeņraža saišu destrukcija. Lignīna šķīšanai tik nozīmīga nav šo saišu destrukcija, tomēr liela nozīme ir pierādīta anjona ietekmei, piemēram, lielu nekoordinētu anjonu saturošie JŠ nešķīdina lignīnu, anjona - katjona asociācija nozīmīgi ietekmē lignīna šķīdības ātrumu, tādejādi būtiska ietekme ir gan katjonam, gan anjonam [144].

1.10.5. Ekstrakcija mikroviļņos

Ekstrakcija mikroviļņos (ME) ir salīdzinoši jauna metode biomasas ekstrakcijai, lai iegūtu polifenolu savienojumus no plaša klāsta materiāliem [145]. Mikroviļņi ir nejonizējoši elektromagnētiski viļņi ar frekvenci no 300 MHz līdz 300 GHz un atrodas starp radio un infrasarkanā starojuma reģioniem elektromagnētisko starojumu spektrā [111, 146]. Jonu vadītspējas un dipolu rotācijas rezultātā, mikroviļņi iedarbojas uz polārām molekulām, tās sasildot. Vielas dielektriskā konstante nosaka materiāla spēju uzsildīties mikroviļņu apstrādes rezultātā [147]. Mikroviļņu karsēšanas efektivitāte ir atkarīga no materiāla enerģijas izkliedes faktora, kas mēra parauga spēju absorbēt mikroviļņu enerģiju un izkliedēt radušos siltumu apkārtesošajās molekulās konvekcijas veidā [111, 146].

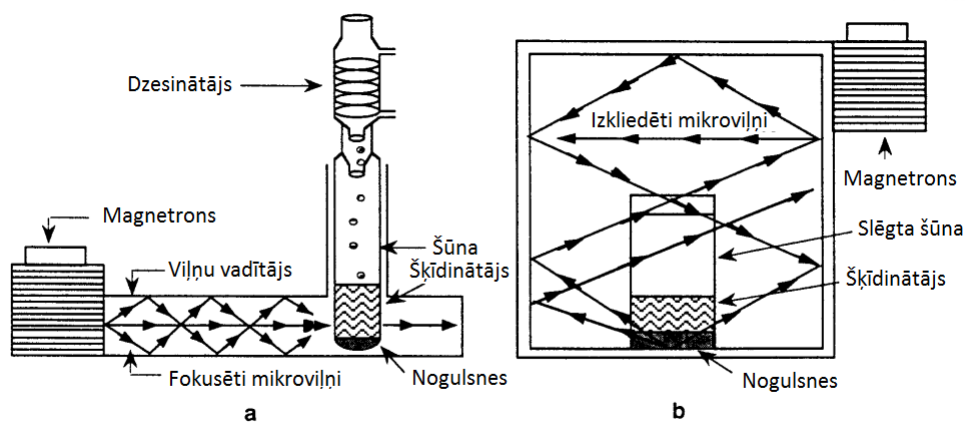
Optimizēts mikroviļņu ekstrakcijas process ir tieši saistīts ar procedūru apstākļiem, kuriem jāpievērš īpaša uzmanība, salīdzinot ar citām ekstrakcijas metodēm, kā piemēram:

- Šķīdinātāja sastāvs - šķīdinātāja īpašības kā šķīdinātāja iekļūšana un mijiedarbība ar parauga matricu, kā arī šķīdinātāja dielektriskā konstante korelē ar šķīstošo savienojumu šķīdību ME laikā. Šķīdinātājam vajadzētu būt ar augstu selektivitāti pret izšķīdušo vielu, neselektīvam pret nevēlamiem paraugu matricas komponentiem un ar labu spēju absorbēt mikroviļņu starojumu. Ir svarīgi izvēlēties piemērotu šķīdinātāju, pamatojoties uz to viršanas temperatūru, enerģijas izkliedes un dielektriskām īpašībām. Visbiežāk lietotie un rekomendējamie augu biomasas ekstrakcijai ar ME ir organiskie šķīdinātāji kā, piemēram, etanols, metanols arī acetons, un bieži tos lieto kombinācijā ar ūdeni, tādejādi variējot ar to īpašībām. Etanols ir visbiežāk lietotais un piemērotākais šķīdinātājs ar labu mikroviļņu absorbcijas spēju un piemērots daudzu bioloģiski aktīvu vielu iegūšanai no augu biomasas [148, 149].
- Šķīdinātāja - cietās matricas attiecība - cietās fāzes attiecība pret šķīdinātāju ir svarīgs parametrs. Šķīdinātāja tilpumam jābūt tādā, lai nodrošinātu visa parauga

iegremdēšanu šķīdinātājā ME laikā, it īpaši izmantojot cieto matricu, kā augu biomasa, kurai ir tendence uzbriest, mijiedarbojoties ar šķīdinātājiem. Protams, jāņem vērā, jo lielāka būs šķīdinātāja attiecība pret cieto fāzi, jo vairāk tā absorbēs mikroviļņu enerģiju, lai sasniegtu optimālos ME apstākļus un, līdz ar to arī laiku [146].

- Mikroviļņu jauda - augu biomasas ekstrakcijai, izmantojot ME ar augstu mikroviļņu jaudu, var izraisīt zemu produkta iznākumu, jo liela mikroviļņu jauda degradē termiski jutīgus savienojumus. Mikroviļņu jauda ir tieši saistīta ar parauga daudzumu un apstrādes laiku. Tā nodrošina lokalizētu parauga karsēšanu, kas ir pamats augu biomasas matricas graušana un šķīstošo savienojumu atbrīvošanai no matricas, tādēļ, palielinot mikroviļņu jaudu, palielinās ekstrakcijas iznākums, un ir iespēja samazināt ekstrakcijas laiku, bet ar nosacījumu, līdz robežai, kad sākas nevēlami procesi ME laikā [150].
- Maisīšana - nodrošina vienmērīgu šķīdinātāja līdzsvara iestāšanos starp tvaika un šķidrums fāzēm, palīdz nodrošināt masas apmaiņas procesus, izkliedējot tilpumā izšķīdušās vielas koncentrētos apgabalus [151].
- Cietā materiāla virsmas laukums - zināms ir fakts, ka ekstrakcijas efektivitāte palielinās, palielinoties virsmas laukumam, kas nodrošina efektīvākus masas apmaiņas procesus ekstrakcijas laikā, tādēļ biomasas cietās matricas paraugi ir jāsmalcina. Parasti daļiņu izmēri ekstrakcijām svārstās no 0,1 mm līdz 2 mm [152].
- Augu biomasas īpašības - viens no svarīgākajiem faktoriem, iekļaujot ūdens saturu.

Lai iegūtu bioloģiski aktīvus savienojumus no augu biomasas, ir jāoptimizē ME parametri, lai iegūtu vislabākos rezultātus. Salīdzinājumā ar klasiskajām ekstrakcijas metodēm, ir pierādīts, ka ME ir daudzkārt efektīvāka, piemēram, zaļās tējas kopējais polifenolu saturs, izmantojot ME palielinās par 7 %, samazinoties ekstrakcijas laikam un nepieciešamajai enerģijai, bet polifenolu saturs no ozolu mizas palielinājās divas reizes, vienlaikus trīs reizes, palielinoties ekstrakcijas efektivitātei. salīdzinājumā ar klasiskajām metodēm [153, 154]. Ir izstrādātas dažāda dizaina iekārtas mikroviļņu ekstrakcijai - gan slēgta tipa, gan atvērtas. Slēgta tipa reaktoros ir iespējams strādāt paaugstinātā spiedienā un temperatūrā, ko rada sistēma, uzkarstot mikroviļņu ietekmes rezultātā, kā arī iespēja strādāt inertā atmosfērā, lai izvairītos no dažādiem nevēlamiem blakusprocesiem, kā piemēram, paraugu oksidēšanās u.c. Atvērta tipa ME strādā pēc klasiskām ekstrakcijas metodēm atmosfēras apstākļos skatīt 1.17. attēlā.



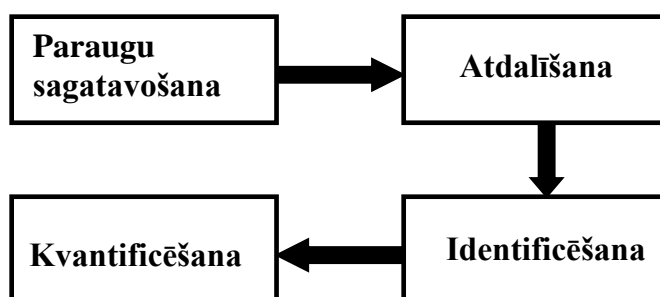
1.17.att. Atvērta (a) un slēgta (b) tipa ME iekārtu tipi [155]

1.10.6. Torefikācija

Torefikācija ir termāls biomasas apstrādes process, kurā biomasu tiek apstrādāta 200 - 300 °C temperatūrā inertā atmosfērā. Ja torefikāciju apskata no biomasas enerģētiskā viedokļa, tad torefikācija tiek veikta, lai uzlabotu biomasas kā degvielas īpašības, kā piemēram, tiek iegūts materiāls ar labu sasmalcināšanas pakāpi, zemu mitruma saturu, lielāku C/O attiecību biomasā, līdz ar to lielāku augstāko sadegšanas siltuma vērtību, palielināto enerģētisko blīvumu. Parasti torefikācijas rezultātā apmēram 70 % no masas tiek saglabāti kā cietais atlikums, savukārt, apmēram 30 % no masas tiek zaudēta un pārvērsta kondensētos (ūdens, viegli gaistoši organiski savienojumi, lipīdi) un nekondensētos (CO_2 , CO , CH_4) produktos [156]. Torefikācijas laikā hemicelulozes degradējas, kā rezultātā formējas viegli gaistoši produkti. Notiek lignīna un celulozes daļējā depolimerizācija [157]. Literatūrā torefikācija kā biomasas priekšapstrāde pirms ekstrakcijas ir maz pētīta, tomēr pētījumi ir parādījuši tās efektivitāti ekstrakcijas procesos. Mazais pētījumu skaits aktualizē detalizētāku torefikācijas kā ekstrakcijas priekšapstrādes izpēti, jo lielākoties ir pētīta biomasas pamatkomponentu raksturošana un tālāka to izmantošana, kas vērsta uz biomasas kā enerģijas ieguves nesēja aspektu. Ir pierādīts, ka piemēram, bērza koksnes torifikācija, ievērojami palielina izekstrahēto zemmolekulāro savienojumu apjomu, bet vienlaikus pārāk augstu temperatūru izmantošana sekmē bioloģiski aktīvu savienojumu, kā polifenolu savienojumu degradāciju [158]. Šajā darbā torefikācija tiek apskatīta kā biomasas termiskā apstrāde pirms ekstrakcijas, lai novērtētu tās ietekmi uz ekstrakcijas procesiem.

1.11. No augu biomasas iegūto polifenolu savienojumu saturošu ekstraktu un lignīna pētīšanas metodes

Samazināts šķīdinātāja patēriņš, alternatīvs drošāks šķīdinātājs, un saprātīgs enerģijas patēriņš ir jālīdzsvaro ar tradicionālām analītiskās ķīmijas nostādnēm kā, piemēram, ekstrakcijas iznākumu un selektivitāti [159]. Analītiskā ķīmija, kas ietver paraugu sagatavošanu un analīzi, ir ceļš, kā pamatot un ieviest jaunas videi draudzīgas tehnoloģijas vērtīgu savienojumu ieguvei gan laboratorijā, gan rūpnieciskos apjomos. Ķīmiskās analīzes sistēma pamatojas uz 1.18. attēlā parādīto shēmu, analīzes posmi nemainās, mainās tikai pieeja to izpildei.



1.18. att. Analītiskās sistēmas pamatshēma [160]

Analītiskā ķīmija ir cieši saistīta ar “zaļās” ķīmijas pamatprincipiem, no kuriem svarīgākie ir :

- ✓ Atkritumu veidošanās novēršana;
- ✓ Atjaunojamu izejvielu izmantošana;
- ✓ Drošāku šķīdinātāju un palīgierīču izmantošana;
- ✓ Energoefektīvs process;
- ✓ Droša ķīmija, kas samazina potenciālus ķīmisko avāriju riskus.

Analītiskās sistēmas progress mūsdienās ļauj detektēt atsevišķus savienojumus pat ļoti niecīgā daudzumā. Kvalitatīvā un kvantitatīvā analīze noslēdz garu procedūru virkni, kas sākas ar paraugu iegūvi un sagatavošanu.

No biomasas ekstrakcijas rezultātā izdalīto polifenolu saturošu savienojumu sastāva raksturošana ir sarežģīta, jo to veido biogēnie organiskie savienojumi, kas rodas dabisko un antropogēno apstākļu rezultātā. Tie savā starpā ir saistīti un sastāv no dažādiem komponentiem, tāpēc svarīgi ir noskaidrot ekstraktu un individuālu savienojumu sastāvu, struktūras īpatnības, funkcionālās grupas, jo šie parametri ietekmē vielas raksturlielumus, un tos iespējams noteikt ar dažādām metodēm. Visbiežāk no dabasvielām iegūto savienojumu analīzi sāk ar kopējo polifenolu savienojuma satura noteikšanu ekstraktā, un biežāk izmantotā analīzes metode ir Folina-Čikolto fotometrijas metode. Metode balstās uz oksidēšanās - reducēšanās reakcijas

pamatu, kur Folina reaģents oksidē polifenolus tajā pašā laikā pats reducējoties un mainot krāsu. Par standartvielu visbiežāk tiek izmantota galluskābe [161].

Nepolāru un vidēji polāru savienojumu analīzei tradicionāli izmanto gāzu hromatogrāfiju (GC). Šī analīzes metode ietver derivatizāciju (metilēšanu, acetilēšanu vai sililēšanu) un gāzu hromatogrāfijas - masspektrometrijas vai gāzu hromatogrāfijas - liesmas jonizācijas detektora (FID) analīzi [162]. Augstefektīvā šķidrums hromatogrāfija (HPLC), ko pēdējos gados intensīvi aizstāj ultra efektīvā šķidrums hromatogrāfija (UPLC), ir visplašāk lietotās zem molekulu hidrofīlo ekstraktvielu analīzes metodes. Lielāko daļu polifenolu analīzei izmanto gradienta sistēmu, lai varētu sadalīt polifenolu kompleksus maisījumus, pamatojoties uz savienojumu atšķirīgo polaritāti. Apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfijā, visbiežāk kā kustīgā fāze, tiek izmantots acetonitrils vai metanols, kas paskābināts ar skābi, lai novērstu fenolu savienojumu protonēšanu. Visbiežāk izmanto UV-detektoru, diožu matricas detektoru (DAD), kā arī fluorescences detektoru (FLD). Mūsdienās polifenolu pētīšanai HPLC un UPLC apvieno ar masspektrometriju un NMR [163, 164].

Lignīnu saturošo blakusproduktu izolēšanas metožu attīstība paplašina iepriekšminēto lignīnu struktūras komponentu dažādību un padziļina jaunu fitomasas ķīmiskās (un termoķīmiskās) pārstrādes tehnoloģiju attīstību. Pašlaik nav analītisko metožu, kas ļautu pilnīgi raksturot lignīnu struktūru. Ļoti bieži rodas nepieciešamība raksturot noteiktas lignīna struktūras īpašības, atkarībā no jomas, kurā to vēlas izmantot. Lai iegūtu pēc iespējas vairāk informācijas par to, ir nepieciešams apvienot dažādas metodes. Lignīnu analītiskos pētījumus var sadalīt vairākās grupās: funkcionālo grupu noteikšana, elementanalīze, spektrometriskās metodes, degradācijas eksperimenti un termiskā analīze. Lignīna struktūras pētīšanai izmanto ķīmiskās un instrumentālās metodes.

Metoksilgrupu noteikšanai visplašāk izmanto Ceizela-Fibeka-Švapaha metodi, kas ietver šo grupu kvantitatīvu pārraušanu ar jodūdeņražskābi, veidojot metiljodīdu. Kopējo hidroksilgrupu noteikšanai izmanto kodolmagnētisko rezonansi, acetilēšanas, metilēšanas, u.c. reakcijas. Fenola hidroksilgrupas nosaka, izmantojot potenciometrisko un konduktometrisko titrēšanu, hemosorbcijas un metilēšanas metodes, diferenciālo UV-spektrometriju, u.c. Alifātiskās hidroksilgrupas nosaka kā starpību starp kopējo un fenola hidroksilgrupu saturu, kā arī ar NMR. Aldehīd- un ketogrupu noteikšanai visplašāk izmanto reakciju ar hidroksilamīna hidrohlorīdu. Karboksilgrupas nosaka, izmantojot galvenokārt potenciometrisko un konduktometrisko titrēšanu [165 - 167].

Elementanalīze, kopā ar metoksilgrupu noteikšanu, dod informāciju par C₉ vienību vidējo saturu lignīnā. Biežāk izmantojamās spektrometriskās metodes ir UV un FTIR spektroskopija, kodolmagnētiskās rezonances spektroskopija (PMR un ¹³C-NMR),

masspektrometrija kombinācijā ar gāzes hromatogrāfiju un elektrona spina rezonanses spektroskopija (EPR) [165, 166].

Pašlaik ir zināms, ka jebkuras sugas koksnei un visiem no koksnes izdalītajiem preparātiem piemīt paramagnētiskas īpašības - to struktūrā ir brīvie radikāļi. Pirmoreiz paramagnētisko centru klātbūtne lignīnā tika atklāta 1960. gadā. Lignīnam ir tipiska EPR līkne - singlets. EPR metodi izmanto lignīna paramagnētisko centru noteikšanai, lignīna struktūras polikonjugācijas noteikšanai, lignīnu transformācijas raksturošanai ķīmiskajos, bioloģiskajos un termiskajos procesos, lignīnu kompleksu veidošanās ar pārejas metāliem, termisko pārvērtību un savietojamības ar cietiem polimēriem pētīšanai [166].

Degradācijas metodes ietver ķīmiskās degradācijas apstrādes paņēmienus: etanolīzi, acidolīzi, hidrogenolīzi, maigo hidrolīzi, tioacetolīzi, oksidēšanu (ar permanganātu, nitrobenzolu, vara(II) oksīdu), ozonēšanu, kā arī termiskās degradācijas metodi. Šo metožu pamatā ir lignīna molekulas sašķelšana zem molekulāros produktos, kuru identificēšana ļauj iegūt informāciju par makromolekulas uzbūvi un saišu veidiem tajā.

Analītiskā pirolīze pieder pie perspektīvākajām destruktīvajām metodēm koksnes ķīmijā, to tradicionāli izmanto lignīnu struktūras pētīšanā. Galvenie ķīmiski destruktīvo metožu trūkumi ir to sarežģītība oksidējošo aģentu izmantošanas un analīzes laukietilpības dēļ. Analītiskās pirolīzes metode ir ātra, jo nav nepieciešama sarežģīta ķīmiskā apstrāde, parauga sagatavošanas procedūra sastāv no parauga žāvēšanas un sasmalcināšanas. Lignocelulozes materiālu analītiskās pirolīzes procesā polisaharīdu un lignīna degradācijas produktus sadala ar gāzes hromatogrāfiju un identificē ar masspektrometriju. Pirolīzē molekula ar siltumu tiek sašķelta specifiskās vietās ar zemām saišu enerģijām. Analītiskās pirolīzes apstākļos notiek ētera un oglekļa-oglekļa saišu pārraušana un, rezultātā lignīns sadalās līdz monomēru un dimēru savienojumiem. Identificētie monomērie destruktijas produkti, to absolūtie vai relatīvie daudzumi sniedz informāciju par polimēra struktūru kopumā. Piemērotos apstākļos lignīna pirolīzes procesā veidojas monomēri fenoli, kuros propāna ķēde ir pilnīgi atdalīta vai saīsināta līdz vienam vai diviem oglekļa atomiem. Savienojumu ar saīsinātu ķēdi esamība pirolīzes produktos liecina par β -aril-ētera saišu destruktiju. Pirolītiskas dehidrogenēšanas rezultātā propāna ķēdēs veidojas jaunas dubultsaites. Metode ir noderīga dažādu izcelsmju lignīnu ātrai salīdzināšanai un tiek plaši lietota lignīna struktūras pētīšanai. Uz pirolīzes produktu gvajacil- un siringil atvasinājumu relatīvā satura pamata iespējams paraugus klasificēt kā gvajacil-tipa vai gvajacil-/siringil- tipa lignīnus [166 - 170].

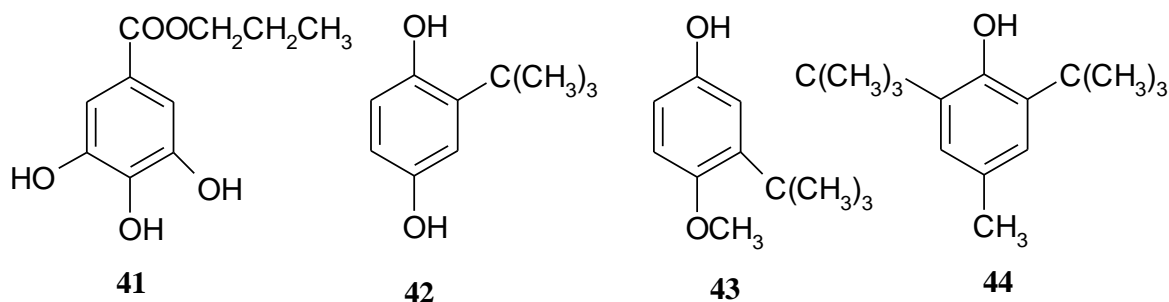
Lignīna molekulmasas noteikšanai visplašāk izmanto gēlfiltrācijas hromatogrāfiju, kuru apzīmē arī SEC (size exclusion chromatography) vai GPC (gel permeation chromatography). Saskaņā ar šīs metodes pamatprincipu, ar mazākiem eluenta tilpumiem izdalās lielmolekulāras frakcijas,

ar lielākiem tilpumiem - zemmolekulāras frakcijas. Kalibrēšanai parasti izmanto polistirolu standartus [168, 171].

Iegūtās polifenolu kompozīcijas ir sarežģītas pēc sastāva, dabīgo savienojumu un to modifikācijas iegūtas augu biomasas apstrādes gaitā. Sakarā ar to, ir nepieciešamība veikt daudzpusīgu analīžu ciklu, lai raksturotu pilnībā iegūtos savienojumus no visiem aspektiem un dotu pilnīgu iegūto savienojumu raksturojumu.

1.12. Antioksidantās aktivitātes pētīšanas metodes

Augos esošie bioloģiski aktīvie savienojumi ir dabīgi antioksidanti, kas veidojušies evolūcijas gaitā. Šie savienojumi augus pasargā no lielākās daļas nelabvēlīgo faktoru, un evolūcijas gaitā cilvēce ir iemācījusies tos izmantot savā labā. Zināms, ka augu biomasa satur dažādus augu fenolus, benzoskābju atvasinājumus, fenilpropanoīdus un citus savienojumus, kas palīdz samazināt un cīnīties ar dažādām saslimšanām. Papildus brīvo radikāļu neitralizēšanai, dabas fenolu savienojumi darbojas daudzpusīgi, kā piemēram, tiem piemīt anti - alergiska, pretvīrusu, anti - bakteriāla, imūnsistēmu stimulējoša, pret vēža u.c. iedarbības [172 - 174]. Aizvietotāji fenil- gredzenā un konjugēto oglekļu skelets spēlē svarīgu lomu antioksidantu īpašību raksturošanā no augu biomasas izdalītiem fenola savienojumiem, tāpēc dažādi oksidanti un antioksidanti stipri atšķiras fizikālo un ķīmisko īpašību ziņā, tāpēc nav vienas universālas metodes, lai novērtētu visas antioksidantās īpašības vienlaicīgi [175]. Jāņem vērā fakts, ka atsevišķi savienojumi ar dažādām bioloģiskām aktivitātēm kopā spēlē lielāku lomu, veidojot sinerģisko efektu, nekā atsevišķi savienojumi. Pārtikas produktu bojāšanās rezultātā samazinās to kvalitāte (uzturvērtība, garša, smarža, krāsa), ko izraisa oksidēšanās procesos radušies produkti, kas potenciāli var būt pat toksiski. Tāpēc, plaši tiek lietoti sintētiskie antioksidanti, lai saglabātu krāsu, smaržu un izvairītos no vitamīnu destrukcijas. Rūpniecībā plaši lietoti sintētiskie antioksidanti ir propilgalāts (PG) (**41**), *tert*-butilhidrohinons (TBHQ) (**42**), butilēts hidroksianizols (BHA) (**43**), butilēts hidroksitoluols (BHT) (**44**), un citi (skatīt 1.19. attēlu). Pētījumi liecina, ka daļa no pārtikā lietotajiem sintētiskiem antioksidantiem ir toksiski. Tāpēc, pašlaik tiek veikti intensīvi klīniskie pētījumi visā pasaulē, ar uzsvaru uz sintētisko antioksidantu izmantošanu. Visu pētījumu rezultātā pasaules tirgū tiek pieprasīts aizvien vairāk šo sintētisko antioksidantu aizstājēju - dabisko antioksidantu. To pielietojums ir dažādās tautsaimniecības nozarēs.



1.19. att. Plašāk lietotie sintētiskie antioksidanti

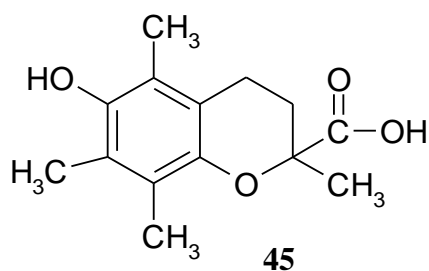
Svarīgi ir veikt no augu biomasas izdalīto bioloģiski aktīvo savienojumu pētījumus šajā virzienā, kā perspektīvus un tirgū piedāvājamus antioksidantus [176 - 178]. No dabas vielām izdalīto bioloģiski aktīvo ekstraktu pētīšanas metodes pamatojas uz dažādiem analīzes principiem, piemēram, fotometriskās, hemiluminiscēntas, fluorescēntas, elektroķīmiskās, EPR, u.c. metodes [175, 179]. Lai iegūtu vispusīgu informāciju par savienojuma antioksidantām īpašībām, ir jāizmanto vairāku metožu kombinācijas, skatīt 1.6. tabulu. Izvēloties kādu no metodēm, ir jāņem vērā vairāki faktori. Starp svarīgākajiem ir oksidanta - antioksidanta mijiedarbības reakcijas mehānisms, antioksidantā efekta noteikšanas drošums, metodes vienkāršība, aparatūras pieejamība, laba reproducējamība, metodes pielietošanas iespēja hidrofilēm un lipofilēm antioksidantiem dažādās vidēs, iespējas lietojot dažādus antioksidantās aktivitātes noteikšanas testus [181].

1.6. tabula

Antioksidantās aktivitātes noteikšanas metodes un to princips [180]

Noteikšanas metode	Metodes princips	Gala produkta detektēšana
Spektrometriskās detektēšanas metodes		
DFPH	Antioksidanta reakcija ar organisku radikāli	Fotometrija, $\lambda = 520$ nm
ABTS	Antioksidanta reakcija ar organisku katjona radikāli	Fotometrija, $\lambda = 743$ nm
FRAP	Antioksidanta reakcija ar Fe(III) kompleksu	Fotometrija, $\lambda = 700$ nm
PFRAP	Kālija ferricianīda reducēšana ar antioksidantu un sekojoša kālija ferrocianīda reakcija ar Fe ³⁺	Fotometrija, $\lambda = 700$ nm
CUPRAC	Antioksidanta izraisīta Cu(II) reducēšana par Cu(I)	Fotometrija, $\lambda = 450$ nm
ORAC	Antioksidanta reakcija ar peroksilradikāli fluoresceīna klātienē	Fluorescēnces zudums: ierosināšana $\lambda = 485$ nm, emisija $\lambda = 525$ nm
HORAC	Antioksidanta reakcija ar OH radikāļiem fluoresceīna klātienē	Fluorescēnces zudums: ierosināšana $\lambda = 480$ nm, emisija $\lambda = 530$ nm

Kā iepriekš noskaidrots, no augu biomasas izdalītiem dabas antioksidantiem darbības pamatā ir svarīga nozīme aizkavēt un novērst brīvo radikāļu veidošanos dzīvajos organismos [182]. Fenola antioksidanti dezaktivē brīvos radikāļus, pateicoties H-atoma pārnesei no antioksidanta (ArO-H) aktīvas -OH grupas (grupām) uz brīvo radikāli (R•) [180, 183], tāpēc, vienas no svarīgākām un plašāk lietotām antioksidantās aktivitātes noteikšanas metodēm izmanto radikāļu deaktivēšanas principu, kā 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikāļu (DFPH•) deaktivēšanas metode un 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonskābes) katjonradikāļu (ABTS^{•+}) deaktivēšanas metode, kurās reducēta indikatora krāsas izmaiņas (gaismas absorbcijas palielināšanas vai samazināšanas pie noteikta viļņa garuma) korelē ar antioksidanta koncentrāciju paraugā. Skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitātes (ORAC) metode ir visplašāk izmantojamā konkurences metode. Antioksidants un substrāts - fluorescējošais savienojums - kinētiski konkurē par skābekļa aktīvajām formām - peroksilradikāļiem, kuri tiek ģenerēti, termiski sadalot azosavienojumus, piemēram, AAPH (2,2'-azobis-2-metilpropānimidamīda dihidrohlorīds). Šajā metodē antioksidanto aktivitāti novērtē, mērot fluorescences intensitāti un tās izmaiņas atkarībā no reakcijas laika. Tāpat tiek izmantotas arī lipīdu saturošu sistēmu termooksidēšanas metode (OXIPRES) un antioksidantu ievadīšana kompozītmateriālos. Ir parādīts, ka ievadot polifenolu savienojumu saturošus ekstraktus lipīdu saturošās sistēmās, tās tiek stabilizētas, attiecībā pret sistēmu, kurai nav pievienots antioksidants. Lai novērtētu antioksidanta aktivitāti, kā references materiālu parasti izmanto troloksu (**45**), kas ir vitamīna E (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karbonskābes) ūdenī šķīstošais analogs (1.20. attēls).



1.20.att. Troloksa struktūrformula

1.13. Literatūras apskata kopsavilkums

Pamatojoties uz literatūras izpēti ir secināts, ka biorafinēšanas koncepcija dabīgas izcelsmes antioksidantu izmantošanai pārtikas, farmācijas u.c. nozarēs ir daudzsološa, tomēr lai palielinātu šo antioksidantu komerciālo pievilcību, ir nepieciešams izstrādāt un attīstīt šo savienojumu jaunas, efektīvas ekstrakcijas metodes. Tādēļ darba specifika ir vērsta uz savienojumu ieguves procesu optimizāciju. Teorētiskie pētījumi parāda, ka augu biomasa ir ķīmisks kokteilis, kuru ir nepieciešams fracionēt, un lielākajā daļā gadījumu arī modificēt, lai

no tās iegūtu augstvērtīgāku kurināmo un dažādus vērtīgus ķīmiskos savienojumus, tāpēc promocijas darba mērķa sasniegšanas pamatā ir "biorafinēšana", ko var definēt kā objektu, kas ietver konversijas procesus un iekārtas, lai iegūtu kurināmo, jaudu un ķīmikālijas no biomasas. Literatūras apskats arī parāda, ka biomasas neviendabīguma un atšķirīgā ķīmiskā sastāva dēļ ir nepieciešams tās apstrādei izstrādāt dažādas metodes atkarībā no izejvielas veida, tās ievākšanas vietas un veida, uzglabāšanas apstākļiem un mērķsavienojumiem. Atslēga uz pēc iespējas efektīvāku augu biomasas izmantošanu ir atbilstošas un ilgtspējīgas biorafinēšanas koncepcijas izstrāde, lai sadalītu biomasu tās dominējošos komponentos un iegūtu pēc iespējas lielāku pievienoto vērtību visām frakcijām. Ir secināts, ka ekstrakcijas metodes izvēle ir atkarīga no biomasas materiāla dabas un vēlamajiem mērķsavienojumiem. Kopumā lielā mērā augu ekstraktu antioksidantā aktivitāte tiek saistīta ar polifenolu savienojumu esamību augu audos un tie visbiežāk atrodas šūnu iekšienē, tādēļ, lai varētu izdalīt šos savienojumus, ir nepieciešams pirms ekstrakcijas izjaukt šūnu membrānu. Parasti tas tiek izdarīts, veicot ķīmisku vai mehānisku apstrādi, membrānu izjaukšanu atvieglo spiediena vai temperatūras izmantošana. Ņemot vērā ekstraktvielu sastāva lielo daudzveidību, atsevišķo komponentu izolēšana ir apgrūtināta. Pēdējo gadu literatūra parāda, ka pašlaik pasaulē ir pieprasījums pēc jaunām alternatīvām ekstrakcijas metodēm, lai samazinātu ekstrakcijas laiku, šķīdinātāju patēriņu, palielinātu paraugu caurlaidību un uzlabotu analītu atgūstamību un samazinātu izmaksas, palielinot ražību un izmantojot videi draudzīgas metodes. Dažas no šīm mūsdienīgajām ieguves metodēm, kas ir izmantotas arī darba izstrādes gaitā, ir superkritiskā šķidrums ekstrakcija (SFE), paātrinātā šķīdinātāju ekstrakcija (ASE), ekstrakcija izmantojot ultraskaņu (UE) un mikroviļņus (ME), kā arī pseido virstošā slāņa ekstrakcija (FBE).

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

Promocijas darba mērķa sasniegšanai, polifenolu savienojumu ieguves metodikas izveidei no augu biomasas pārstrādes atlikumiem, kā arī zinātniski - tehniskai procesu un ķīmisko savienojumu analīzei, tika izvēlēti un sistematizēti teorētiskie un eksperimentālie pētījumu virzieni, uz kuru pamata ir izveidotas metodoloģiskās pieejas un pētījumu norises gaita.

Promocijas darbā veikto pētījumu strukturālā shēma (skatīt 2.1. attēlu), balstās pamatojoties uz sistemātisku metodoloģisko pieeju vairākos etapos.

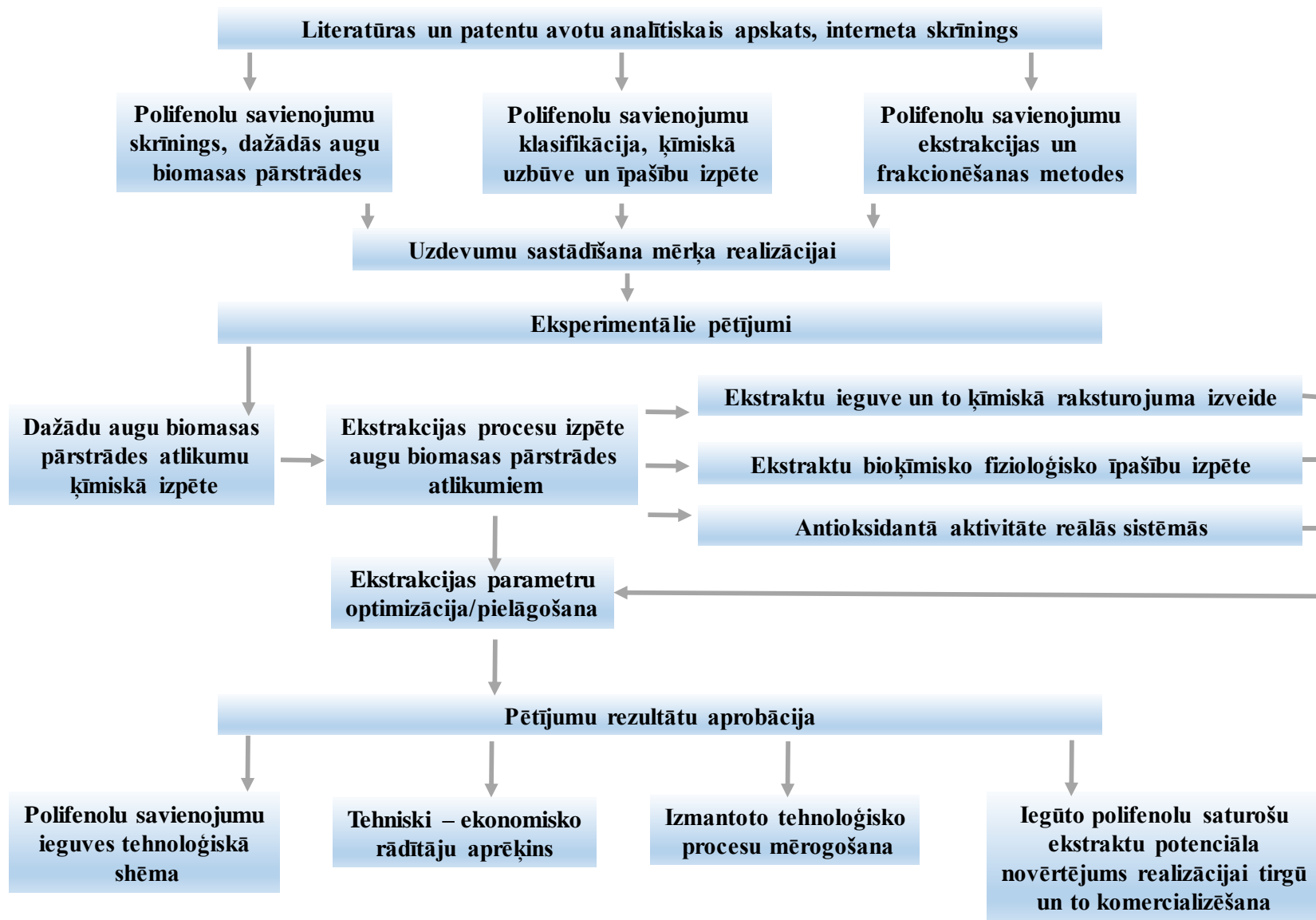
Pirmais promocijas darba etaps (zinātniskās literatūras izpēte/analīze) patentu un zinātnisko rakstu skrīnings, tādējādi tika izvēlēts un noteikts pētījumu virziens un to realizācijas veidi.

Otrais etaps (eksperimentālais darbs) koncentrējas uz polifenolu savienojumu iegūvi no dažādām izejvielām vai atšķirīgām ieguves metodēm, ķīmisko kompozīciju izpēti (kvalitatīvo un kvantitatīvo sastāvu) un antioksidantās aktivitātes pētījumiem, izvērtējot to izmaiņas, atkarībā no ekstrakcijas veida un parametriem, tai skaitā, izejvielas raksturlielumiem (morfoloģisko daļu attiecības paraugā). Detalizētāki eksperimentālie pētījumi, piemēram, papildus attīršanas soļi, veikti perspektīvākajiem paraugiem.

Trešais darba etaps (rezultātu aprobācija) parāda, ka promocijas darbā veikto eksperimentālo darbu rezultātā ir izveidota polifenolu savienojumu ieguves metodoloģija, atkarībā no augu biomasas veida un īpašībām, kā arī vēlamajiem mērķproduktiem.

Izvērtējot promocijas darbā iegūtos rezultātus, ir parādīts, ka, izmantojot mūsdienīgu, modernu instrumentālo aparāturu un kompleksu analītisko pieeju, ir iespējams paaugstināt Latvijas dabas resursu izmantošanas efektivitāti un palielināt vērtīgu, bioloģiski aktīvu savienojumu ieguves apjomus.

Rezultātu izvērtēšanas procesā ir integrēta arī izveidoto ieguves metodiku iespējamā pārnese uz industriāliem apjomiem, tomēr, ir jāņem vērā, ka šo procesu mērogošana uz lieliem apjomiem tomēr vēl ir izstrādes stadijā, tiek aktīvi strādāts pie procesu automatizācijas, izmantojot pilotiekārtas.



2.1. att. Promocijas darbā veikto pētījumu shēma

2.1. Pētāmie objekti

I. Augu biomasas mehāniskās pārstrādes blakusprodukti:

Latvijā augošu lapkoku mizas:

1. Baltalkšņa (*Alnus incana*) mizas ievāktas dažādos gadalaikos (vasara, rudens, ziema, pavasaris): 2010. gadā ievākta Daugavpils mežos 5 - 6 augustā, 2013. gadā ievākta Ērgļu novada, Ērgļu mežos 13 - 14 aprīlī un Ogres novada, Mazozolu pagasts 3. novembrī (Ogre 1), 2015. gadā ievāca Ogres novada, Mazozolu pagasts 8. novembrī (Ogre 2). Visās ievākšanas reizēs koku vecums bija ap 30 - 40 gadu, auguši mitrā augsnē.
2. Melnalkšņa (*Alnus glutinosa*) mizas ievāktas tajās pašās ievākšanas vietās un laikos kā baltalkšņa mizas, dažādos gadalaikos (vasara, rudens, ziema, pavasaris) auguši mitrā augsnē, koku vecums ap 60 - 70 gadu.

Analizēja gan kopējās mizas, neatdalot iekšējo, ārējo mizu un koksnes atliekas, gan iekšējā un ārējā miza atsevišķi.

Latvijā augošu priežu (*Pinus sylvestris*) dažādas morfoloģiskās daļas:

1. Kodolkoksnes un aplievas koksnes paraugi iegūti no priedēm, kas augušas:
 - Mitrajos mežos Amatas novada, Zaubes pagastā damaksnī, (ievākti novembra beigās, ~ 60 gadus veci koki) un arī no Engures āreņa meža susinātā augsnē augušām priedēm (ievākti aprīļa beigās, ~ 90 gadus veci koki).
 - Sausajos mežos Smiltenes novadā, Variņu pagastā (ievākti decembra sākumā ~ 60 gadus veci koki).

Kodolkoksne un aplievas koksnes paraugi ievākti un analizēti atsevišķi katram priedes kokam un atkarībā no ievākšanas augstuma 0,5 m, 2,5 m un 4,0 m. Kopumā 60 dažādi paraugi.

2. Priedes fragments, kas sastāv no priedes stumbra ar mizu, zariem ar mizu un zaļeņa, ievākts Kalsnavas stādījumos, meža pētīšanas stacijas „Kalsnava” 224. kvartālā, augusi sausā mētrājā, ~ 40 gadus veci koki. Paraugšs tika sadalīts morfoloģiskajās daļās: kambijā, iekšējā un ārējā mizā, zaru koksne un mizā, kodolkoksne, aplievas koksne un skujās.
3. Atzarojumu vietu koksne ievākta Amatas meža, Zaubes pagasta mitrajos mežos, novembra beigās no ~ 60 gadus veciem kokiem un Smiltenes novada Variņu pagasta sausajos mežos augošiem priedes kokiem decembra sākumā.
4. Kodolkoksne ar atzarojumu vietu koksni (blakusprodukts pēc logu rāmju ražošanas) iegūts mehāniski kā dažāda izmēra klucīši, kuri pārsvarā sastāv no

kodolkoksnes un atzarojumu vietu koksnes, aptuvenā attiecība 20 : 1 līdz 15 : 1 (2. pielikums).

5. Priežu koksnes gadskārtu urbumi. Paraugi tika ievākti no trīsdesmit 50 - 60 gadus vecām priedēm Lubānas mitrajos mežos 0,5 m augstumā. Paraugi tika ievākti 2013. gada 6. - 7. aprīlī.

Pētījumiem ņēma divus paraugus. Vienu paraugu sadalīja kodolkoksne un aplievā, bet otru samala bez dalīšanas. Paraugus ņēma no 30 dažādiem kokiem, piecu metru attālumā citam no cita augošiem kokiem, kopumā izanalizēti 90 dažādi paraugi.

II. Augu biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusprodukti:

1. Skujkoku un lapkoku koksnes izdalīti *kraft* lignīni, kas tika iegūti no melnā atsārma pēc celulozes vārīšanas *Inventia AB*, izmantojot *LignoBoost* procesu. Saņemti no *Inventijas AB* (Zviedrija) (10. 2009. un 09. 2010)
2. Degvielas etanola ražošanas blakusprodukts. Iegūts pilotiekārtā (Ornskoldsvik, Zviedrija) pēc skujkoksnes fermentatīvās hidrolīzes, saņemts (03. 2009.)
3. No melnalkšņa (*Alnus glutinosa*) un oša (*Fraxinus excelsior*) ar sārnu izdalīti laboratorijas lignīni (2012. g.) iegūti LV KĶI.

2.2. Izmantotā aparatūra un reaģenti

Aparatūra:

- Analītiskie svāri - *KERN ALJ 220 - 4*, ($m_{\max} = 220 \pm 0,0001$ g);
- Automātiskā titrēšanas iekārta - *ABU 901* ar biretes tilpumu $20 \pm 0,1$ mL;
- Autoklāvs, ($t_{\max} = 350 \pm 2$ °C);
- *Ceizela* iekārta (laboratorijā konstruēta stikla iekārta);
- DFPH *On-line* testa hromatogrāfiskā iekārta *Agilent 1100 UV-DAD*;
- Mikroplašu lasītājs *BioTek*, Germany;
- Gāzes hromatogrāfs masspektrometrs - *Shimadzu GC-MS-QP2010*, pirolīzes sistēma *Frontier Lab (Py-2020 iD)* ar automātisko paraugu ievadīšanas ierīci (*AS-1020 E*);
- Gāzes hromatogrāfs *PerkinElmer Clarus 500* ar liesmas jonizācijas (FID) detektoru un kapilāro kolonnu *J&W HP- 1/SIMDIST* (5 m x 0,53 mm, 0,15 μm);
- Gāzes hromatogrāfs *PerkinElmer XL* ar liesmas jonizācijas (FID) detektoru un kapilāro kolonnu *J&W HP- 1/SIMDIST* (25 m x 0,53 mm, 0,15 μm) un ar fāzi *RTX-1701* (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm);
- Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas iekārta *ASE 350 Dionex coop.* ($p_{\max} = 110 \pm 1$ atm, $t_{\max} = 200 \pm 2$ °C);

- Pseido virstošā slāņa ekstraktors *IKA Werke*, ($t_{\max} = 350 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 0 - 1500 apg·min⁻¹);
- Šķidrums hromatogrāfs masspektrometrs (*UPLC/Synapt Q-TOF MS, Waters*,) ar elektronizsmidzināšanas (ESI) jonizācijas avotu;
- Mitruma analizators *KERN DBS*, ($m_{\max} = 60 \pm 0,001 \text{ g}$);
- Rotācijas ietvaicētājs *Heidolph Instruments* ($p_{\min} = \text{līdz } 10 \pm 1 \text{ mbar}$);
- Vakuumžāvskapis – *Vaciotempt - t*, ($p_{\min} = \text{līdz } 5 \pm 1 \text{ mbar}$, $t_{\max} = 100 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$);
- Liofilizācijas aparāts *Heto PowerDry PL3000* ($t_{\min} = -54 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $p_{\min} = \text{līdz } 1 \text{ mbar}$);
- Preparatīvais hromatogrāfs *Biotage SPI*;
- Nažu tipa smalcinātājs *Retch SM 100* ar nerūsējošā tērauda asmeņiem;
- Ložu dzirnavas *Retch MM 200* (0 - 30 Hz/s) ar nerūsējošā tērauda lodītēm;
- Centrifūga *MPW-251* (līdz 14000 apg·min⁻¹);
- Ultra skaņas vanna -*Cole Parmer 8891*, (100 W, 42 KHz $\pm 6 \%$);
- Infrasarkanais spektrometrs -*PerkinElmer ATR-FT-IR*, (4000 - 515 cm⁻¹, $d = 1 \text{ cm}^{-1}$);
- Presforma *PerkinElmer*, (diametrs 13 mm $p_{\max} = 15 \text{ t}\cdot\text{cm}^{-2}$);
- UV/VIS spektrometrs (*PerkinElmer Lambda 620 UV/VIS* ($\lambda = 190 - 900 \pm 0,0001 \text{ nm}$);
- Iekārta antioksidantās aktivitātes noteikšanai eļļu un tauku sistēmās ML OXIPRES (*Mikrolab Aarhus*) aparāts ar sešām mērīšanas šūnām, ($t_{\max} = 180 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $p_{\max} \text{ O}_2 = 15 \text{ atm}$);
- Termogravimetrijas iekārta *Mettler Toledo TGA/DTA 851*, ($t_{\max} = 1000 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$);
- Šķidrums hromatogrāfs (*HPLC*) *Agilent 1100* ar UV-DAD un RI un FLD detektoriem ar kolonnu *Zorbax Eclipse XDB-C18*, daļiņu izmērs (5 μm , 4,6 x 150 mm);
- Kalorimetrs *Setaram C80*, ($t_{\max} = 300 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

Reaģenti:

- 1-Butil-3-metilimidazolijs dimetilfosfāts [$\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}$]DMP, sintezēts;
- 1-Butil-3-metilimidazolijs p-toluēnsulfanāts [$\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}$]OTs, sintezēts;
- 1-Oktil-3-metilimidazolijs p-toluēnsulfanāts [$\text{C}_8\text{C}_{1\text{im}}$]OTs, sintezēts;
- 1-Dodecil-3-metilimidazolijs p-toluēnsulfanāts [$\text{C}_{12}\text{C}_{1\text{im}}$]OTs, sintezēts;
- 1-Butil-3-metilimidazolijs acetāts [$\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}$]OAc, sintezēts;
- 1-Butil-3-metilimidazolijs hlorīds [$\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}$]Cl, $\geq 98,0 \%$, CAS No: 79917-90-1;
- 1-Butil-3-metilimidazolijs bromīds [$\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}$]Br, $\geq 98,0 \%$, CAS No: 85100-77-2;
- 1-Metilimidazols *Sigma Aldrich*, $\geq 99,0 \%$, CAS No: 616-47-7;
- Acetonitrils *Sigma Aldrich*, $\geq 99,8 \%$ (LC-MS grade), CAS No: 75-05-8;
- 1-Butilimidazols *Sigma Aldrich*, $\geq 98,0 \%$, CAS No: 4316-42-1;
- Heksāns *Sigma Aldrich*, $\geq 97,0 \%$, CAS No: 2493-44-9;
- Etilacetāts *Sigma Aldrich*, $\geq 99,0 \%$, CAS No: 141-78-6;

- Etanols, $\geq 96,0$ %, CAS No:64-17-5;
- Metanols, *Sigma Aldrich*, $\geq 99,5$ %, CAS No: 67-56-1;
- Nātrija hidroksīds, *Sigma Aldrich*, $\geq 98,0$ %, CAS No: 1310-73-2;
- Sērskābe, *Sigma Aldrich* $\geq 95 - 97$ %, CAS No: 7664-93-9;
- Sālsskābe, *Sigma Aldrich*, ≥ 37 % CAS No: 7647-01-0;
- Dihlormetāns, *Lach-Ner*, $\geq 99,5$ %, CAS No:75-09-2;
- *n*-Propanols, *Sigma Aldrich*, $\geq 99,5$ %, CAS No: 71-23-8;
- Fosfora pentoksīds, *Lach-Ner* $\geq 98,0$ %, CAS No:1314-56-3;
- Kālija bromīds, *Sigma Aldrich* $\geq 99,9$ % (*FT-IR grade*), CAS No: 7758-02-3;
- Etiķskābes anhidrīds, *Lach-Ner* $\geq 99,5$ %, CAS No: 108-24-7;
- Kālija jodīds, *Sigma Aldrich* $\geq 99,0$ %, CAS No: 7681-11-0;
- Acetons, *Lach-Ner* $\geq 99,5$ %, CAS No: 8006-64-2;
- Slāpekļis, Airok 99,99 %, CAS No: 7727-37-9;
- Skudrskābe, *Sigma Aldrich* $\geq 99,0$ % (*LC-MS grade*), CAS No: 64-18-6;
- Piridīns, *Sigma Aldrich* $\geq 99,8$ %, CAS No: 110-86-1;
- Dimetilsulfoksīds, *Sigma Aldrich* $\geq 99,8$ %, CAS No: 67-68-5;
- ABTS 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskābes diamonija sāls, *Sigma Aldrich* $\geq 98,0$ %, CAS No: 30931-67-0;
- Kālija persulfāts, *Sigma Aldrich* $\geq 99,0$ %, CAS No: 7727-21-1;
- DFPH 2,2-difenil-1-pikrilhidrazils, *Sigma Aldrich* ≥ 95 %, CAS No: 1898-66-4;
- Fluoresceīns, *Sigma Aldrich* (priekš fluoriscences pētījumiem), CAS No: 2321-07;
- 2,2'-azobis(2-amidino-propān) dihidrohlorīds, *Sigma Aldrich* ≥ 97 %, CAS No: 2997-92-4
- Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksiskābe), *Fluka* ≥ 97 %, CAS No: 53188-07-1;
- TBHQ (*tert*-butilhidrohinons), *Sigma Aldrich* ≥ 97 %, CAS No: 1948-33-0;
- PEG-400 (polietilēnglikols ar $M_w = 400$ g·mol⁻¹), CAS No: 25322-68-3;
- Tetrahidrofurāns, *Acōrs organic* $\geq 99,5$ %, CAS No: 109-99-9;
- Folina-Čikolto reaģents, *Sigma Aldrich*, CAS No:26-45-36/37/39;
- Proantocianidīns B2, *EXTRASYNTHESE* ≥ 90 %, CAS No: 29106-49-8;

Substrāti lipīdu oksidēšanai:

- Rapšu eļļa (nerafinēta, bez antioksidantu piedevas);
- Majonēze ar un bez pārtikas konservantiem (Kedaine un KOK);

2.3. Paraugu pirms sagatavošana

Pētījumos izmantoja Latvijā iegūtos lignocelulozes saturošus augu mehāniskās pārstrādes blakusproduktus (baltalkšņa (*Alnus incana*), melnalkšņa (*Alnus glutinosa*) mizas un priežu (*Pinus sylvestris*) dažādas morfoloģiskās daļas, kā arī blakusproduktus pēc logu rāmju ražošanas), kurus pēc saņemšanas žāvēja istabas temperatūrā līdz gaiss sausam materiālam. Priedes koksnes sadalīšanu aplievas un kodolkoksnē veica manuāli ar cirvi un kaltu, tāpat koksnes paraugu attīrīšanu no ieaugušajiem zariem atdalīja manuāli. Paraugus samala ar nažu tipa smalcinātāju un sijāja caur sietiem ar izmēriem 0,5 līdz 2 mm. Pēc sasmalcināšanas paraugus ievietoja saldētavā -25 °C temperatūrā tālākai uzglabāšanai, vidējais paraugu mitrums ~ 8 % ± 1%.

2.3.1. Sārma lignīna izdalīšana no melnalkšņa un oša koksnes

Melnalkšņa un oša koksnes skaidas ekstrahēja ar acetonu, lai izdalītu ekstraktvielas no koksnes skaidām saskaņā ar TAPPI standartu T280 pm-99. 100 g koksnes skaidas kopā ar 5 % NaOH šķīduma attiecībā (paraugs : 5% NaOH šķīdums = 1 : 7) vārīja autoklāvā 160 °C temperatūrā 3 stundas. Iegūto masu nofiltrēja un filtrātu paskābināja ar koncentrētu sērskābi līdz pH=2, izkrita lignīna saturošs preparāts, to nofiltrēja un mazgāja ar karstu ūdeni līdz neitrālai videi. Iegūto lignīnu saturošo preparātu žāvēja vakuumbāzē 40 °C temperatūrā P₂O₅ klātienē.

2.4. Jonu šķidrumu sintēze

Jonu šķidrumu sintēzes atbilstoši darba vajadzībām sintezētas sadarbībā ar LU Ķīmijas fakultātes Organiskās ķīmijas katedru. Darbā izmantotie uz imidazola pamata bāzēti jonu šķidrumi parādīti 2.1. tabulā.

2.1. tabula

Darbā izmantotie jonu šķidrumi

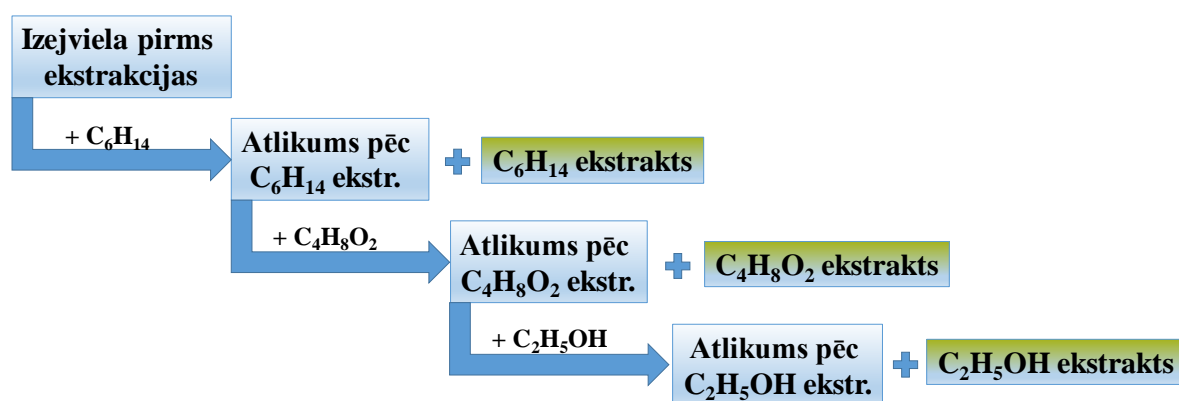
Nr.	JŠ nosaukums	Apzīmējums
1.	1-Butil-3-metilimidazolijs hlorīds	[C ₄ C ₁ im]Cl
2.	1-Butil-3-metilimidazolijs dimetilfosfāts	[C ₄ C ₁ im]DMP
3.	1-Oktil-3-metilimidazolijs dimetilfosfāts	[C ₈ C ₁ im]DMP
4.	1-Butil-3-metilimidazolijs tozilāts	[C ₄ C ₁ im]OTs
5.	1-Oktil-3-metilimidazolijs tozilāts	[C ₈ C ₁ im]OTs
6.	1-Dodecil-3-metilimidazolijs tozilāts	[C ₁₂ C ₁ mim]OTs
7.	1-Butil-3-metilimidazolijs acetāts	[C ₄ C ₁ im]OAc
8.	1-Oktil-3-metilimidazolijs tozilāts	[C ₈ C ₁ im]OAc

2.5. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas pārstrādes blakusproduktiem

Lai izdalītu zemmolekulāros polifenolus (diarilheptanoīdi, stilbēni u.c.) un lielmolekulāros polifenolu savienojumus (proantocianidīni, lignīni), un veiktu lignocelulozes saturošu paraugu frakcionēšanu, izmantoja un savā starpā salīdzināja klasiskās ekstrakcijas metodes (Soksleta ekstrakcija, CŠE, macerācija) un modernās ekstrakcijas metodes (ASE, superkritiskā- CO_2 , ekstrakcija ar jonu šķīdriem, ME u.c.)

2.5.1. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar Soksleta ekstrakciju

Izmantoja Soksleta ekstrakciju ar dažādiem šķīdinātājiem to polaritātes pieaugšanas kārtībā (Heksāns (C_6H_{14}) - etilacetāts ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) - 96 % etanols ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)) pēc 2.2. attēlā redzamās shēmas ieguva diarilheptanoīdu un proantocianidīnu saturošus ekstraktus no baltalkšņa (*Alnus incana*) un melnalkšņa (*Alnus glutinosa*) mizām, stilbenoīdus un lignānus no priežu koksnes (*Pinus sylvestris*) dažādām morfoloģiskām daļām.



2.2. att. Polifenolu izdalīšana no augu biomasas izmantojot secīgu Soksleta ekstrakciju ar dažādas polaritātes šķīdinātājiem

Paraugus izņēma no saldētavas un ļāva sasilt līdz apkārtējās vides temperatūrai (pirms svēršanas noteica relatīvo mitruma W_r , lai varētu pārrēķināt uz absolūti sausa parauga masu), nosvēra ~ 20 g ar precizitāti līdz 0,1 mg ekstrahējamā materiāla un pārnesa celulozes patronā, kuru ievietoja Soksleta iekārtā. Kolbā ielēja 150 mL attiecīgā šķīdinātāja un savietoja ar Soksleta iekārtu, pievienoja atces dzesinātāju un karsēja (karsēšanas temperatūra atkarīga no izmantotā šķīdinātāja (heksāns $t_{\text{virš.}} = 69$ °C, etilacetāts $t_{\text{virš.}} = 77,1$ °C, etanols $t_{\text{virš.}} = 78,4$ °C). Katram šķīdinātājam veica no 1 līdz 8 stundu ilgas ekstrakcijas piemērotākā ekstraktvielu ieguves režīma noteikšanai.

Attiecīgā organiskā šķīdinātāja ekstraktu atdestilēja rotācijas ietvaicētājā. Heksāna ekstraktu atdestilēja un žāvēja līdz konstantai masai un tā saturu noteica gravimetriski. Baltalkšņa un

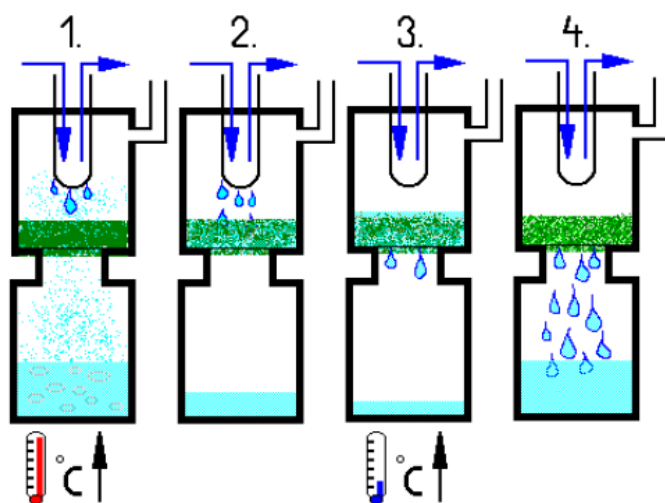
melnalkšņa mizas etilacetāta ekstraktus atdestilēja pilnībā un pievienoja 80 mL 40 % etanola ūdens maisījumu, lai iegūtu diarilheptanoīdu saturošu ekstraktu. Nešķīstošo daļu pēc apstrādes ar 40 % etanola ūdens maisījumu nofiltrēja, izmantojot celulozes filtru. No filtrāta atdestilēja etanolu un atlikušo ekstraktu ūdenī liofilizēja sausa ekstrakta iegūšanai. Liofilizācijas saldēšanas iekārtā ieregulēja sekojošus parametrus: vannas temperatūra -35 °C, liofilizēšanas kameras temperatūra -54 °C un vakuums 1 - 2 mbar. 96 % etanola ekstraktam pievienojot dejonizētu ūdeni, nodedilēja etanolu un liofilizēja sausa proantocianidīnu saturošu ekstraktu iegūšanai. Katru ekstrakciju veica trīs reizes un iegūtos rezultātus apstrādāja ar datu apstrādes programmu SPSS 17.

2.5.2. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar cietvielas-šķidrums ekstrakciju

Izmantoja cietvielas-šķidrums ekstrakciju pēc 2.2. attēlā attēlotās shēmas, papildus variējot ar etanola : ūdens maisījumiem dažādās attiecībās polāro ekstraktvielu ieguvei, izdalīja diarilheptanoīdu un proantocianidīnu saturošus ekstraktus no baltalkšņa un melnalkšņa mizām, stilbenoīdus un lignānus no priežu koksnes dažādām morfoloģiskām daļām dažādos augstumos no augsnes virskārtas. Noteica mitruma saturu pētāmajiem paraugam tālākiem aprēķiniem. Augu biomasas paraugu nosvēra uz analītiskiem svariem ~ 20 g iebēra apaļkolbā un pievienoja 120 mL attiecīgā šķīdinātāja. Kolbu ievietoja glicerīna vannā, lai efektīvāk notiktu sildīšana un sildīja dažādās temperatūrās (atkarīgs no šķīdinātāja viršanas temperatūras) dažādus laika intervālus (piemērotākā režīma noteikšanai). Pēc sildīšanas kolbu nedaudz atdzesēja un filtrēja caur stikla filtru ar poru izmēru 16 - 40 μm, lai izvairītos no mazu ekstrahējamo biomasas daļiņu nonākšanu filtrātā. Pēc filtrēšanas atkārtoti pievienoja jaunu šķīdinātāja porciju, bet jau mazāku tilpumu 80 mL (tas izskaidrojams ar to, ka pirmajā apstrādes reizē augu biomasa uzsūca sevī šķīdinātāju (uzbrieda) un katrā nākamajā apstrādes reizē vairs nebija nepieciešams tik liels šķīdinātāja daudzums). Pēc trešās ekstrakcijas, kad šķīdinātājs vairs neuzrādīja intensīvu krāsojumu ekstrahēja vēl ceturto reizi pilnīgai ekstraktvielu izdalīšanai, pēc tam iegūto šķīdumu destilēja un liofilizēja sausa parauga iegūšanai. Katru ekstrakciju veica trīs reizes un iegūtos rezultātus apstrādāja ar datu apstrādes programmu SPSS 17.

2.5.3. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar virstošā slāņa ekstrakciju

Virstošā slāņa ekstrakciju var arī dēvēt par automatizētu un uzlabotu Soksleta ekstrakciju, kur šķīdinātājs saskaras ar ekstrahējamo materiālu šķīdinātāja viršanas temperatūrā kā parādīts 2.3. attēlā. Salīdzinot ar Soksleta ekstrakcijas principu, kur šķīdinātājs saskaras ar ekstrahējamo materiālu jau zem šķīdinātāja viršanas temperatūras.



2.3. att. Virstošā slāņa ekstrakcijas pamatprincipiālā shēma

Pētāmos paraugus ekstrahēja pēc 2.2. attēlā esošās shēmas. Nosvēra ~ 5 g parauga uz analītiskiem svāriem un uznesa uz ekstraktora filtra ar poru izmēru 10 - 20 μm. Ekstrakciju veica automātiskā režīmā pēc iepriekš sastādītas programmas sastādītiem parametriem, ņemot vērā šķīdinātāja viršanas temperatūru. Cikla izturēšana laiks variēja no 5 līdz 25 minūtēm. Ekstrakciju veica 4 - 8 ciklu režīmā katram šķīdinātājam. Iegūtos ekstraktus liofilizēja, sausa ekstrakta iegūšanai. Katru ekstrakciju veica trīs reizes un iegūtos rezultātus apstrādāja ar datu apstrādes programmu SPSS 17.

2.5.4. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar paātrinātā šķīdinātāja ekstrakciju

Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas šūnā (1.16. attēlā) ievietoja celulozes filtru (ja izmanto organiskos šķīdinātājus), vai stikla filtru - ja kādā no ekstrakcijas stadijām kā šķīdinātājs tika izmantots ūdens vai tā saturošs maisījums. Uz analītiskiem svāriem nosvēra tukšu ekstrakcijas šūnu, piefiksējot rezultātu, un to piepildīja to ar ekstrahējamo materiālu, nosverot atkārtoti precīzas masas aprēķināšanai. Šūnas vītnes rūpīgi notīrīja, lai tās aizverot būtu pilnīgi atbrīvotas no analīta materiāla. Šūnu ievietoja paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas autosamplerā un, pēc iepriekš sastādītas programmas, veica ekstrakciju pēc 2.2. attēlā redzamās shēmas ar organiskajiem šķīdinātājiem un, variējot ar etanola : ūdens maisījumu attiecībām. Ekstrakciju veica 105 atm spiedienā N₂ atmosfērā, mainot ekstrakcijas temperatūru par 10 °C diapazonā no 80 līdz 140 °C. Ekstrakcijas statiskos ciklus veica katram šķīdinātājam no 1 līdz 5 ar dažādiem ekstrakcijas laikiem (5; 10 un 15 minūtes). Apstrādājot ekstraktus pēc 2.5.1. apakšnodaļā aprakstītās apstrādes metodes, ieguva ekstraktus sausā veidā. Katru ekstrakciju veica trīs reizes un iegūtos optimizācijas rezultātus apstrādāja ar datu apstrādes programmu SPSS 17.

2.5.5. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar superkritisko CO₂ ekstrakciju

Atbilstoši izvirzītajiem uzdevumiem, baltalkšņa un melnalkšņa mizas ekstraktvielu izdalīšanu veica ar superkritisko CO₂ ekstrakciju. Uz analītiskiem svāriem nosvēra ~ 20 g mizas tā, lai ekstrakcijas šūna būtu praktiski pilna. Šūnu ievietoja krāsni un veica ekstrakciju 30 min. Spiediens šūnā bija 300 atm, temperatūra 60 °C ar CO₂ plūsmu 48 g·min⁻¹. Pēc ekstrakcijas 5 minūšu laikā pievienoja 25 mL C₂H₅OH un ekstrahēja 30 minūtes. Rezultātā ieguva trīs frakcijas: nepolāra, salīdzinoši polāra, kura iegūta modificējot CO₂ ar etanolu, kā arī atlieku frakcija, kuru ieguva, veicot sistēmas skalošanu ar CO₂ pēc secīgas ekstrakcijas. No baltalkšņa mizas ieguva lielāku ekstraktvielu iznākumu, salīdzinājumā ar melnalkšņa mizu. Ekstrakcijas veica trīs reizes un iegūtos rezultātus apstrādāja ar datu apstrādes programmu SPSS 17.

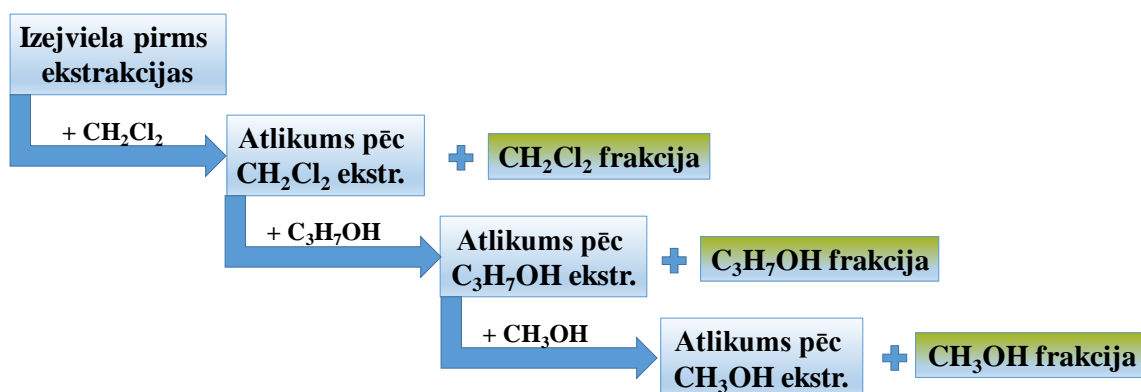
2.5.6. Polifenolu savienojumu izdalīšana no biomasas ar macerāciju

Iepriekš sagatavotu, 10 g biomasas parauga nosvēra uz analītiskiem svāriem un iebēra koniskajā kolbā. Pievienoja 100 mL šķīdinātāja un atstāja istabas temperatūrā 24 stundas, pēc tam nofiltrēja caur stikla filtru ar poru izmēru 16 - 40 μm. Biomasas paraugu atkal aplēja ar jaunu šķīdinātāja porciju un atstāja vēl uz 24 stundām. Procedūru atkārtoja trīs reizes. Iegūtos ekstraktus nodestilēja un liofilizēja sausa ekstrakta iegūšanai. Katru ekstrakciju veica trīs reizes un iegūtos rezultātus apstrādāja ar datu apstrādes programmu SPSS 17.

2.6. Augu biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu secīga ekstrakcija ar organiskajiem šķīdinātājiem, izmantojot ekstrakciju ultraskaņā

No melnalkšņa un oša koksnes ar sārnu izdalītos laboratorijas lignīnus, skujkoku un lapkoku koksnes izdalītos *kraft* lignīnus, kas tika iegūti no melnā atsārma pēc celulozes vārīšanas *Inventia AB*, izmantojot *LignoBoost* procesu fracionēja pēc 2.4. attēlā redzamās shēmas ar organiskajiem šķīdinātājiem polaritātes pieaugšanas secībā, lai samazinātu parauga heterogenitāti, atdalītu šķīstošās frakcijas no nešķīstošajām attiecīgajos šķīdinātājos.

Lignīna paraugus fracionēja istabas temperatūrā ultraskaņas vannā, lai paātrinātu šķīdinātāja piekļuvi lignīna daļiņām un paātrinātu šķīstošās daļas šķīdību.



2.4. att. Lignīnu secīgas frakcionēšanas shēma ar organiskajiem šķīdinātājiem, izmantojot ekstrakciju ultraskaņā

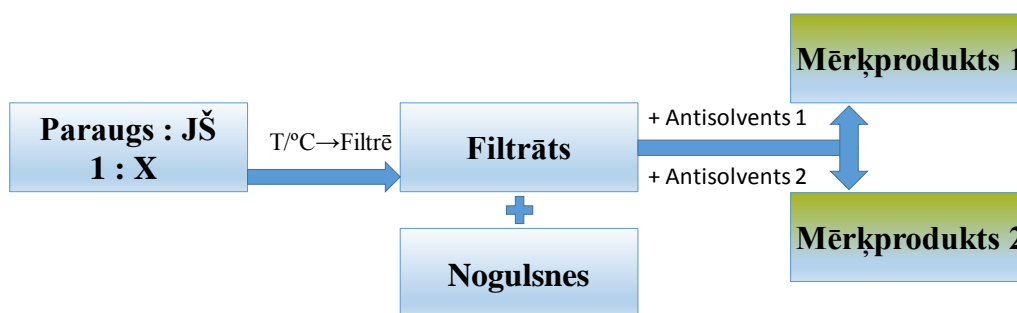
Uz analītiskiem svāriem nosvēra 10 gramus lignīna, pārrēķinot uz a.s. (absolūti sausu) masu ievietoja 250 mL vārglāzē un pievienoja 40 mL dihlorometāna (CH_2Cl_2). Lignīnam ļāva uzbriest (apmēram 1 stundu), tad maisījumu 15 minūtes ievietoja ultraskaņas vannā. Paraugu filtrēja caur stikla filtru (kas iepriekš tika izžāvēts un nosvērts) ar poru izmēru 16 - 40 μm un ekstraktu savāca apaļkolbā. Nogulsnes atkārtoti apstrādāja ar 40 mL dihlorometāna, nofiltrēja un ekstraktus pēc katras apstrādes ar jaunu šķīdinātāja porciju apvienoja. Procedūru atkārtoja 4 līdz 5 reizes, līdz ieguva praktiski bezkrāsainu ekstraktu, tad uzskatīja, ka visa dotajā šķīdinātājā šķīstošās frakcijas daļa tika atdalīta. Iegūtās nogulsnes žāvēja vakuumžāvēskapī parafīna (sorbents organisku šķīdinātājiem) un aktivētās ogles klātienē līdz konstantai masai. Pēc ekstrakcijas ar CH_2Cl_2 turpināja ekstrakciju ar nākošo šķīdinātāju - propanolu tieši tāpat, kā tas ir aprakstīts ar dihlorometānu. Pēc otrās ekstrakcijas palikušās nogulsnes ekstrahēja ar metanolu tāpat kā aprakstīts iepriekš ar dihlorometānu [186].

Pēc katras ekstrakcijas iegūtos apvienotus ekstraktus iztvaicēja, izmantojot rotācijas ietvaicētāju, tad žāvēja vakuumžāvēskapī līdz konstantai masai. Tāda veidā ieguva trīs dažādas lignīna ķīmiskās frakcijas: ĶF-1 (CH_2Cl_2 frakcija), ĶF-2 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ frakcija), ĶF-3 (CH_3OH frakcija), ĶF-4 (atlikumu frakcija). Katram paraugam tika veikti 3 paralēli frakcionēšanas eksperimenti, dati apstrādāti statistikas apstrādes programmā SPSS 17.

2.7. Augu biomasas pārstrādes blakusproduktu ekstrakcija ar jonu šķīdriem

Atbilstoši promocijas darba plānam, veica perspektīva atjaunojamā resursa - lignocelulozes biomasas (mežu apsaimniekošanas biomasas atlikumi Latvijā augošo lapukoku mizas, hidrolīzes lignīni, kā arī skuju un lapu koksnes tehniskie lignīni) frakcionēšanu ar dažāda veida jonu šķīdriem (JŠ) pēc 2.5. attēlā redzamās shēmas. Lignīnu bagātu lignocelulozes biorafinēšanas blakusproduktu šķīšanas procesus dažādos JŠ raksturoja, mainot biorafinēšanas blakusproduktu un JŠ masas attiecības, temperatūru un ekstrakcijas laiku. Frakcionējot ieguva

dažādas JŠ šķīstošās un nešķīstošās frakcijas. Izvēlētos jonu šķīdumus un biomasas pārstrādes blakusproduktus pirms ekstrakcijas žāvēja vakuumžāvskapī P₂O₅ klātienē, lai maksimāli atbrīvotos no H₂O tajos. Izvēlēto biomasas pārstrādes blakusproduktu nosvēra uz analītiskiem svariem ~ 1 g ievietoja 50 mL kolbiņā un pievienoja jonu šķīdumu dažādās attiecībās un ekstrahēja no 1 līdz 24 stundām dažādās temperatūrās, skatīt 2.2. tabulu. Ekstrakcijas veica N₂ atmosfērā.



2.5. att. Augu biomasas pārstrādes blakusproduktu ekstrakcijas shēma ar jonu šķīdumiem

2.2. tabula

Maināmie parametri augu biomasas pārstrādes blakusproduktu ekstrakcijās ar jonu šķīdumiem

Jonu šķīdums	Attiecība (Paraugs : JŠ)	Laiks, h	Temperatūra, °C
[C ₄ C ₁ im]Cl; [C ₄ C ₁ im]OTs;	1 : 5; 1 : 10; 1 : 15;	2; 4; 6; 8;	80; 90; 100; 110;
[C ₄ C ₁ im]DMP; [C ₄ C ₁ im]OAc;		10; 12; 14;	120; 130; 140;
[C ₈ C ₁ im]DMP; [C ₄ C ₁ im]OTs	1 : 20	24	150; 160

Pēc ekstrakcijas nešķīstošo daļu attiecīgajā JŠ filtrēja caur stikla filtru ar poru izmēriem 16 - 40 µm paaugstinātā temperatūrā. Pēc filtrēšanas nogulsnes mazgāja ar karstu ūdeni izmantojot ultraskaņu, lai efektīvāk atbrīvotos no jonu šķīduma atlikumiem, kas apgrūtinātu tālāko datu interpretāciju. Iegūto filtrātu apstrādāja ar “antisolventu” 1 (acetons : ūdens attiecībā 1 : 1) kā rezultātā izkrita sīkdispersas nogulsnes, kuras tālāk centrifugēja ar ātrumu 5500 apg·min⁻¹ 20 minūtes. Iegūtās nogulsnes mazgāja un centrifugēja 5 reizes, katru reizi pievienoja 15 mL attiecīgā “antisolventa”. Izkritušo nogulšņu mazgāšanai izmantoja ultraskaņu, savukārt centrifugātu ietvaicēja ar rotācijas ietvaicētāju, atbrīvojoties no “antisolventa” 1 un reģenerējot acetonu no tā. Pāri palikušo JŠ ar izšķīdušo biomasu apstrādāja ar “antisolventu” 2 (H₂O; pH = 2,5), kā rezultātā izkritušās nogulsnes apstrādāja pēc tās pašas shēmas kā apstrādes pēc “antisolventa” 1. Katram paraugam tika veikti 3 paralēli frakcionēšanas eksperimenti, dati apstrādāti statistikas apstrādes programmā SPSS 17.

2.8. Iegūto polifenolu savienojumu sastāva un struktūras pētījumi

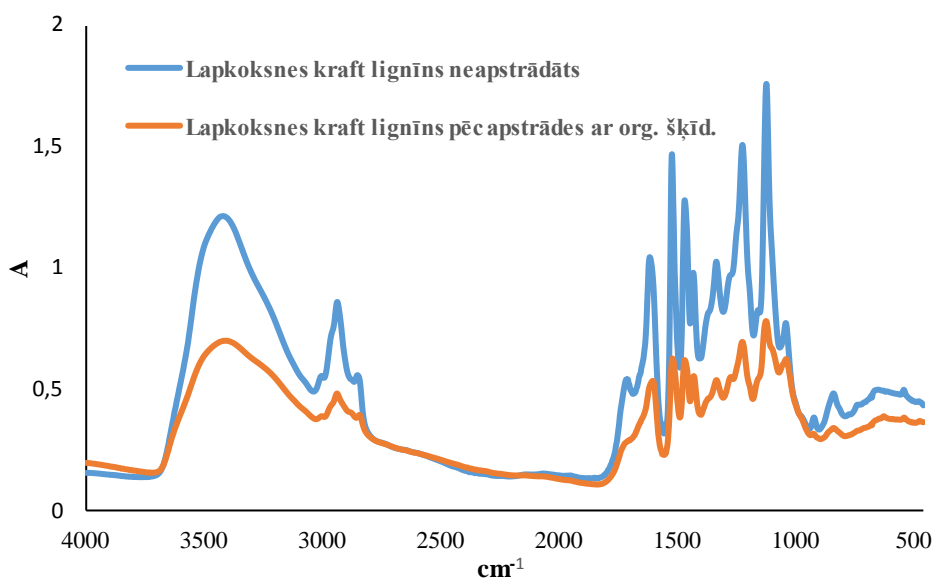
Iegūto polifenolu savienojumu sastāva (noteikšanai) identificēšanai un kvantificēšanai izmantoja dažādas instrumentālās un klasiskās analīzes metodes, lai raksturotu sastāvu un struktūru (Folina-Čikolto metodi, Py-GC/MS/FID, FTIR, LC-MS/MS, NMR), funkcionālās grupas (-OCH₃, -OH_{fen}, -COOH), molekulāro masas sadalījumu (GPC), fizikāli-ķīmiskās īpašības (DSK, TGA), kā arī raksturota sastāva/struktūras atkarība no ieguves metodes un apstākļiem. Papildus imersijas kalorimetriju lietoja biomasas siltumefektu pētījumiem mijiedarbībā ar JŠ.

Visus pētāmos paraugus pirms analīzēm homogenizēja un žāvēja vakuumā 40 °C temperatūrā P₂O₅ klātienē, līdz mitruma saturs paraugā bija < 1 %. Paraugiem noteica pelnu saturu un visus analīžu rezultātu aprēķināšanai izmantoja paraugu masu bez minerālvielām.

2.8.1. Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija

FTIR spektrus, ar izšķiršanu 4 cm⁻¹, ieguva izmantojot FTIR iekārtu ATR režīmā (dimanta kadmija selenīda prizma). Katra parauga uzņemšanai izmantoja trīsdesmit divas skenēšanas reizes apgabalā no 515 cm⁻¹ - 4000 cm⁻¹ ar fona korekciju.

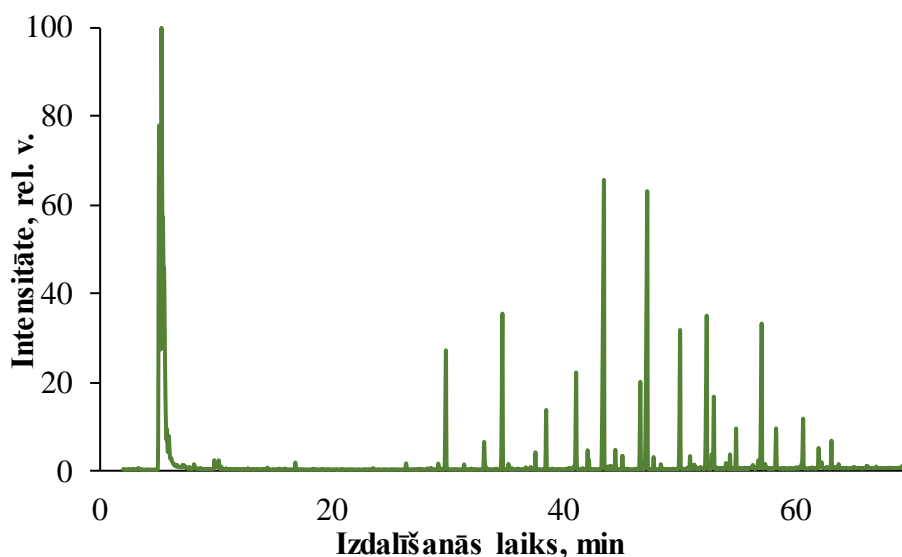
Spektru uzņemšanai caurejošās gaismas režīmā, KBr tehnikā, uz analītiskiem svāriem nosvēra 1 - 1,5 mg sausa analizējamā parauga, pārnesa pietā, pievienoja 200 mg KBr (iepriekš izžāvēts) un homogenizējot maisīja. Kad ieguva viendabīgu KBr un parauga maisījumu to ievietoja presformā un presēja ar hidraulisko presi līdz spiediens sasniedza 10 t·cm⁻². Gadījumos, kad nevarēja izmantot KBr metodi (lignīna kinētiskiem pētījumiem atkarībā no laika, lignīna šķīšanas procesa monitoringam), izmantoja pavājinātās pilnās iekšējās atstarošanas (ATR - FTIR) infrasarkanā spektroskopijas metodi. Spektru ieguvei un apstrādei tika izmantota datorprogramma *Spectrum v5.0.1* iegūto spektru piemērs dots 2.6. attēlā.



2.6. att. Lapkoksnes kraft *LignoBoost* procesā iegūtā lignīna un pēc apstrādes ar organiskiem šķīdinātājiem FTIR spektri

2.8.2. Analītiskā pirolīze

Uz analītiskiem svāriem nosvēra ~ 2,5 mg iepriekš izžāvēta parauga un to pārnesa tērauda tīģelī un ievietoja pirolīzes sistēmas automātiskajā paraugu ievadīšanas ierīcē. Pirolīzes procesu veica 500 °C temperatūrā 15 sekundes. Pēc pirolīzes, caur gāzes hromatogrāfa injektoru, gāzveida sadalīšanās produkti nonāca kapilāra tipa kolonnā. Iekārta ir modificēta ar nesējgāzes plūsmas dalītāju *Silica Outlet Splitter VSOS* (*SGE, Ringwood, Victoria, Australia*), lai vienlaicīgi darbotos ar FID un MS detektoriem. Produktu identifikācijai izmantoja MS detektoru, to relatīvā satura noteikšanai izmantoja liesmas jonizācijas detektoru FID. Gāzes hromatogrāfā kā nesējgāzi izmantoja hēliju. Iegūto pirogrammu piemērs redzams 2.7. attēlā (kur parādīts lignīna degradācijas produktu saturs iegūts summējot visu lignīna degradācijas produktu smaīļu laukumus un, attiecinot iegūto summu pret visu pirogrammā esošo smaīļu laukumu summu) pirolīzes produktos. Lignīna pirolīzes produktu relatīvais saturs ir tieši proporcionāls lignīna saturam. Masas spektru uzņemšanai izmantoja elektrona triecienu jonizāciju (70 eV) un kvadrāpola masas analizatoru ar skenēšanas apgabalu no 15,00 līdz 350,00 m/z. Savienojumu identifikācijai izmantoja *Shimadzu Corporation Lab Solution* datu bāzi (*GC-MSsolution Version 2.40*). Viena parauga analīzi atkārtoja 3 - 5 reizes, un datu apstrādei tika izmantota statistikas programma SPSS 17.



2.7. att. Skujkoksnes kraft *LignoBoost* izejas lignīns nefrakcionēta parauga analītiskās pirolīzes hromatogramma

2.8.3. Metoksilgrupu saturs noteikšana

Analīzei izmantoja *Ceizela-Fibeka-Švappaha* metodi, kas ir modificēta KĶI Lignīna ķīmijas laboratorijā [187]. Metodes būtība: apstrādājot organisko savienojumu, kas satur metoksilgrupas, notiek kvantitatīva reakcija pēc vienādojuma 2.1.



Izveidojušos metiljodīdu kā viegli gaistošu savienojumu kvantitatīvi pārdestilē, uztverot nātrija acetāta un ledus etiķskābes maisījumā, kurš satur bromu. Broms kvantitatīvi reaģē ar metiljodīdu pēc vienādojuma 2.2.



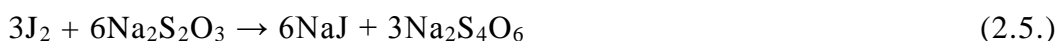
Vienlaicīgi broms pārākums oksidē joda bromīdu pēc vienādojuma 2.3.



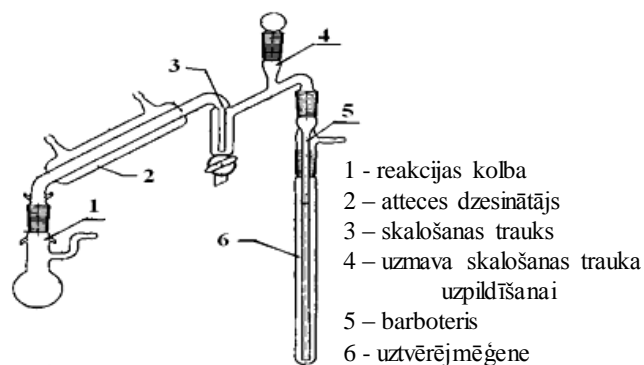
Šim šķīdumam pievienojot kālija jodīda un sērskābes pārākumu, izdalās brīvs jods, saskaņā ar vienādojumu 2.4.



Izdalījušais joda daudzums ir ekvivalents metoksilgrupu saturam ņemtajā iesvarā, un to nosaka, titrējot ar nātrija tiosulfātu pēc vienādojuma 2.5.



Analīzi veica 2.8. attēlā redzamajā iekārtā.



2.8. att. Iekārta metoksilgrupu noteikšanai

Uz analītiskiem svāriem nosvēra ~ 40 mg analizējamā parauga un pārnesa reakcijas kolbiņā un pievienoja ~ 0,5 g fenola, 6 pilienus etiķskābes anhidrīda un 3 mL 57 % jodūdeņražskābes šķīduma. Skalotni līdz pusei piepildīja ar sarkanā fosfora suspensiju ūdenī. Uztvērējmgēnē caur piltuvīti ielēja 15 mL broma šķīduma, ievietoja barbotieri un pievienoja aparātam. Uztvērējmgēni caur novadu savienoja ar skalotni, kurā bija 10 % HCOOH šķīdums. Reakcijas kolbiņu savienoja ar N₂ balonu un izturēja 30 minūtes termoregulējamā vannā 140 °C temperatūrā, vienlaicīgi sekojot vienmērīgai N₂ plūsmi.

Uztvērējšķīdumu kvantitatīvi ieskaloja 250 mL Erlenmeijera kolbā ar pieslīpētu aizbāzni, kurā iepriekš bija ielieti 25 mL 20 % CH₃COONa. Enerģiski saskalojot, sarkanbrūnajam šķīdumam no biretes pievienoja 4 % HCOOH, uzreiz 4 mL, pēc tam pa pilienam, līdz šķīdums atkrāsojās. Pēc tam piepilināja 2 pilienus metilsarkanā šķīduma un novēroja krāsa izmaiņu. Kad viss broma pārākums bija sadalīts, kolbā pievienoja 20 mL 10 % H₂SO₄ un 5 mL 10 % KI, kolbu noslēdza ar aizbāzni un atstāja stāvēt 5 minūtes. Izdalīto jodu titrēja ar 0,05 M Na₂S₂O₃ līdz gaiši oranžai nokrāsai, tad pielika 2 mL cietes šķīduma un, intensīvi skalojot, pabeidza titrēšanu.

Metoksilgrupu saturu aprēķināja pēc 2.6. vienādojuma. Katru analīzi atkārtoja 3 reizes un iegūtos datus apstrādāja statistikas programmā SPSS 17.

$$W(\text{OCH}_3) = \frac{v \times f \times 0,5172}{G_w \left(1 - \frac{W_r}{100}\right)} \times 100\% \quad ; \text{ kur} \quad (2.6.)$$

W(OCH₃) - metoksilgrupu saturs, %;

V - titrēšanā patērētais 0,05 M Na₂S₂O₃ tilpums, mL;

f - 0,05 M Na₂S₂O₃ koncentrācijas korekcijas faktors;

0,5172 - OCH₃ masa, kas atbilst 1 mL 0,05 M Na₂S₂O₃, mg;

G_w - sauss analizējamais iesvars (mitrums < 1%), mg;

W_r - parauga relatīvais mitrums, %.

2.8.4. Hidroksilgrupu noteikšana

-OH_{fen.} un -OH_{COOH} noteikšanai izmantoja konduktometrisko titrēšanu. Lignīnā esošo funkcionālo grupu (skābo -OH_{COOH} un fenola -OH_{fen.}) kvantitatīvai analīzei bieži izmanto "skābes - bāzes" konduktometriskās titrēšanas metodi. Ievadot titrējamā vidē sārmu (tiešā titrēšana), skābo grupu jonizācijas pakāpe pieaug, un līdz ar to sistēmā pieaug summārā elektrovadītspēja. Šādu sistēmu, titrējot ar skābi, notiek pretējais (apgriezta titrēšana), un, atbilstoši skābumam, titrējas vispirms vājākās skābās -OH_{fen.}, pēc tam skābākās -OH_{COOH} grupas. 50 mg lignīna preparāta iesvēra pudelītē (10 mL), kurā bija iepildīts slāpekļis, un aplēja ar 5 mL 0,1 M nātrija hidroksīda šķīduma. Pēc 24 stundām pudelītes saturu kvantitatīvi ar destilētu ūdeni ieskaļoja titrējamā glāzītē, ievietoja tajā konduktometrisko šūnu (elektroodus) un titrēja ar 0,1 M HCl šķīdumu līdz ~ 6 mL tilpumam. Titrēšanu vadīja un fiksēja datorizētā režīmā. Aprēķina pēc (2.7.) un (2.8.) formulām.

$$OH_{COOH} = \frac{a \times 1,7}{m} \times 100 \% \quad (2.7.)$$

$$OH_{fen} = \frac{b \times 1,7}{m} \times 100 \% \quad ; \text{ kur} \quad (2.8.)$$

OH_{COOH} - karboksigrupu saturs paraugā, %;

OH_{fen.} - fenola hidroksilgrupu saturs paraugā, %;

a,b - patērētais titranta tilpums, mL;

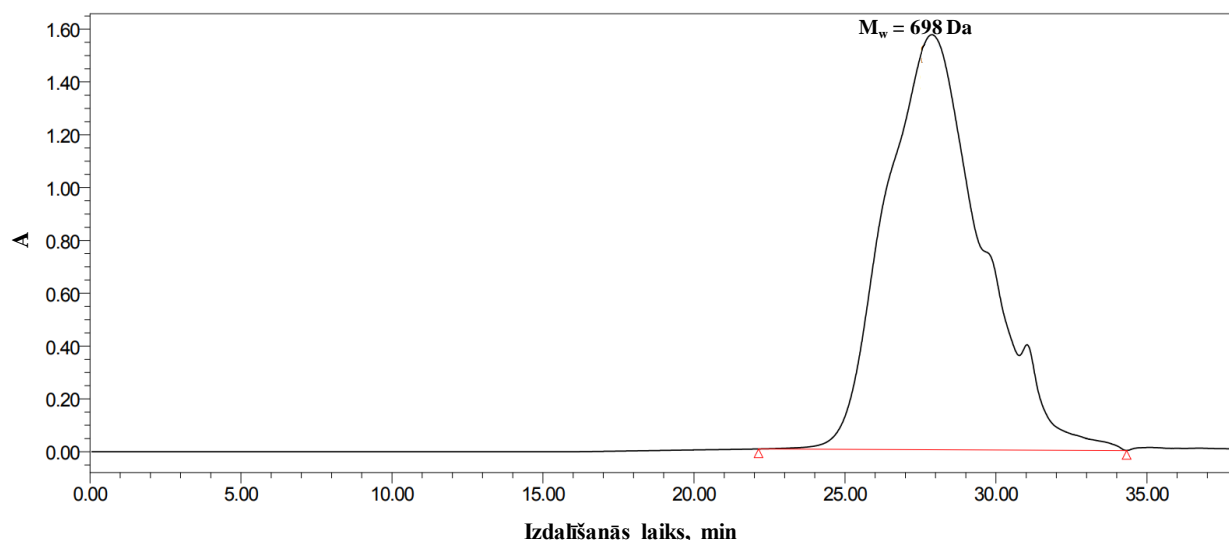
m - sausa iesvara masa (mitrums < 1%), mg;

1,7 - hidroksilgrupu masa, kas atbilst 1 mL 0,1 M sālsskābes HCl šķīdumam, mg.

Katru analīzi atkārtoja 3 reizes un iegūtos datus apstrādāja statistikas programmā SPSS 17.

2.8.5. Molekulmasas noteikšana

Ņemot vērā paraugu heterogenitāti un atšķirīgo šķīdību dažādos šķīdinātajos molekulmasas noteikšanai izmantoja divas gelfiltrācijas hromatogrāfijas metodes. Gelfiltrācijas hromatogrāfijas gadījumā, kur kā eluentu izmantoja DMSO, paraugus gatavoja, izšķīdinot tos DMSO ar koncentrāciju 1 mg·mL⁻¹ un kratīja iekārtā 24 stundas. Pēc tam paraugus filtrēja caur 0,2 μm poru izmēra filtriem. Iegūto filtrātu ievietoja šķīduma hromatogrāfa autosamplerā. Hromatogrāfiju veica 60 °C temperatūrā, eluents - DMSO un detektēja pie diviem viļņu garumiem: λ = 254 un 280 nm. Molekulmasas kalibrēšanu veica, izmantojot polistirola standartus ar zināmām molekulmasām no 480 līdz 176000 Da. Molekulmasas novērtēšanai par pamatu izmantoja izdalīšanās laikus - pirmie no kolonnas izdalās lielmolekulārie savienojumi, pēdējie - frakcijas ar mazu molekulmasu. Iegūto hromatogrammu piemērs ir attēlots 2.9. attēlā.



2.9. att. Skujkoksnes kraft *LignoBoost* lignīna ĶF-2 gelfiltrācijas hromatogramma, $\lambda=280$ nm

Gelfiltrācijas hromatogrāfijas gadījumā, kur kā eluents tika izmantots THF paraugus, kuri šķīda THF izšķīdinājā tieši THF ar koncentrāciju $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, savukārt paraugiem, kas nešķīda THF, veica acetobrominēšanu. Acetobrominēšanu veica tieši pirms analīzes. Nosvēra 5 mg parauga, to apstrādāja ar $900\ \mu\text{L}$ etiķskābes un $100\ \mu\text{L}$ acetilbromīda un atstāja 2 h maisīties uz magnētiskā maisītāja ar ātrumu $150\ \text{apg}\cdot\text{min}^{-1}$. Tad šķīdinātāju atdestilēja ar rotācijas ietvaicētāju līdz sausam atlikumam un žāvēja izpūšot 5 min ar N_2 plūsmu. Sausam atlikumam pievienoja 1 mL THF un šķīdumu filtrēja caur $0,2\ \mu\text{m}$ filtru un veica gelfiltrācijas analīzi. Šķidrums hromatogrāfijas sistēmas apstākļi bija sekojoši: detektēšana pie $\lambda = 254$ un 280 nm ar eluenta (THF) plūsmas ātrumu $0,3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ $35\ ^\circ\text{C}$ temperatūrā. Kalibrēšanai izmantoti tika polistirola standarti no 480 līdz $176\ 000$ Da. Datu apstrādei izmantoja *Waters Empower 3 built 3471* programmu. Iegūtie rezultāti doti 3.13. un 3.19. tabulās.

Vidējās skaitliskās (M_n) (2.9. vienādojums) un vidējās masas (M_w) (2.10. vienādojums) molekulmasas, kā arī polidispersitātes pakāpi, kas ir vienāda ar M_w/M_n noteica sekojoši:

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (2.9.)$$

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}; \text{ kur} \quad (2.10.)$$

M_i – noteiktās polimēra molekulas molekulmasa

N_i – molekulu skaits ar molekulmasu M_i

2.8.6. Kopējo fenolu saturs noteikšana ekstraktos

Izmantojot Folina-Čikolto metodi paraugiem noteica kopējo polifenolu savienojumu saturu, izsakot galluskābes ekvivalentos (GSE g/g_{ekstrakta}). Uz analītiskiem svāriem nosvēra 20 mg parauga un izšķīdināja 250 mL 96 % etanolā. 120 mg galluskābes izšķīdināja vienā litrā dejonizēta ūdens un pagatavoja standartšķīdumus ar koncentrācijām 0,0075; 0,015; 0,03; 0,06; 0,09 mg·mL⁻¹. 1 mL galluskābes standartšķīduma pievienoja 1 mL parauga un 5 mL 10 % Folina-Čikolto šķīduma un 4 mL 7,5 % nātrija karbonāta šķīduma. Salīdzināšanas šķīduma pagatavošanai galluskābes vietā lietoja dejonizētu ūdeni. Absorbanci mērija pēc 30 min pie $\lambda = 765$ nm. Iegūto rezultātu aprēķina pēc 2.11. vienādojuma:

$$C = \alpha \times \gamma \times \frac{V}{m}; \text{ kur} \quad (2.11.)$$

C = kopējais fenolu savienojumu saturs ekstraktos (GSE, g/g_{ekstrakta})

α = ekstrakta atšķaidījums

γ = kopējā fenola savienojuma masas koncentrācija pēc kalibrēšanas grafika, mg·mL⁻¹

V = etanola tilp, mL

m = ekstrakta masa, g

Katrai analīzei ņemti 3 paralēli mērījumi un iegūtie dati apstrādāti ar statistikas programmu SPSS 17 un apkopoti 3. nodaļā.

2.8.7. Proantocianidīnu noteikšana

Kondensēto tanīnu jeb proantocianidīnu noteikšanai izmantoja fotometrisko analīzes metodi (butanola metode). Pagatavoja standartšķīdumu sēriju 96 % etanolā no proantocianidīna B2 standarta ar koncentrācijām 1,25; 0,62; 0,42; 0,31; 0,21 mg·mL⁻¹ pievienoja 6 mL (butanols : HCl) (95 : 5) un 0,2 mL dzelzs amonija sulfāta (FeNH₄(SO₄)₂) šķīduma. Iegūtos maisījumus karsēja 50 minūtes 95 °C temperatūrā līdz novēroja maisījuma krāsas maiņu un pēc atdzesēšanas veica absorbcijas mērījumus pie 550 nm. Paraugu (20 mg) sagatavoja tāpat kā standartšķīdumus. Veica trīs paralēlās analīzes un iegūtos datus apstrādāja statistikas programmā SPSS 17.

2.8.8. Augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija

Ekstraktvielu kvalitatīvai un kvantitatīvai savienojumu noteikšanai izmantoja hromatogrāfu ar UV diodes matricas detektoru. Vispirms uzņēma kalibrēšanas grafiku, izmantojot ārējo standartu metodi. Uz analītiskiem svāriem nosvēra 2,5 mg standartvielas un izšķīdināja 25 mL 40 % metanola. Ieguva standartšķīdumu, kurā standarta koncentrācija ir 100

mg·L⁻¹. No tā, atšķaidot, pagatavoja pārējos standartšķīdumus ar masas koncentrācijām 80; 60; 40 un 20 mg·L⁻¹. Veica hromatogrammu uzņemšanu ar 2.3. tabulā dotajiem apstākļiem, eluents A - 0,1 % skudrskābe 5 % metanola ūdens šķīdumā, eluents B - 0,1 % skudrskābe metanolā. Veica trīs paralēlos mērījumus.

2.3. tabula

HPLC apstākļi kvantitatīvai oregonīna satura noteikšanai no baltalkšņa mizas izdalītā diarilheptanoīdu saturošā ekstraktā

Laiks, min	Plūsmas ātrums, mL·min ⁻¹	Eluents A, %	Eluents B, %
0	1	25	75
20	1	25	75
25	1	100	0
28	1	100	0
30	1	25	75

Parauga satura noteikšanai, tāpat kā kalibrēšanas grafika iegūšanai, 2,5 mg parauga izšķīdināja 25 mL 40 % metanola šķīdumā, nofiltrēja caur membrānu filtru ar poru izmēru 0,22 μm un uzņēma hromatogrammas, veicot trīs paralēlos mērījumus.

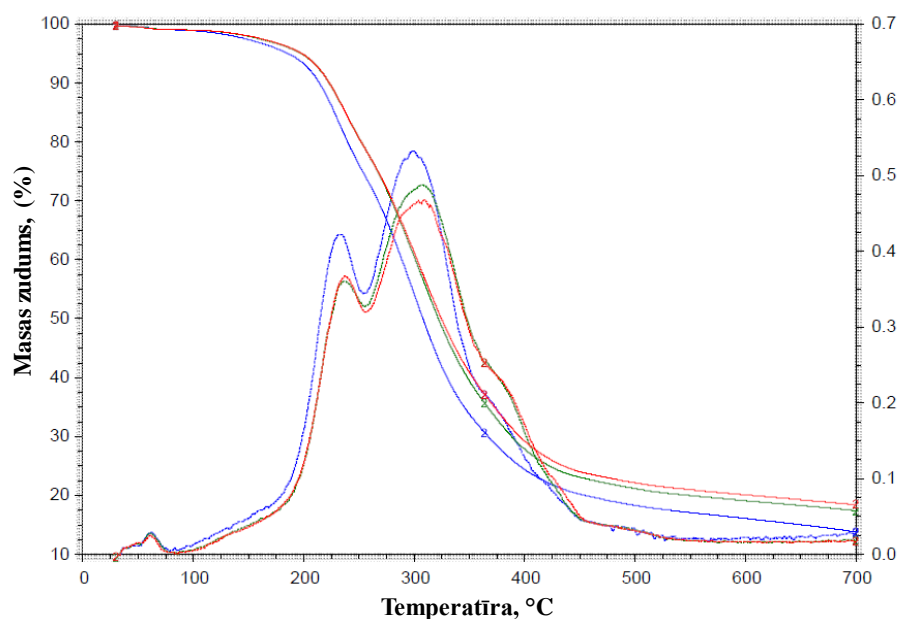
2.8.9. Ultra efektīvā šķidrums hromatogrāfija - masspektrometrija

Paraugus svēra uz analītiskiem svāriem un izšķīdināja metanolā, acetonitrilā vai to ūdens maisījumā, ieguva koncentrāciju 3 mg·mL⁻¹, filtrēja caur membrānu filtru (poru izmērs 0,22 μm) un analizēja ar UPLC-ESI-MS/MS ar iepriekš sastādītiem iekārtas parametriem: plūsmas ātrums 0,3 mL·min⁻¹. Eluents A - 0,1 % skudrskābe ūdenī eluents B - acetonitrils. Izmantoja gradienta apstākļus: 0 - 7 min, 5 % - 95 % (B); 7 - 8 min, 95 % - 95 % (B); 8 - 9 min, 95 - 5 % (B). Injekcijas tilpums 1 μL.

Q-TOF-MS iekārtas parametri: kapilāra spriegums - 2,5 kV, konusa spriegums 40 V, konusa gāzes plūsma 100 L·h⁻¹, kolīzijas enerģija 4 eV, jonu avota temperatūra 120 °C, desolvatācijas temperatūra 250 °C, kolīzijas gāze - argons, desolvatācijas gāze - slāpekļis, plūsmas ātrums 600 L·h⁻¹, datu savākšanas diapazons 50 - 1200 Da, negatīvā jonizācija.

2.9. Termiskā analīze

Ar termogravimetra palīdzību noteica paraugu masas zudumus, atkarībā no karsēšanas temperatūras. Sākotnējo parauga iesvaru 8 mg nosvēra uz analītiskiem svāriem un pārnesa termogravimetrijas iekārtā un ieregulēja nepieciešamo iekārtas karsēšanas ātrumu 10 °C·min⁻¹. Materiālu termooksidējošās destrukcijas pētīšanai izmantoja gaisa atmosfēru, tad karsēšanu veica līdz 1000 °C piemēru skatīt 2.10. attēlā.



2.10. att. No baltalkšņa (*A. incana*) mizas izdalītā oregonīna saturoša ekstrakta termogravimetrijas līknes

2.10. Iegūto savienojumu antioksidantās aktivitātes noteikšana

2.10.1. Antioksidantās aktivitātes noteikšana ar (ABTS^{•+}) radikāļu inhibēšanas metodi

Fosfāta buferšķīdumu (PBS) ar pH = 7,4 pagatavoja no komerciāli pieejama fiksānāla. 2 mM ABTS šķīdumu pagatavoja izšķīdinot 0,055 g 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskābes (ABTS) 50 mL PBS. ABTS^{•+} stabilo radikāļu izejas šķīdumu ieguva sekojoši: 50,0 mL 2 mM ABTS šķīdumam pievienoja 200 μL 70 mM K₂S₂O₈ ūdens šķīdumu, izturot to tumsā 21 ± 1°C temperatūrā 16 stundas. Iegūto ABTS^{•+} šķīdumu atšķaidīja ar PBS līdz absorbcijas vērtībai 0,800 ± 0,030 (λ = 734 nm). Iegūto ABTS^{•+} darba šķīdumu izmantoja paraugu antioksidantās aktivitātes noteikšanai. Antioksidantās aktivitātes noteikšanai pagatavoja noteiktas koncentrācijas analizējamo paraugu, kuru izšķīdināja DMSO un pievienoja pie 1 cm kivetē jau iepriekš ielieta 3,0 mL ABTS^{•+} darba šķīduma. Maisījumu sakratīja un 10 min izturēja tumsā 21 ± 1°C temperatūrā. Pēc tam mērīja absorbciju (A_A) pie λ = 734 nm. Kā salīdzināšanas šķīdumu izmantoja PBS. Katram paraugam pagatavoja un analizēja 5 dažādas koncentrācijas šķīdumus, un katram šķīdumam mērījumus atkārtoja 3 reizes. Lai novērtētu antioksidanta ietekmi uz brīvā radikāļa inhibēšanu, precīzi noteica darba ABTS^{•+} šķīduma absorbciju eksperimenta apstākļos: 3,0 mL ABTS^{•+} darba šķīdumam 1 cm kivetē pievienoja 30 μL šķīdinātāja DMSO (bez parauga). Absorbciju (A_B) nomērīja pēc 10 minūtēm. Mērījumus atkārtoja vairākas reizes (3-5) darba gaitā.

ABTS^{•+} inhibēšanu (absorbcijas samazināšanos; $\lambda = 734 \text{ nm}$) aprēķināja pēc 2.12. formulas.

$$I = \frac{(A_B - A_A)}{A_B} \times 100\% ; \text{ kur} \quad (2.12.)$$

I - inhibēšana, %;

A_B - darba šķīduma absorbcija bez antioksidanta;

A_A - darba šķīduma absorbcija ar antioksidantu pēc 10 min.

Kā references materiālu izmantoja troloksu, tā spēju inhibēt radikāļus atkarībā no koncentrācijas. Iegūtos rezultātus apstrādāja ar datu apstrādes programmu SPSS 17.

2.10.2. Antioksidantās aktivitātes noteikšana ar (DFPH[•]) radikāļu inhibēšanas metodi

Kā darba šķīdumu antioksidantās aktivitātes noteikšanai izmantoja $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DFPH[•] šķīduma metanolā. Antioksidantās aktivitātes noteikšanai pagatavoja noteiktas koncentrācijas analizējamo paraugu kuru izšķīdināja DMSO un pievienoja pie 1 cm kivetē jau iepriekš ielieta 3,0 mL DFPH[•] darba šķīduma, to labi sakratīja un 15 min izturēja tumsā $21 \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūrā un mērīja maisījuma absorbciju (A_A) pie $\lambda = 515 \text{ nm}$. Kā salīdzināšanas šķīdumu izmantoja metanolu. Katram paraugam pagatavoja un analizēja 5 dažādas koncentrācijas šķīdumus ar 3 atkārtojumiem.

Lai novērtētu antioksidanta ietekmi uz brīvā radikāļa inhibēšanu, noteica darba DFPH[•] šķīduma absorbciju eksperimenta apstākļos: 3,0 mL DFPH[•] darba šķīdumam 1 cm kvarca kivetē pievienoja 30 μL šķīdinātāja DMSO (bez parauga). Absorbciju (A_B) mērīja pēc 15 minūtēm $\lambda = 515 \text{ nm}$. Kā salīdzināšanas šķīdumu izmantoja metanolu. Šos mērījumus atkārtoja vairākas reizes darba gaitā.

DFPH[•] inhibēšanu (absorbcijas samazināšanos $\lambda = 515 \text{ nm}$) aprēķināja pēc 2.13. formulas;

$$I = \frac{(A_B - A_A)}{A_B} \times 100\% ; \text{ kur} \quad (2.13.)$$

I - DFPH[•] inhibēšana, %;

A_B - DFPH[•] darba šķīduma absorbcija bez antioksidanta;

A_A - DFPH[•] darba šķīduma absorbcija ar antioksidantu pēc 15 min.

Kā references materiālu izmantoja troloksu. Iegūtos rezultātus apstrādāja ar datu apstrādes programmu SPSS 17.

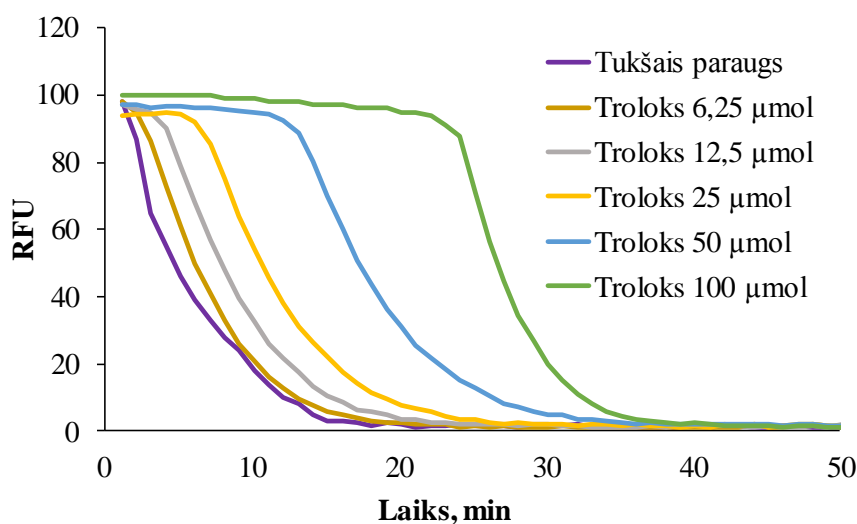
2.10.3. DFPH *on-line* tests

DFPH *on-line* metode ir ātra antioksidantu noteikšanas metode. Divas hromatogrammas tika uzņemtas vienlaicīgi, no kurām viena detektēja savienojumus pie $\lambda = 280$ nm pirms reakcijas ar DFPH[•], otra ir kā (saistītā hromatogramma), ko ieguva pēc reakcijas ar DFPH[•] šķīdumu (50 mg·L⁻¹ metanolā) pie $\lambda = 515$ nm. Hromatogrāfiskie parametri savienojumu detektēšanai bija gradienta režīmā, plūsmas ātrums 0,8 mL·min⁻¹ izmantojot metanolu (B) un 20 % metanola šķīdumu ūdenī (A) gradienta programma: 0 - 18 min 25 % B, 18 - 25 min 70 % B, 25 - 28 min 100 % B. Ekstraktus nosvēra uz analītiskiem svāriem un izšķīdināja metanolā ar masas koncentrāciju 5 mg·mL⁻¹.

2.10.4. Antioksidantās aktivitātes noteikšana ar (ORAC) metodi

Skābekļa aktīvās formas tika iegūtas, termiski sadaloties AAPH (2,-2'-azobis(2-amidino-propān) dihidrohlorīdam), kas samazināja fluoresceīna fluorescenci. Kad šajā sistēmā pievienoja antioksidantus, kas spējīgi atdot protonu, tad tā pievienošana stabilizēja fluoresceīna signālu.

fluoresceīna šķīdumu pagatavoja sekojoši: uz analītiskiem svāriem nosvēra 0,0225 g fluoresceīna un izšķīdināja 50 mL PBS. 95,68 nmol·L⁻¹ fluoresceīna šķīdumu ieguva 800 μL, iepriekš pagatavotā šķīduma, atšķaidot ar 50 mL PBS. 240 mM AAPH šķīdumu pagatavoja, izšķīdinot 1,6272 g AAPH 25 mL PBS. Skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitātes (ORAC) mērījumus veica ar mikroplašu lasītāju, izmantojot 96 šūnu plati. Plates šūnas uzpildīja ar 25 μL pētāma parauga vai troloksa šķīduma, vai PBS šķīdumu tukšajam mērījumam, pēc tam katras šūnas saturam pievienoja 150 μL fluoresceīna šķīduma, izmantojot automātisko paraugu ievadišanas sistēmu. Mikroplati ievietoja mikroplašu lasītājā un 15 minūtes izturēja 37 °C temperatūrā. Izmantojot automātiskas uzpildes sistēmu, katras šūnas saturam ātri pievienoja 25 μL AAPH šķīduma un veica fluorescences mērījumus ik pēc 60 sekundēm un iegūtās kinētiskās līknes attēlotas 2.11. attēlā.



2.11. att. Fluoresceīna oksidēšanas kinētiskā līkne ar un bez antioksidanta troloksa, inhibēšanas atkarība no antioksidanta troloksa koncentrācijas

Katra parauga antioksidanto kapacitāti izteica kā troloksa ekvivalentu μmoli (TE) uz 1 gramu ekstrakta/parauga vai troloksam ekvivalentā antioksidanta koncentrāciju. Kalibrēšanai izmantoja zināmu troloksa koncentrāciju PBS šķīdumus.

2.10.5. Antioksidantās aktivitātes noteikšana tauku un eļļu saturošās sistēmās

Metodes princips balstās uz modificētu slēgtu sistēmu spiediena apstākļos, lai noteiktu antioksidanto efektivitāti heterogēnos produktos, kas satur taukus un eļļu. Rapšu eļļu, majonēzi un gaļu izmantoja kā substrātu, lai novērtētu pētāmo paraugu spēju inhibēt lipīdu oksidēšanos ar skābekli paaugstinātā temperatūrā. Atkarībā no tauku vai eļļas satura substrātā mainās nepieciešamais parauga masas daudzums analīzēm. Optimālu rezultātu sasniegšanai, metodei nepieciešams 5 gramu eļļas. Uz analītiskiem svariem nosvēra paraugu (no 0,01 līdz 0,5 % no kopējā daudzuma) un pārnesa reakcijas trauciņā un pievienoja apmēram 5 g eļļas (vai cita substrāta). Salīdzināšanai izmantoja 5 g tās pašas eļļas (vai cita substrāta) bez antioksidanta piedevas. Reakcijas sistēmu uzpildīja ar skābekli līdz 5 atm spiedienam. Reakcijas trauku ievietoja termostatā un sāka reģistrēt skābekļa spiediena izmaiņas atkarībā no laika 130 °C temperatūrā. Katru analīzi atkārtoja 3 reizes. Indukcijas periodu aprēķināja kā laiku, kurā strauji sāk krist spiediens (2.12. attēlā). Eļļas aizsardzības faktora (AF) un parauga antioksidantās aktivitātes (AA) vērtības aprēķināja pēc 2.14. un 2.15. vienādojumiem.

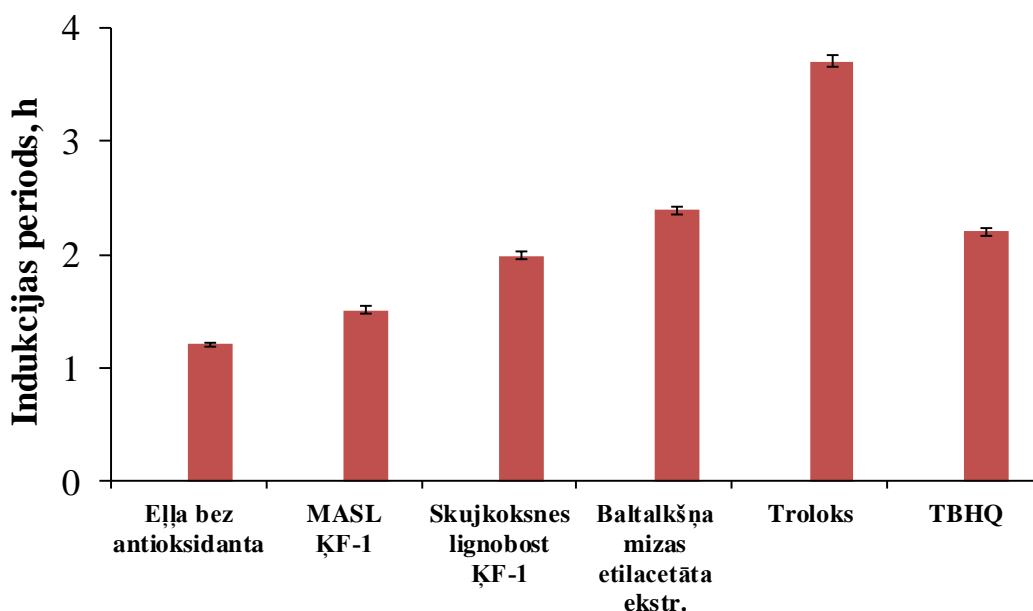
$$PF = IP_X/IP_K \quad (2.14.)$$

$$AA = (IP_X - IP_K)/(IP_{TBHQ} - IP_K); \text{ kur} \quad (2.15.)$$

IP_X - indukcijas periods eļļai ar pētāmā antioksidanta piedevu, h;

IP_K - indukcijas periods eļļai bez antioksidanta piedevas, h;

IP_{TBHQ} - indukcijas periods eļļai ar sintētiska antioksidanta *TBHQ* piedevu, h



2.12. att. Rapšu eļļas oksidēšana ar skābekli, indukcijas perioda pieaugšana antioksidantu ietekmē

2.10.6. Polifenolu saturošu ekstraktvielu ievadišana modeļkompozītmateriālā un antioksidantā efekta noteikšana

PU kompozītmateriāla kopējā masa bija 9,5 g, un no šīs masas rēķināja antioksidanta masu, lai tā būtu 2,5 % no kopējās PU kompozītmateriāla masas. Lai iegūtu kompozītmateriālu, pirmajā kolbā lignīnu izšķīdināja THF, otrā PMDI un trešā PEG. Visās trīs kolbās esošos maisījumus maisīja ar magnētiskajiem maisītājiem, pēc 5 min trešajā kolbā, kurā atradās PEG, pievienoja katalizatoru un maisīja vēl 5 min. Tad apvienoja PEG šķīdumu ar PMDI šķīdumu un maisīja 2 - 3 min. Pēc tam pievienoja lignīna šķīdumu un maisīja vēl 10 min, maisījumu ievietoja ultraskaņas vannā uz 5 min. Iegūto maisījumu izlēja apaļā formā (22 cm diametrā), pāri pārlika stiklu, pēc 1 stundas to noņēma. Pēc dienas iegūto kompozītmateriālu noņēma no formas un ievietoja eksikatorā uz 1 nedēļu. Pēc nedēļas žāvēja 8 stundas, 95 °C temperatūrā. Iegūtajiem PU kompozītmateriāliem veica termogravimetrijas analīzi un pētīja notiekošās izmaiņas, salīdzinot ar kontroles kompozītmateriālu bez pievienota antioksidanta.

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Polifenolu savienojumu ekstrakcijas metodes izvēle un optimālāko apstākļu noteikšana promocijas darbā ir orientēta uz dažāda veida specifisku polifenolu savienojumu iegūvi atkarībā no lignocelulozes biomasas veida. Atlase veikta pamatojoties uz ķīmiskā sastāva rezultātiem - kopējā polifenolu savienojumu satura un ekstraktu antioksidantās aktivitātes vērtībām, kā arī ekstrakcijas iznākumiem, ražošanas potenciāla un to realizācijas perspektīvām tirgū. Pēdējos gados strauji pieaugošā interese par augu izcelsmes bioloģiski aktīviem savienojumiem, tai skaitā to izmantošana kā aktīvai sastāvdaļai veselības veicinošu līdzekļu, kosmētikas un pārtikas produktos, rada nepieciešamību no līdz šim efektīvi neapgūtiem biomasas resursiem iegūt šīs bioloģiski aktīvas vielas un attīstīt to iegūvi industriālā mērogā.

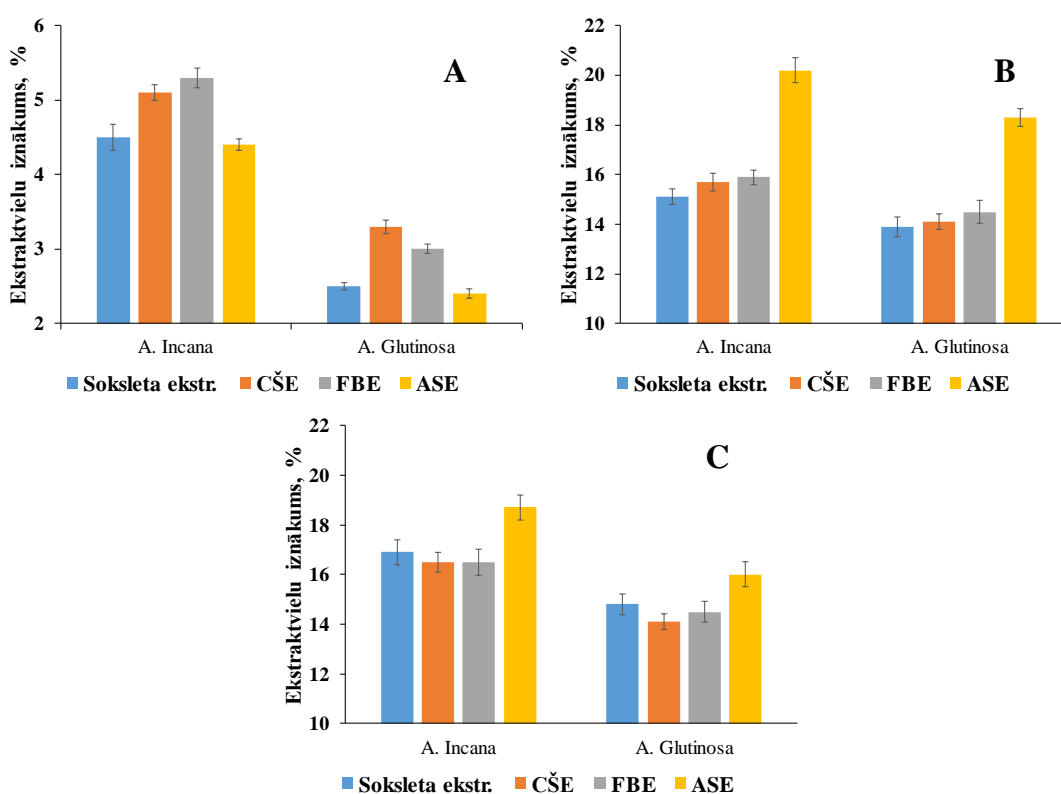
3.1. Polifenolu savienojumu ekstrakcija no alkšņu mizām

Pētījumā galvenās mainīgās sastāvdaļas polifenolu savienojumu ekstrakcijā no Latvijā augošo alkšņu mizām bija: - a) ekstrakcijas metode (Soksleta, macerācija, cietfāzes - šķidrums ekstrakcija (CŠE), paātrinātā šķīdinātāja (ASE), pseido virstošā slāņa (FBE), ekstrakcija mikroviļņos (ME) un superkritiskā CO₂ ekstrakcija), b) šķīdinātājs (etilacetāts, acetons, etanols), c) šķīdinātāja masas daļa (0; 20; 40; 60; 80 un 96 % etanola ūdens šķīdums), d) biomasas šķīdinātāja attiecība, e) ekstrakcijas laiks (15; 30; 60; 90 min), f) ekstrakcijas temperatūra (no istabas temperatūras līdz 140 °C), g) vienpakāpes vai secīga ekstrakcija (lipofīlo vai citu ekstraktvielu atdalīšana pirms mērķsavienojumu ieguves). Iepriekš minētie parametri tika izvērtēti, lai pielāgotu ekstrakcijas efektivitāti. Šie maināmie lielumi ir ekstrakcijas procesa atslēga, jo tie ietekmē gan polifenolu savienojumu ieguves kinētiku no cietās matricas, gan ekstraktu antioksidanto aktivitāti. Pētījums tika veikts vairākās daļās. Pirmajā daļā tika atlasīta piemērotākā ekstrakcijas metode un šķīdinātājs, pamatojoties uz polifenolu savienojumu daudzumu alkšņu mizu ekstraktos. Otrajā daļā tika pielāgoti vispiemērotākās ekstrakcijas metodes mainīgie parametri un šķīdinātāji specifisku polifenolu savienojumu (diarilheptanoīdu) ieguvei, vienlaikus novērtējot arī citu polifenolu savienojumu kompozīcijas un daudzumus.

3.1.1. Ekstrakcijas metodes un šķīdinātāja ietekme uz ekstraktvielu iznākumu

Lai iegūtu maksimālu baltalkšņa un melnalkšņa mizas polifenolu savienojumu iznākumu, tika izmantotas dažādas ekstrakcijas metodes. Kopumā izmantotas septiņas dažādas ekstrakcijas metodes, no kurām, trijām (Soksleta, cietviela-šķidrums un paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijām) veikta parametru optimizācija, izmantojot tradicionāli analītiskās ķīmijas

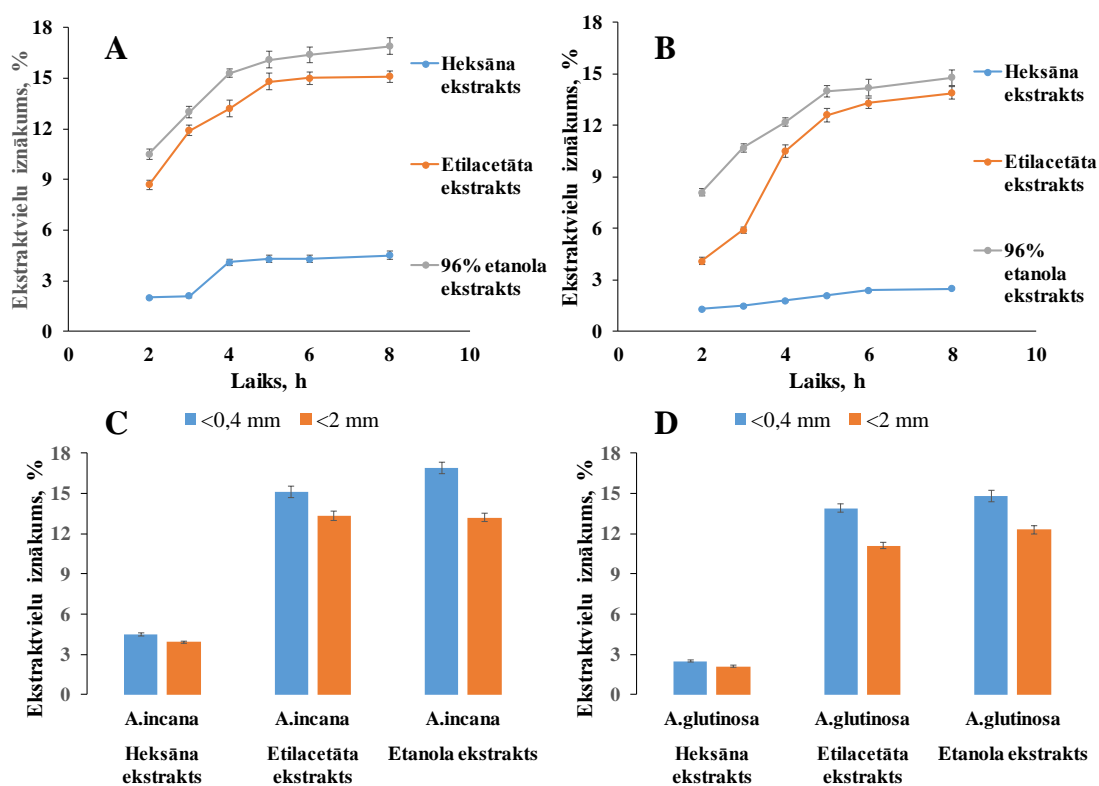
ietekmes novērtēšanas monitoringu - novērtējot viena mainīgā faktora ietekmi laikā, nemainot pārējos [188]. Ekstrakcijas šķīdinātāju izvēle veikta, pamatojoties uz literatūras izpēti: heksāns klasiski tiek lietots lipofīlu komponentu atdalīšanai, lai netraucētu tālāku polārāku savienojumu ieguvei un analīzi [51]. Etilacetāts ir piemērotāks vidēji polāru savienojumu ieguvei, kuru iznākumi ir salīdzināmi ar plaši lietoto šķīdinātāju acetonu un etilacetāts arī ir atļauts lietot pārtikas produktu izejvielu ieguves procesos [189]. Etanols tiek lietots kā polārs šķīdinātājs, kurā galvenokārt izšķīst fenola savienojumu poliglikozīdi un tanīni. Lai metodes varētu savstarpēji salīdzināt izmantoti tīri šķīdinātāji, jo klasiskajā Soksleta un pseido virstošā slāņa ekstrakcijā nevar izmantot šķīdinātāju maisījumus. Iegūtie ekstrakciju rezultāti atkarībā no izmantotās ekstrakcijas metodes un šķīdinātājiem attēloti 3.1. attēlā.



3.1.att. Baltalkšņa (*A. incana*) un melnalkšņa (*A. glutinosa*) mizas ekstraktvielu iznākums (%) uz a.s. mizu atkarībā no ekstrakcijas metodes un šķīdinātāja: A - ekstrakcija ar heksānu, B - ekstrakcija ar etilacetātu, C - ekstrakcija ar 96 % etanolu

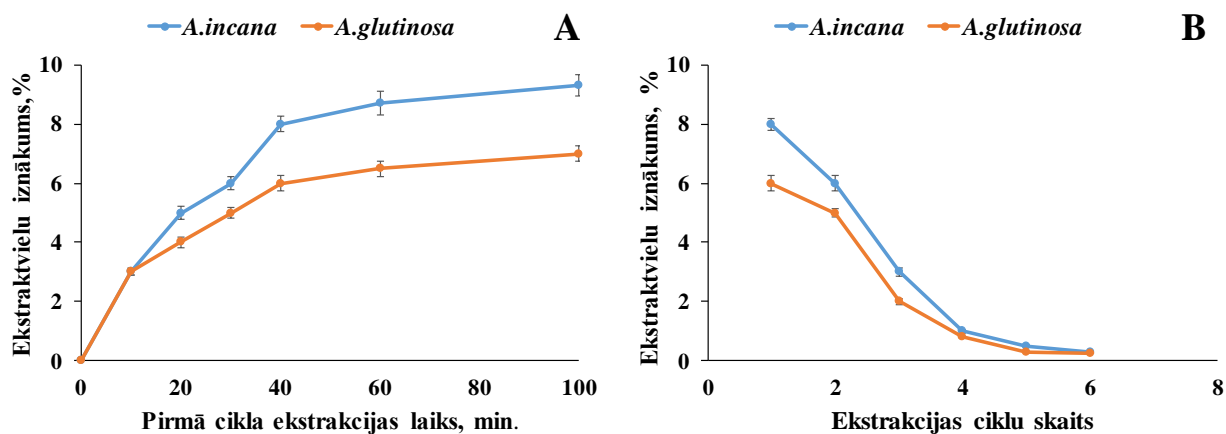
Iegūtie ekstrakcijas rezultāti parādīja, ka izmantojot tīrus šķīdinātājus vislielāko ekstrakcijas daudzumu polifenolu saturošu ekstraktu ieguvei iegūst, izmantojot paātrinātā šķīdinātāja ekstrakciju, kas būtu skaidrojams ar spiediena režīma izmantošanu šajā ekstrakcijas metodē salīdzinot ar pārējām lietotām ekstrakcijas metodēm. Savukārt, samazināts lipofīlu ekstraktvielu iznākums ir skaidrojams ar paaugstinātu temperatūru, kā rezultātā ir noticis viegli gaistošo lipofīlu savienojumu zudums parauga savākšanas laikā. Soksleta ekstrakcijas iznākumi atkarībā no ekstrakcijas laika ir apkopoti 3.2. attēlā (A) un (B) un no alkšņu mizas daļiņu izmēra

- 3.2. attēlā (C) un (D). Soksleta ekstrakcijas parādīja, ka palielinot ekstrakcijas laiku virs 6 h, ekstrakcijas efektivitāte būtiski nemainās. No literatūras avotiem ir zināms, ka ekstrakcija atkarībā no augu biomasas un izmantotā šķīdinātāja nav viennozīmīgi vērtējama, ka pieaugot ekstrakcijas laikam pieaug ekstrakcijas iznākums. Ir parādīts, ka mātes lakstu secīgas ekstrakcijas gaitā [190], izmantojot Soksleta ekstrakciju, iznākumi metanola ekstraktam pieaug līdz ar ekstrakcijas laiku, savukārt heksāna ekstraktam nav novērojama šī tendence, jo ekstrakcijas augstākais iznākums heksānā tika novērots pēc 6 stundām, savukārt zemākais pēc 9 stundām. To iespējams skaidrot, ka pieaugot ekstrakcijas laikam notiek ekstraktu termiskā degradācija. Alkšņu mizas daļiņu izmēra ietekme uz ekstrakcijas rezultātu tika noteikta, izmantojot mizu ar daļiņu izmēru < 0,4 mm un < 2 mm.



3.2. att. Baltalkšņa (*A. incana*) (A) un melnalkšņa (*A. glutinosa*) (B) mizas Soskleta ekstrakcijas ekstraktvielu iznākums (%) uz a.s. mizu atkarībā no ekstrakcijas laika un baltalkšņa (C), melnalkšņa (D) mizas daļiņu izmēra ietekme uz Soskleta ekstrakcijas iznākumu (%) uz a.s. mizu

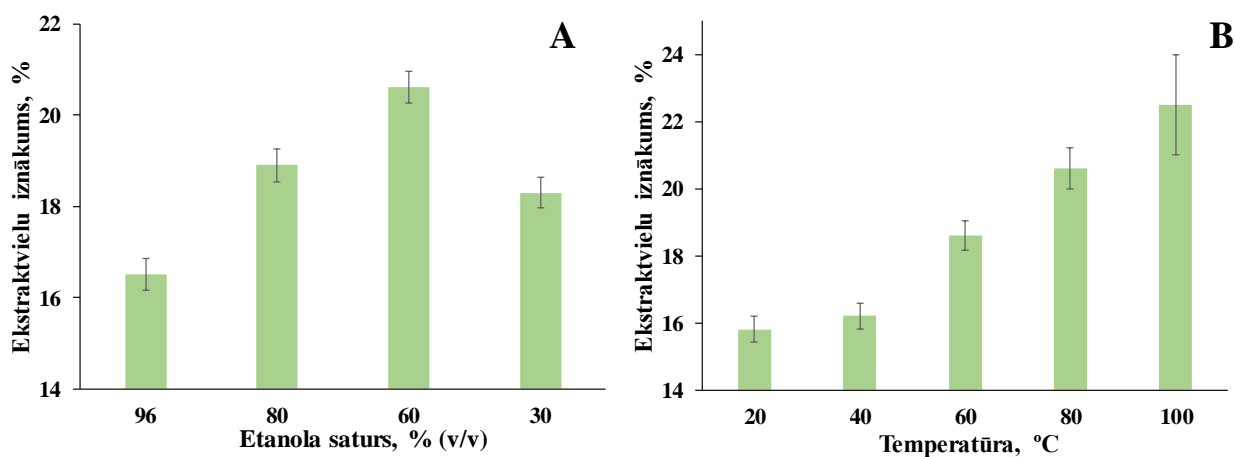
Lielāku ekstrakcijas iznākumu ieguva izmantojot mizu ar daļiņu izmēru < 0,4 mm. Plaši lietota ekstrakcijas metode ir ekstrahējamo paraugu apstrāde kopā ar šķīdinātāju kolbā ar atces dzesinātāju. Veicot alkšņu mizu ekstrakcijas pēc 2.1. attēlā redzamās shēmas tika mainīts ekstrakcijas ciklu laiks un skaits. Rezultāti 3.3. attēlā (A) parāda, ka baltalkšņa un melnalkšņa mizas CŠE ar etilacetātu optimālais pirmā cikla ekstrakcijas laiks ir 40 minūtes un pēc tam var veikt atkārtoto ekstrakciju.



3.3. att. Baltalkšņa (*A. incana*) un melnalkšņa (*A. glutinosa*) mizas CŠE kolbā etilacetāta ekstraktvielu iznākums (%) uz a.s. mizu atkarībā no ekstrakcijas cikla laika (A) un ciklu skaita (B), daļiņu izmērs < 0,4 mm

Baltalkšņa un melnalkšņa mizas CŠE ekstrakcijas iznākumi ir nedaudz lielāki, salīdzinot ar Soksleta ekstrakcijas rezultātiem. 3.3 attēlā redzams, ka visoptimālākais ekstrakcijas režīms ir 4 ciklu ekstrakcija ar ekstrakcijas laiku 40 minūtes salīdzinot ar 3 ciklu režīmu. Etilacetāta CŠE ekstraktu iznākumi ir līdzīgi iznākumiem, kas iegūti ar Soksleta ekstrakciju. CŠE metodē šos ekstrakcijas iznākumus iegūst vidēji 3 stundu laikā, salīdzinot ar 6 stundām, lietojot Soksleta ekstrakciju. Papildus CŠE metodē ekstrakcijai tika izmantota arī ekstrakcija ar tīru etanolu un etanola ūdens maisījumiem, lai novērtētu etanola satura ietekmi uz polāru ekstraktvielu iznākumu (skatīt 3.4. attēlu (A)).

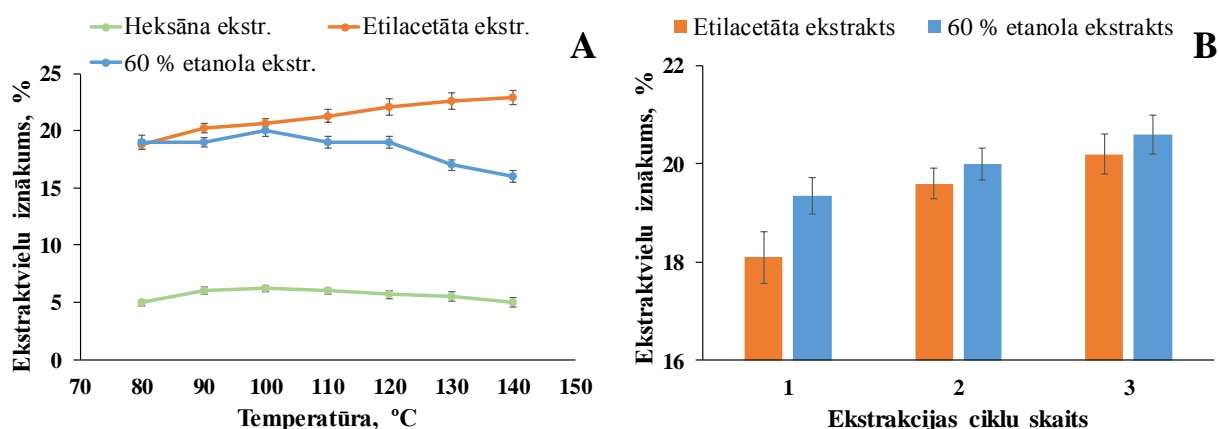
Baltalkšņa mizas ekstrakcija ar dažāda koncentrācijas etanola ūdens maisījumiem parādīja, ka lietojot 60 % etanola ūdens maisījumu ir iespēja iegūt par četriem procentiem lielāku iznākumu no izejas materiāla, salīdzinot ar 96 % etanolu. Savukārt, lietojot 30 % etanola ūdens maisījumu iegūtā ekstrakta iznākums būtiski samazinās un ir ar zemu mērķsavienojumu saturu. Lietojot šķīdinātāju maisījumus ar ūdeni kopējās ekstrakcijas izmaksas, rēķinot uz produktu, samazinās, jo ūdens ir lētāks izmaksu ziņā un “zaļš” šķīdinātājs salīdzinot ar tīru etanolu. Savukārt Soksleta ekstrakcijas metode nav piemērota šķīdinātāju maisījumiem un temperatūrām, kas ir zemākas par šķīdinātāju viršanas temperatūrām. CŠE metodē šķīdinātājs ir tiešā kontaktā ar ekstrahējamo materiālu un ir iespēja variēt ar ekstrakcijas temperatūrām. 3.4. attēlā (B) ir parādīti CŠE iznākumi dažādās temperatūrās. Lietojot šķīdinātāju maisījumus svarīgi ir izvēlēties temperatūru, kas krasi nepārsniedz viršanas temperatūru šķīdinātājam ar zemāko viršanas temperatūru, lai nenotiktu strauja vārīšanās, kā rezultātā tiek izjaukts šķīdinātāju uzdotais maisījums un ekstrakcijas apstākļi kļūst nekontrolējami. Pētījuma rezultāti parāda (3.4. attēls (B)), ka optimālākā ekstrakcijas temperatūra 60 % etanola ūdens maisījumam ir 80 °C.



3.4. att. Baltalkšņa (*A. incana*) mizas CŠE ekstraktvielu iznākums (%) uz a.s. mizu (A) - atkarībā no etanola ūdens daudzumu, (B) – 60 % etanola ūdens ekstraktvielu iznākums (%) atkarībā no ekstrakcijas temperatūras, daļiņu izmērs < 0,4 mm

Pēdējā laikā, kā viena no modernākajām un labākajām laboratorijas apstākļos (nu jau arī pilotmērogā) lietotām ekstrakcijas metodēm ir paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija (ASE), kurā pateicoties paaugstinātai temperatūrai, spiedienam un inertai atmosfērai tiek iegūti lielāki polifenolu savienojumu ekstraktvielu daudzumi no dažādiem biomasas materiāliem [191]. Izmantojot ASE vidēji tika iegūti 2 - 5 % lielāki ekstraktu iznākumi vidēji polāriem un polāriem ekstraktiem salīdzinājumā ar pārējām darbā izmantotām ekstrakcijas metodēm.

Ir zināms, ka ekstraktvielu iznākums ir atkarīgs no temperatūras [192], tāpēc promocijas darbā alkšņu mizas ekstrakcijas ar ASE veiktas 80; 90; 100; 110; 120; 130; 140 °C temperatūrās, lai novērtētu tās ietekmi uz ekstraktvielu iznākumu un sastāvu (skatīt 3.5. attēlu (A)).

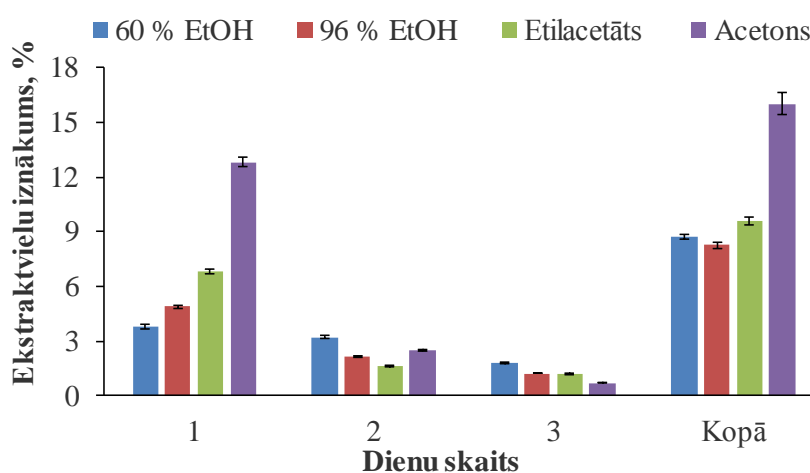


3.5. att. Baltalkšņa (*A. incana*) mizas ASE ekstraktvielu iznākums (%) uz a.s. mizu (A) - atkarībā no ekstrakcijas temperatūras, (B) - ekstrakcijas ciklu skaita, daļiņu izmērs < 0,4 mm

3.5. attēlā (A) iegūtie ekstrakcijas rezultāti parāda, ka līdz ar temperatūru pieaug arī ekstrakcijas iznākums, tomēr temperatūrās, kas ir augstākas par 90 °C temperatūras ieguldījums ir

salīdzinoši neliels, bet palielinās iegūstamo savienojumu degradācijas risks temperatūrās virs 100 °C. Par to liecina fakts, ka ekstrakcijas temperatūrās, kas augstākas par 110 °C pieaug etilacetāta (vidēji polāri pārsvarā zemmolekulārie savienojumi) ekstrakta iznākums, bet sāk samazināties etanola ūdens (dominē oligomēri savienojumi) ekstrakta iznākums, kas liecina par oligomēro savienojumu destrukciju.

Pasaulē plaši izmantotā, tradicionālā bioloģiski aktīvu dabasvielu ieguves metode ir macerācija*. Lai gan vienkāršības dēļ macerācija tiek plaši lietota, īpaši homeopātisko līdzekļu ieguvē, tai ir savi trūkumi, tādi kā liels šķīdinātāja patēriņš, selektivitāte un ilgs ekstrakcijas laiks. Macerācija tika veikta izmantojot etilacetātu, acetonu un etanolu, kā arī 60 % etanola ūdens maisījumu. Rezultāti parādīti 3.6. attēlā.



3.6. att. Melnalkšņa (*A. glutinosa*) mizas trīs dienu macerācijas ekstraktvielu iznākums (%) uz a.s. mizu, izmantojot dažādus šķīdinātājus, daļiņu izmērs < 0,4 mm

Izmantojot macerāciju, melnalkšņa mizas 9 % ekstraktvielu iznākums tika iegūts ar 60 % etanola ūdens maisījumu un ekstrakta iznākums ir salīdzināms ar literatūras datiem (8 - 12 % etanola vai metanola izvilkums) [193]. Vislielākais iznākums tika iegūts ar acetona izvilkumu, bet ar zemu selektivitāti (skatīt 3.2.1. nodaļā par ekstraktvielu ķīmisko raksturojumu).

Tālākos pētījumos baltalkšņa mizas ekstrahētas, izmantojot superkritisko CO₂ ekstrakciju. Secīga ekstrakcija vispirms tika pētīta ar tīru CO₂ šķīdumu un pēc tam to modificējot ar etanolu (~ 5 %). Rezultātā tika iegūtas divas frakcijas, nepolāra un salīdzinoši polāra, kura iegūta modificējot CO₂ ar etanolu. Baltalkšņa mizas ekstrakcijas rezultāti apkopoti 3.1. tabulā.

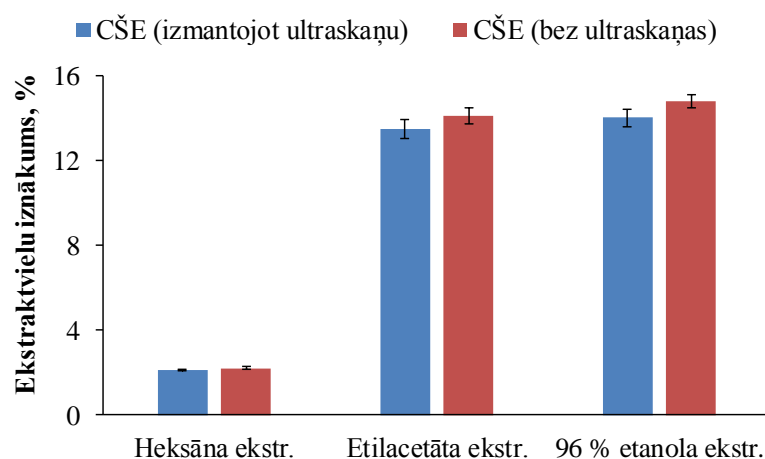
* Augu materiāla apstrāde ar šķīdinātāju istabas temperatūrā, iegūstot izvilkumu izturot to šķīdinātājā ne mazāk kā 24 stundas.

Baltalkšņa mizas superkritiskā CO₂ secīgas ekstrakcijas iznākumi (%) ar standartnovirzēm uz a.s. mizu (p=300 atm, T= 60 °C)

Baltalkšņa mizas ekstrakts	Ekstraktvielas iznākums, %
CO ₂ ekstrakts	5,42 ± 0,17
CO ₂ + C ₂ H ₅ OH ekstrakts	2,75 ± 0,12

Izvērtējot iegūtos ekstrakcijas rezultātus, var secināt, ka izmantotā metodē iegūtās frakciju masas iznākumi ir salīdzinoši mazi, bet ir pierādīta šīs ekstrakcijas alternatīva dažu polifenolu savienojumu ieguvei. Izvērtējot literatūru, ir maz informācijas par alkšņu mizas polifenolu iegūvi ar superkritisko CO₂ ekstrakciju. Literatūrā [194] ir minēti pētījumi par melnalkšņa mizas ekstrakciju ar superkritisko CO₂ un iegūtie rezultāti ir līdzīgi. Baltalkšņa mizas CO₂ ekstrakta daudzums ir lielāks, tas saskan ar zināmo informāciju, ka baltalkšņa miza satur vairāk lipofīlos savienojumus mizā, salīdzinot ar melnalkšņa mizu, bet kopumā iegūtie ekstrakcijas iznākumi izmantojot superkritisko CO₂ ekstrakciju ir salīdzinoši mazi. Perspektīvā šo metodi var lietot, lai iegūtu lipofīlos savienojumus no augu biomasas, aizstājot gaistošos organiskos šķīdinātājus, kā piemēram, heksānu, petrolēteri u.c.

Lai izvērtētu ultraskaņas ietekmi, tika veikta melnalkšņa mizas CŠE 80 °C temperatūrā ultraskaņā un bez tās. Rezultāti (skatīt 3.7. attēlā) parādīja, ka ultraskaņas izmantošana alkšņa mizas ekstrakcijai salīdzināma ar ekstrakcijas efektivitāti paaugstinātā temperatūrā bez ultraskaņas.

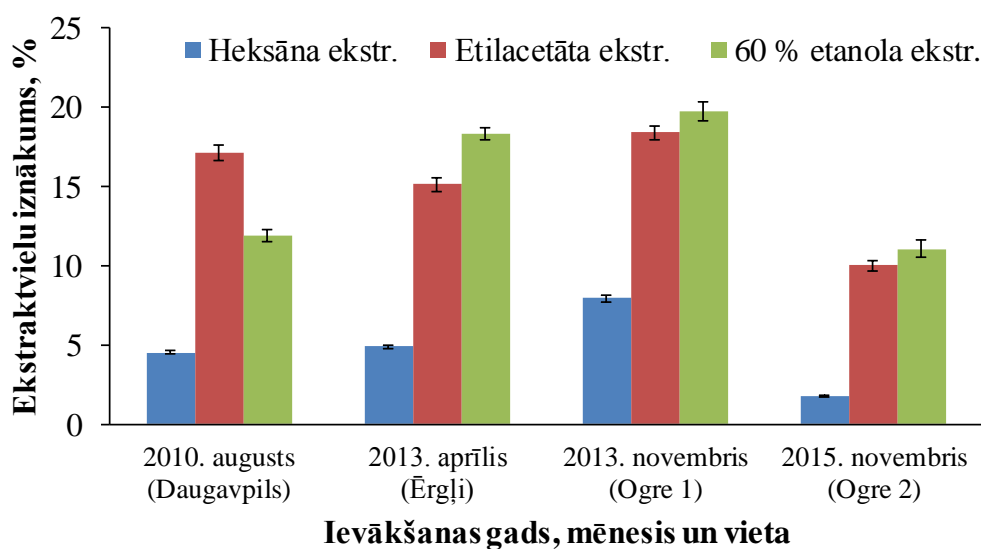


3.7. att. Melnalkšņa (*A. glutinosa*) mizas CŠE ekstraktvielu iznākumi (%) uz a.s. mizu izmantojot ultraskaņu un bez ultraskaņas 80 °C temperatūrā, daļiņu izmērs < 0,4 mm

Apkopojot ekstrakcijas pielietošanas iespējas polifenolu saturošu ekstraktu ieguvē, viennozīmīgi var teikt, ka moderno ekstrakcijas metožu (ASE) lietošana ir efektīva gan laika, gan šķīdinātāju patēriņa ziņā, lai iegūtu lielāku daudzumu ekstraktvielu ar labāku selektivitāti, salīdzinājumā ar tradicionālajām ekstrakcijas metodēm.

3.1.2. Alkšņu mizas sagatavošanas, ievākšanas laika, augšanas vietas ietekme uz ekstrakcijas iznākumu

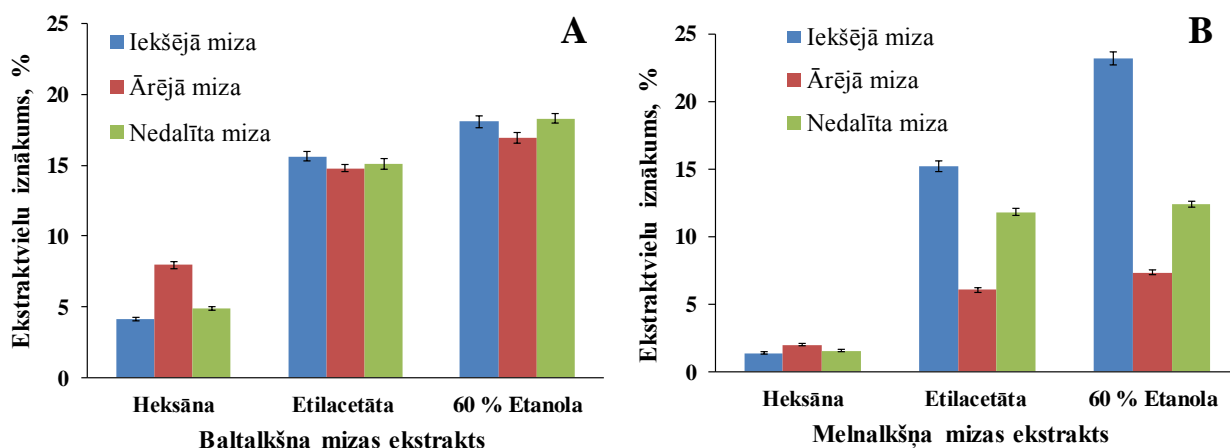
Alkšņu mizas ievākšanas/augšanas vietas un laika ietekme uz ekstraktvielu iznākumu tika noteikta, ievācot alkšņu mizas no dažādām Latvijas vietām, dažādās sezonās pēc nejaušības principa. Vidējie lipofīlo, vidēji polāro un polāro ekstraktvielu dažādu ekstrakcijas metožu rezultāti parādīja, ka ievākšanas laika un augšanas vietas ietekme ir vērā ņemama. Polifenolu savienojumu saturošo ekstraktu iznākums variē etilacetāta ekstraktam no 10 - 19 %, bet etanola no 11 - 20 % uz a.s. mizu (skatīt 3.8. attēlu). Iegūtie rezultāti parāda, ka standartizējot ekstraktu iegūvi, ir jāievēro alkšņu mizas ievākšanas laiks un vieta.



3.8. att. Baltalkšņa mizas ekstraktu vidējie ekstraktvielu iznākumi (%) uz a.s. mizu atkarībā no ievākšanas laika un augšanas vietas, daļiņu izmērs < 0,4 mm

Izejvielas augšanas vietas un ievākšanas laika ietekmes novērtējums parāda, ka atkarībā no izmantotās alkšņu mizas ekstraktvielu iznākums ir mainīgs. Atšķiras arī nepieciešamais mizas daudzums vienāda ekstrakta daudzuma ieguvei, kas ir būtisks faktors rūpnieciskai ražošanai. Nozīmīgs parametrs ekstraktu ieguvē ir paraugu sagatavošana. Alkšņu mizas daļiņu izmēra ietekme jau tika apskatīta pie ekstrakcijas metožu ietekmes, papildus šim parametram ir novērtēta nedalītas mizas, kā arī atsevišķas ārējās un iekšējās alkšņu mizas izmantošana polifenolu savienojumu ieguvei. Rezultāti parādīja (skatīt 3.9. attēlā (A)), ka baltalkšņa mizas vidēji polāro un polāro ekstraktu iznākumi iekšējai un ārējai mizai neuzrāda būtiskas atšķirības ekstraktvielu iznākumā (16 - 18 % uz a.s. mizu), izņēmums ir ar heksānu iegūtās lipofīlās ekstraktvielas ārējā mizā (~ 8 % uz a.s. mizu) un tās ir gandrīz 2 reizes vairāk nekā iekšējā mizā (~ 4 % uz a.s. mizu). Savukārt melnalkšņa (skatīt 3.9. attēlā (B)) iekšējās un ārējās mizas ekstrakcija uzrāda citas sakarības. Iekšējā miza satur vairāk hidrofilās ekstraktvielas nekā ārējā

miza, bet ārējā miza savukārt gandrīz divas reizes vairāk lipofilās ekstraktvielas (2 % uz a.s. mizu).



3.9. att. Baltalkšņa (*A. incana*) (A) un melnalkšņa (*A. glutinosa*) (B) iekšējās, ārējās un nedalītas mizas paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas ekstraktvielu iznākumi (%) uz a.s. mizu salīdzinājums, daļiņu izmērs < 0,4 mm

Literatūrā ir parādīts, ka vidēji alkšņiem un bērziem, kas auguši Somijā ārējā mizā ir vairāk heksāna un acetonā šķīstošas ekstraktvielas, bet iekšējā mizā etanolā un ūdenī, izņēmums ir melnalkšņa miza, kur ārējā miza satur mazāk acetona ekstraktvielas, salīdzinot ar iekšējo mizu [195]. Ņemot vērā, ka vidēji baltalkšņa mizu veido 88 % iekšējā miza un tikai 12 % ārējā miza un kā redzams 3.9. attēlā ekstraktvielu iznākuma variācija hidrofilajām ekstraktvielām nav izteikta, mizas sadalīšana nav efektīva. Ir pierādīts, ka ekstraktvielu saturs alkšņu mizās pieaug no stumbra lejas uz augšu, apmēram par 2 % [195], tomēr mērķis ir izmantot mizas kā mehāniskās pārstrādes atlikumus, kuru sadalīšana pēc mizas ievākšanas augstumiem būtu apgrūtināta un neefektīva. Melnalkšņa mizas gadījumā tās sadalīšana būtiski ietekmē ekstraktu iznākumu, bet iekšējās un ārējās mizas atdalīšanas nepieciešamība tuvāk tiks apskatīta pamatojoties uz ekstraktu ķīmisko sastāvu.

3.2. Alkšņu mizas un to polifenolu saturošu ekstraktvielu ķīmiskais raksturojums

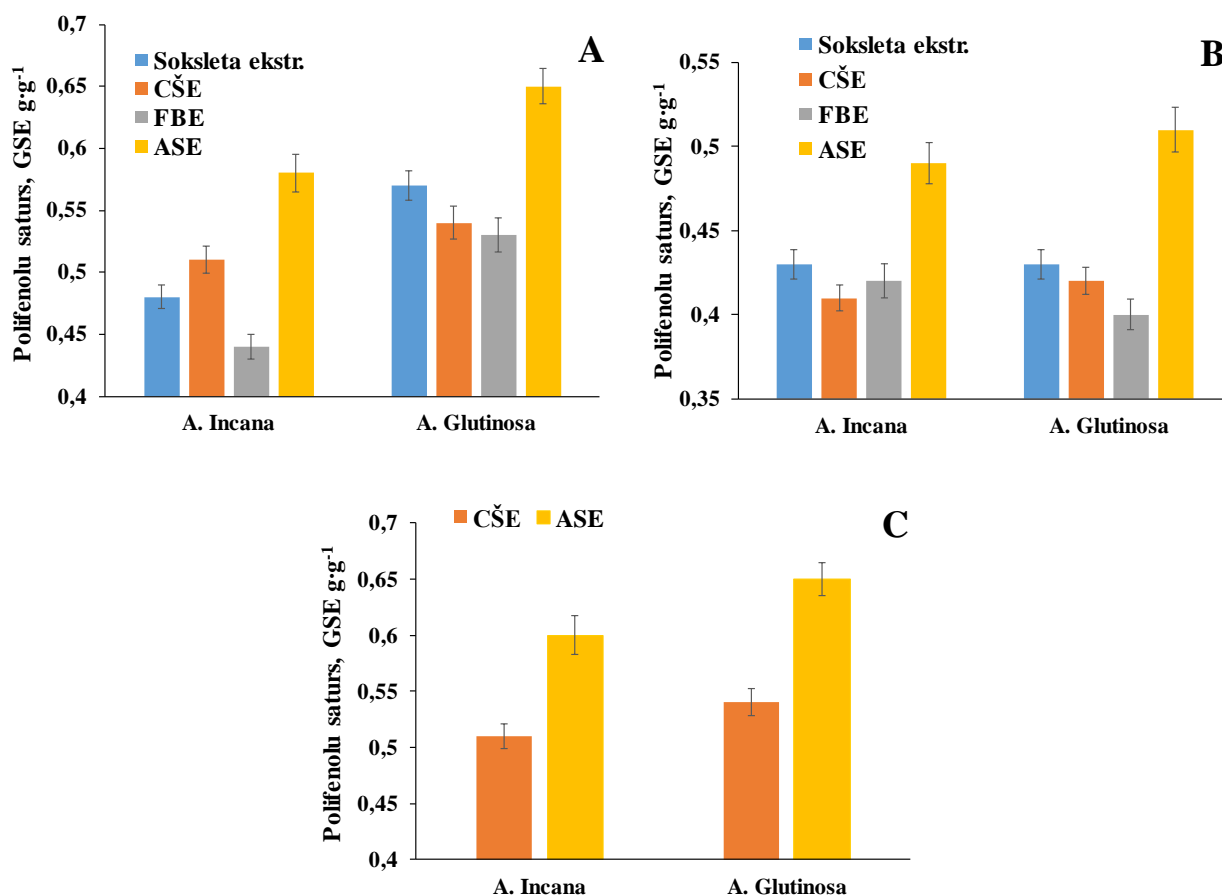
Visiem alkšņu mizas paraugiem pelnu saturs bija robežās no 2 līdz 5 % uz a.s. mizu, bet mitruma saturs bija līdz 10 %, kas būtiski neietekmēja ekstrakcijas iznākumus. Ņemot vērā, ka darbs ir orientēts tieši uz ekstraktvielu ieguvu un to tālāku izmantošanu, tika noteikts metālisko elementu saturs alkšņu mizās un salīdzināts mizas sastāvs pirms un pēc ekstrakcijas. Šajā sadaļā mizas sastāva izmaiņas pirms un pēc ekstrakcijas ir apskatītas baltalkšņa mizām. Baltalkšņa mizas pelnu saturs pirms secīgas ekstrakcija sastādīja 4,5 %, ekstrakcijas rezultātā pelnu saturs palielinājās līdz 6,2 %, ko var izskaidrot ar neorganiskās daļas koncentrēšanos pēc secīgas ekstrakcijas ar organiskajiem šķīdinātājiem. Mizā pēc ekstrakcijas kadmija, cinka, mangāna un

kālija saturs ir palielinājies salīdzinājumā ar mizu pirms ekstrakcijas, bet svina un dzelzs saturs - samazinājies. To varētu izskaidrot ar neorganiskās daļas koncentrēšanos mizā pēc ekstrakcijas, bet dzelzs un svina saturs samazinājumu pārejot ekstraktos organisko savienojumu veidā. Hroma un arsēna saturs visos paraugos ir mikroaudzumu līmenī. Svina un kadmija saturs mizas paraugos arī ir neliels attiecīgi $0,5 - 1,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ un $0,05 - 0,07 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ līmenī. Baltalkšņa mizas elementsastāvs (N = 1,4 %; C = 53,2 %; H = 5,5 %; O = 39,9 %) ir tuvs citu alkšņu sugu mizu elementsastāviem, kas publicēti literatūrā. Alkšņa sugas ir pieskaitāmas pie slāpekli saistošām koku sugām, jo alkšņa mizās slāpekļa saturs ir divas reizes lielāks, salīdzinot ar vidējo N saturu citu kokaugu sugās (0,8 %). Baltalkšņa mizas elementanalīzes rezultātu salīdzinājums pirms un pēc ekstrakcijas parāda, ka ekstrakcijas rezultātā oglekļa saturs samazinās no 53,2 % uz 49,5 %, ūdeņraža saturs nedaudz samazinās no 5,5 % līdz 5,3 %, bet skābekļa un slāpekļa saturs pieaug. Šīs izmaiņas saistītas ar alifātiskās un aromātiskās dabas vielas (lipofīlās ekstraktvielas un polifenoli) ekstrahēšanu.

Alkšņu mizas ekstraktu ķīmiskais sastāvs darbā ir raksturots ar kopējo polifenolu savienojumu saturu (Folina-Čikolto metode), individuālu polifenolu savienojumu identifikāciju un dominējošo savienojumu kvantificēšanu (šķidrums hromatogrāfija - masspektrometrija) un antioksidanto aktivitāti (ORAC, ABTS^{•+}, DFPH[•], kā arī aizsardzību pret lipīdu oksidāciju OXIPRES metode).

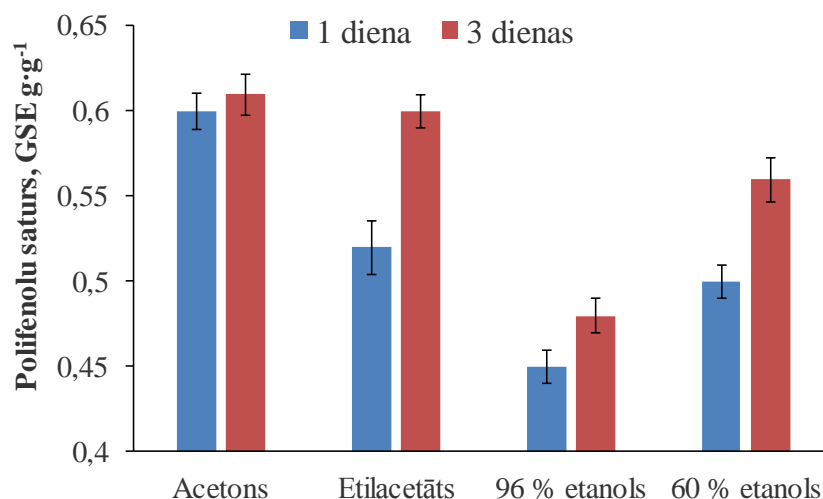
3.2.1. Alkšņu mizas polifenolu saturošu ekstraktvielu raksturojums

Kopējais polifenolu savienojumu saturs atkarībā no ekstrakcijas metodes un izmantotā šķīdinātāja ir parādīts 3.10. attēlā.



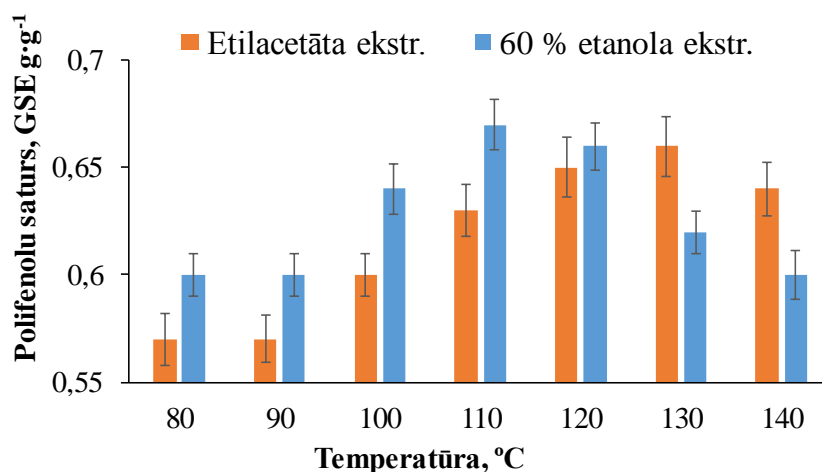
3.10. att. Polifenolu savienojumu saturs alkšņu mizas A – etilacetāta, B – 96 % etanola, C- 60 % etanola ūdens ekstraktos GSE g·g⁻¹ sausa ekstrakta atkarībā no izmantotās ekstrakcijas metodes

Vidēji polifenolu savienojumu saturs Latvijā augošo alkšņu mizās ir robežās no 0,50 - 0,65 GSE g·g⁻¹ atkarībā no izmantotās ekstrakcijas metodes un šķīdinātāja. Vislabākos polifenolu daudzumus izdevās iegūt ar paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas iekārtu. Salīdzinot vidējo polifenolu savienojumu saturu Latvijā augušu alkšņu mizās ar, piemēram, Horvātijā (0,15 - 0,55 GSE g·g⁻¹) augošiem alkšņiem [193], tas ir lielāks un nodrošina lielāku polifenolu savienojumu iegūvi, izmantojot mazāk izejvielas un tādejādi nodrošinot konkurētspēju tirgū. Kopējo polifenolu rezultāti macerācijā (skatīt 3.11. attēlu) iegūtajos ekstraktos parādīja, ka macerācijas laiks būtiski neietekmē polifenolu saturu ekstraktos (0,45 - 0,61 GSE g·g⁻¹) un tas ir tuvs ekstraktiem, kas iegūti ar tiem pašiem šķīdinātājiem, izmantojot klasiskās ekstrakcijas metodes, bet neuzrādīja labākus rezultātus par ASE metodē iegūtiem.



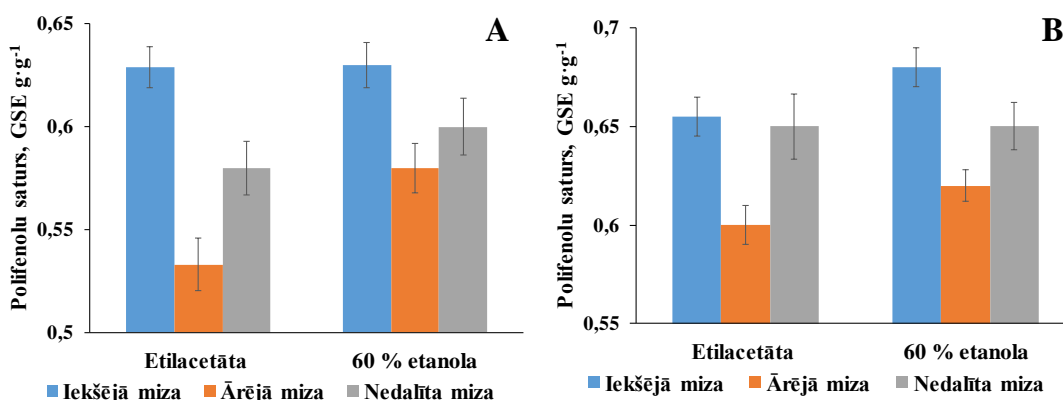
3.11. att. Polifenolu savienojumu saturs GSE, g·g⁻¹ sausa ekstrakta, melnalkšņa (*A. glutinosa*) mizas macerācijā iegūtajos ekstraktos

Vislielākie hidrofilo ekstraktu iznākumi tika iegūti ar ASE metodi, tādēļ detalizētāks polifenolu savienojumu saturs ir apskatīts ar šo metodi iegūtajos polifenolu saturošajos ekstraktos, atkarībā no izmantotajiem parametriem (ciklu skaita, temperatūras un laika (skatīt 3.12. attēlu)). Rezultāti parādīja, ka polifenolu savienojumu saturs etilacetāta ekstraktos pieaug līdz ar temperatūru, savukārt 60 % etanola ūdens ekstraktos polifenolu saturs aug līdz 120 °C temperatūrai un tad sāk samazināties, tas varētu liecināt, ka daļa no savienojumiem līdz ar temperatūras paaugstināšanos pāriet etilacetāta ekstraktā, ko varētu skaidrot ar savienojumu degradāciju. To apstiprina literatūras dati, ka ekstrakcijas temperatūrā lielākā par 100 °C turpina palielināties ekstrakcijas iznākums un polifenolu saturs ekstraktos, bet samazinās polifenolu daudzveidība ekstraktos un palielinās polifenolu degradācijas risks, visbiežāk nevēlama polifenolu oksidācija vai sadalīšanās [196, 197]. Tā rezultātā ekstrakcijas temperatūrās virs 120 °C etilacetāta ekstraktu daudzums palielinās, nepieaugot mērķsavienojumu daudzumam. Ņemot vērā, ka alkšņu mizas pētījumu specifika vērsta tieši uz diarilheptanoīdu saturošu ekstraktu iegūvi, tad citu savienojumu klātbūtne tiek uzskatīta kā piemaisījumi, kas ietekmē mērķsavienojumu īpašības.



3.12. att. Polifenolu savienojumu saturs GSE g·g⁻¹ sausa ekstrakta baltalkšņa (*A. incana*) mizas ASE iegūtos polifenolu saturošos ekstraktos atkarībā no temperatūras

Polifenolu savienojumu saturs baltalkšņa (3.13. attēlā (A)) un melnalkšņa (3.13. attēlā (B)) mizās ir novērtēts atkarībā no mizas anatomiskā sadalījuma iekšējā un ārējā mizā. Zināms, ka bērzu dzimtas, īpaši bērzu sugas kokiem ir noteikts ekstraktvielu sadalījums iekšējā un ārējā mizā, un dažādu individuālu mērķsavienojumu iegūšanas dēļ ir vērts atdalīt iekšējo un ārējo mizu. No bērzu ārējās mizas industriālos apjomos iegūst triterpēnus (betulīnu, lupeolu, betulīnskābi, betulonū u.c.), taukskābes (oleīnskābi, oleīnskābes 3-O-acetātu), bet no iekšējās mizas var iegūt dažādus flavonoīdus (katehīns un tā atvasinājumi u.c) un diarilheptanoīdus (platofilozīdu, akerozīdus u.c) [198]. Alkšņu mizām polifenolu savienojumu sadalījums starp iekšējo un ārējo mizu etilacetāta ekstraktā ir robežās no 0,53 - 0,63 GSE g·g⁻¹ sausa ekstrakta, bet etanola ūdens ekstraktā ir tas ir robežās no 0,60 - 0,68 GSE g·g⁻¹ sausa ekstrakta.



3.13. att. Polifenolu savienojumu saturs GSE g·g⁻¹ sausa ekstrakta (A) – baltalkšņa (*A. incana*), (B) – melnalkšņa (*A. glutinosa*) mizas anatomiskajās daļās

Izmantojot hromatogrāfijas un masspektrometrijas metodes identificēti individuāli polifenolu savienojumi ekstraktos, kas iegūti no nedalītas alkšņu mizas pēc secīgas ekstrakcijas saskaņā ar 2.1. attēlā redzamo shēmu. Rezultāti parādīja, ka alkšņu mizas polifenolu savienojumus, atkarībā no izmantotā šķīdinātāja, galvenokārt veido diarilheptanoīdi un kondensētie tanīni, skatīt 3.2. tabulu.

Kopumā no alkšņu mizu iegūtiem polāriem un vidēji polāriem ekstraktiem, tajos ir identificēti 18 dažādi individuāli savienojumi. Šie savienojumi ir zināmi pasaulē, bet pirmo reizi ir veikta to identifikācija Latvijā augošo alkšņu mizās. Visi identificētie savienojumi, izņemot cukurus ir pierādīti kā bioloģiski aktīvi savienojumi. Šo savienojumu identifikācija ekstraktos dod iespēju tos izmantot atbilstoši to īpašībām, vienlaikus kontrolējot dominējošo savienojumu sastāvu iegūtajos ekstraktos. Kā redzams 3.2. tabulā, salīdzinot alkšņu mizas vidēji polāros un polāros ekstraktus, etilacetāta ekstraktos ir konstatēta dominējošāka diarilheptanoīdus savienojumu daudzveidība, bet etanola vai etanola ūdens ekstraktos dominē kondensēto tanīnu jeb proantocianidīnu savienojumi. Etilacetāta ekstraktos ir identificēti gan diarilheptanoīdi ar vienu cukura atlikumu (oregonīns, hidroksioregonīns u.c.), gan arī ar vairākiem cukura atlikumiem (akerozīds u.c.). Šos savienojumus pasaulē, pateicoties to veselību veicinošajām īpašībām, izmanto gan dažādu uztura bagātinātāju, pat homeopātisko zāļu sastāvā, gan kā kosmētikas produktu sastāvdaļas. Tiem ir pierādīta, cilvēku ādas veselīguma uzlabošanas efekts. Savukārt etanola ūdens ekstraktos ir identificēti proantocianidīni ar polimerizācija pakāpi no 2 līdz pat 6 un šos savienojumus, pēc literatūras datiem, var izmantot gan kā antioksidantus, gan kā kompozītmateriālus [199 - 201].

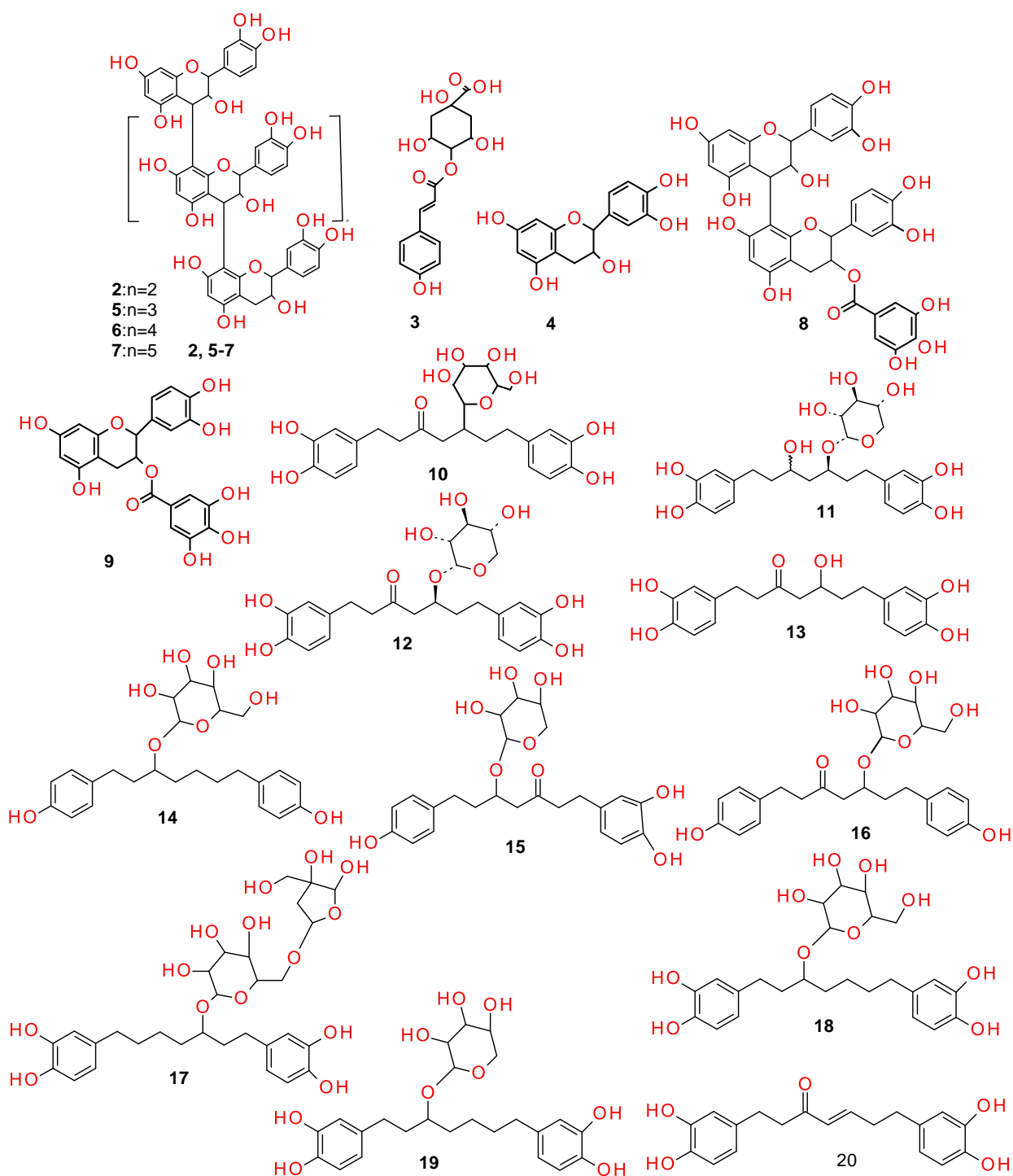
Individuālu polifenolu savienojumu raksturojums alkšņu mizas vidēji polāros un polāros ekstraktos, izmantojot LC-ESI-MS/MS

Nr.	Izdal. laiks, (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmenta joni (m/z)	Provizoriskā identifikācija	Savienojumu ķīmiskā grupa	Esamība ekstraktos				Atsauce
						Etilacetāt	Acetons	Etanols ūdens	Etanols	
1	0,31	683	503; 342; 341; 179	Heksozes	Ogļhidrāti, oligosaharīdi	-	+	+	+	Llorent-Martínez et al 2015
2	2,70	577	451; 425; 407; 289	Proantocianidīna dimērs	Kondensētie tanīni	+	+	+	+	Muilenburg et al 2011
3	2,33	337	191; 163; 119	Kumarilcikloheksāntetrahidroksi- karbonskābe	Organiskās skābes	+	-	-	-	Muilenburg et al 2011
4	2,74	289	245, 205	Katehīna atvasinājums	Flavonoīdi	+	+	+	+	Muilenburg et al 2011
5	2,57	865	695; 577; 451; 425; 407; 289	Proantocianidīna trimērs	Kondensētie tanīni	-	+	+	+	Muilenburg et al 2011
6	2,64	1153	865; 577; 289	Proantocianidīna tetramērs	Kondensētie tanīni	-	+	+	+	Oszmiański et al 2015
7	2,75	1441	1153; 720; 289	Proantocianidīna pentamērs	Kondensētie tanīni	-	+	+	+	Hammerstone et al 1999

3.2. tabulas turpinājums

8	3,09	729	577; 559; 289; 287	(epi)katehīn-(epi)katehīna-O-gallāts	Kondensētie tanīni	-	-	+	+	Hammerstone et al 1999
9	3,73	441	289; 245	(epi)katehīna gallāta atvasinājums	Kondensētie tanīni	-	-	+	+	Hammerstone et al 1999
10	4,10	507	327; 1015	Hirsutenona heksozīds	Diarilheptanoīds	+	+	+	+	Riethmüller et al 2013
11	4,31	479	959	Hidroksioregonīns	Diarilheptanoīds	+	+	+	+	Telysheva et al 2011
12	4,40	477	329; 955	Oregonīns	Diarilheptanoīds	+	+	+	+	Telysheva et al 2011
13	4,98	345	311; 179	Hirsutanolols	Diarilheptanoīds	+	+	+	+	Riethmüller et al 2013
14	5,74	461	311; 923	Akreoziāds	Diarilheptanoīds	+	+	+	+	Riethmüller et al 2013
15	5,88	461	311; 923		Diarilheptanoīds	+	+	+	+	
16	6,15	475	951; 295	Platifilozīds	Diarilheptanoīds	+	+	+	+	Mämmelä et al 2001
17	6,23	625	477; 493; 1251	Diarilheptanoīds	Diarilheptanoīds	+	+	+	+	Riethmüller et al 2013
18	6,32	493	295; 987	Rubranozīds A	Diarilheptanoīds	+	+	+	+	Mämmelä et al 2001
19	6,44	463	331; 927	Rubranola ksilozīds	Diarilheptanoīds	+	+	+	+	Mämmelä et al 2001
20	6,63	327	245	Hirsutenons	Diarilheptanoīds	+	+	+	+	Mämmelä et al 2001

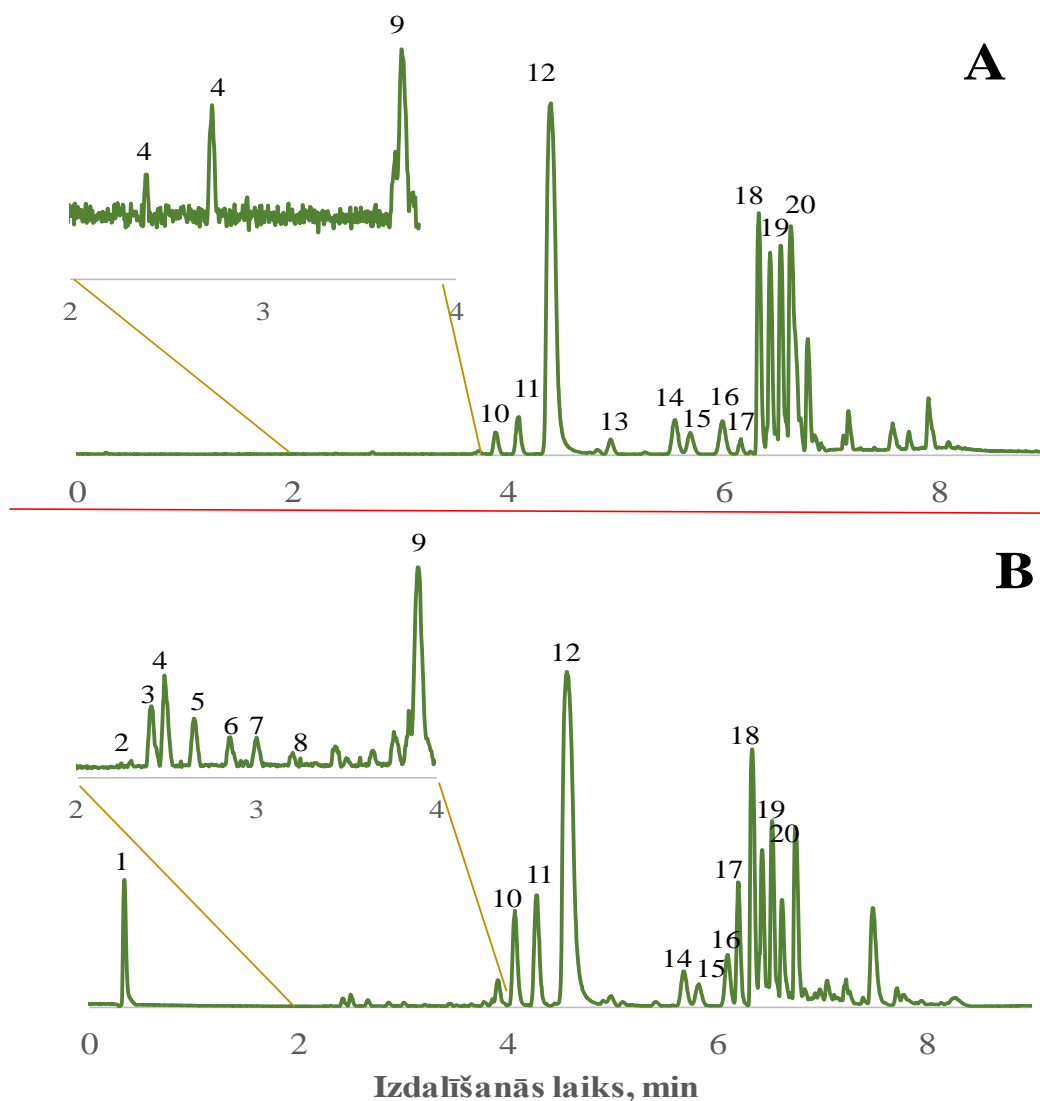
Alkšņu mizās raksturoto individuālo polifenolu savienojumu struktūrformulas dotas 3.14. attēlā un atšifrējumi doti 3.2. tabulā.



3.14. att. Dominējošo savienojumu struktūrformulas alkšņu mizas vidēji polāros un polāros ekstraktos

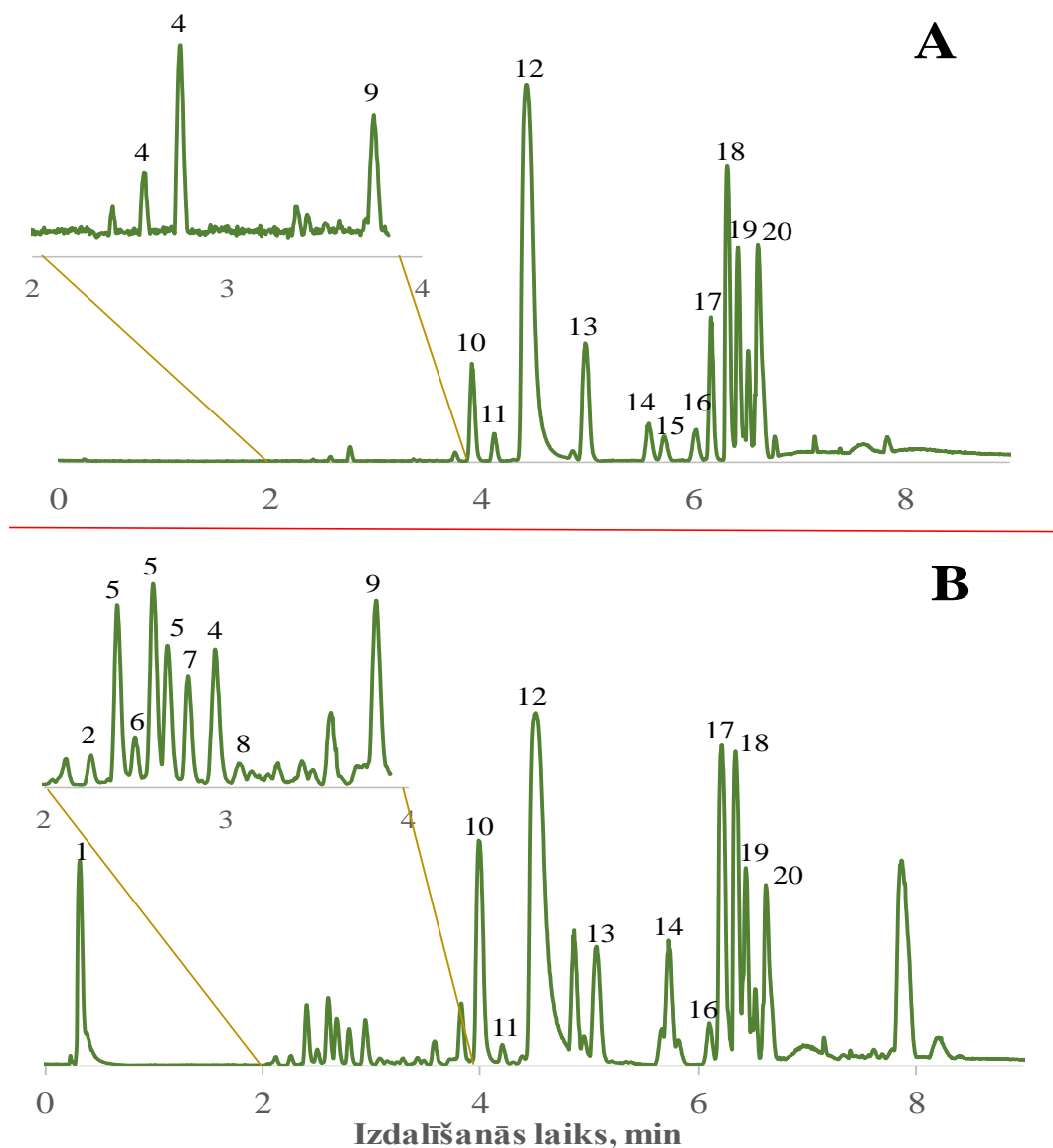
Izmantojot LC-ESI-MS/MS iegūtās kopējo jonu hromatogrammas baltalkšņa un melnalkšņa mizas ekstraktiem, tika izvēlēti savienojumi pēc kuriem veikt alkšņu mizas ekstraktu ķīmiskā sastāva kontroli. Kā redzams 3.15. attēlā (A) baltalkšņa mizas etilacetāta ekstrakta sastāvā

dominē diarilheptanoīdi, bet 60 % etanola ūdens (3.15. attēlā (B)) ekstraktā identificētajos savienojumos novērojama arī izteikta kondensēto tanīnu klātbūtne, ne tikai diarilheptanoīdu.



3.15. att. Baltalkšņa (*A. incana*) mizas (A) - etilacetāta un (B) - 60 % etanola ūdens ekstrakta kopējā jonu hromatogrammas (smaīļu identifikāciju skatīt 3.2. tabulā un 3.14. attēlā)

Salīdzinot baltalkšņa un melnalkšņa mizas polifenolu ķīmiskās kompozīcijas, var redzēt, ka atšķirīgs ir kvantitatīvais savienojumu sastāvs nevis kvalitatīvais. Nelielas izmaiņas kvalitatīvajā sastāvā ir novērojamas tikai piemaisījuma līmenī, melnalkšņa mizas 60 % etanola ūdens ekstrakts (3.16. attēlā (B)) nesatur kumarilhinīnskābi. Oregonīns (12 smaile) ir abu alkšņu sugu mizas hidrofilajos ekstraktos, bet atšķiras relatīvo saturu attiecības oregonīnam un citiem diarilheptanoīdiem.



3.16. att. Melnalkšņa (*A. glutinosa*) mizas (A) - etilacetāta un (B) - 60 % etanola ūdens ekstrakta kopējā jonu hromatogrammas (smaļņu identifikāciju skatīt 3.2. tabulā un 3.14. attēlā)

Ekstraktos tika noteikts oregonīna kvantitatīvais saturs (3.3. tabula) un šis lielums iekļauts arī kā viens no parametriem ekstraktu kvalitātes novērtējumā. Ir pierādīta, ka no Latvijā augošiem alkšņiem izdalītā ar oregonīnu bagātiem ekstraktiem ir izteikta bioloģiskā aktivitāte un pašlaik tiek veikti pētījumi, kas pierāda ekstraktu bioloģiskās aktivitātes atkarību no oregonīna satura tajos. Oregonīna saturs ekstraktos, kas iegūti no vienām un tām pašām baltalkšņa mizām, atkarībā no izmantotā šķīdinātāja un ekstrakcijas metodes variē no 19 % etanola ūdens ekstraktā līdz pat 75 % etilacetāta ekstraktā, bet melnalkšņa mizās no 16 % etanola ūdens ekstraktos līdz 70 % etilacetāta ekstraktā. Macerācijā iegūtajos ekstraktos oregonīna saturs ir gandrīz 10 % mazāks nekā ar citām izmantotajām ekstrakcijas metodēm.

Oregonīna saturs (%) ar standartnovirzēm baltalkšņa un melnalkšņa mizas vidēji polāros un polāros ekstraktos atkarībā no izmantotās ekstrakcijas metodes un šķīdinātāja

Ekstrakts	Oregonīna saturs ekstraktos, %			
	Soksleta	CŠE	ASE	Macerācija
Baltalkšņa miza				
Etilacetāta ekstrakts	63,3 ± 0,9	71,9 ± 1,1	75,1 ± 1,5	55,2 ± 1,7
96 % etanola ekstrakts	20,6 ± 0,4	19,1 ± 0,3	23,0 ± 0,4	15,1 ± 0,3
60 % etanola ūdens ekstrakts	***	22,3 ± 0,4	23,4 ± 0,4	16,2 ± 0,3
Melnalkšņa miza				
Etilacetāta ekstrakts	61,9 ± 0,8	62,7 ± 0,9	69,5 ± 0,8	60,1 ± 1,6
96 % etanola ekstrakts	18,8 ± 0,4	15,4 ± 0,2	20,7 ± 0,3	16,2 ± 0,3
60 % etanola ūdens ekstrakts	***	15,6 ± 0,3	19,1 ± 0,5	13,9 ± 0,4

***Izmantotajā ekstrakcijas metodē nav iespējams strādāt ar šķīdinātāju maisījumiem

Attīstot alkšņu mizas, kā izejvielas vērtīgu produktu ieguvei, izmantošanas iespējas, veikta ķīmisko elementu, kuru saturu kontrole ir obligāta prasība dažādās tautsaimniecības nozarēs. Vajadzīgās vielas no alkšņu mizas tika izdalītas ekstrakcijas procesā, veicot trīspakāpju ekstrakciju. Tomēr ekstrakcijas process līdās mērķsavienojumu ieguvei neizslēdz arī koku mizā esošo piesārņojošo vielu nokļūšanu dabas vielu ekstraktos.

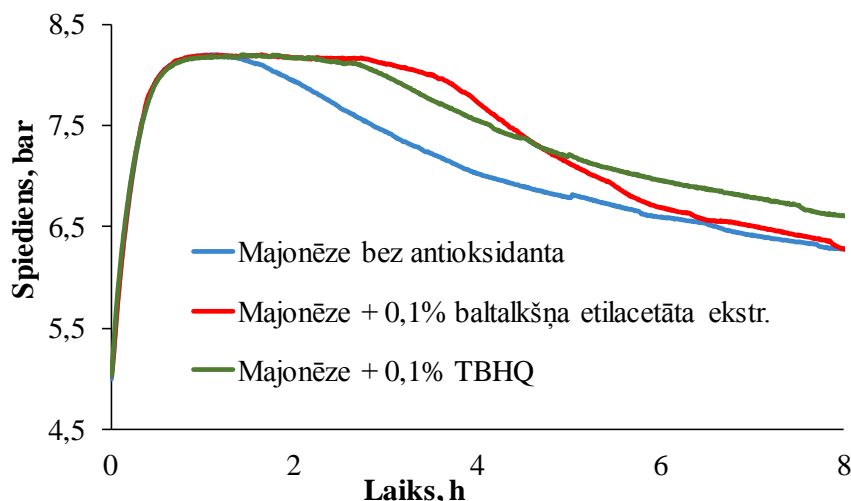
3.2.2. Alkšņu mizas polifenolu saturošu ekstraktu antioksidantā aktivitāte

Pirmo reizi veikti pētījumi par alkšņu mizas diarilheptanoīdu ietekmi uz majonēzes stabilitāti pret oksidēšanos. Ievadot no baltalkšņa mizas izdalītu diarilheptanoīdus saturošu ekstraktu ar 75 % oregonīna saturu majonēzes sistēmā, kura sastāv no 65 % rapšu eļļas, pat tikai 0,05 % koncentrācijā, majonēzes stabilitāte palielinās gandrīz divas reizes salīdzinājumā ar majonēzi bez piedevām (skatīt 3.4. tabulu). Iegūtie rezultāti parāda, ka no baltalkšņa mizas iegūts diarilheptanoīdus saturošs ekstrakts uzrāda labākas stabilizējošās īpašības par majonēzēm, kurām ir pievienots konservants E202 (kālija sorbāts) un E385 (kalcijs dinātrijs etilēndiamīntetraacetāts).

No baltalkšņa mizas izdalītā diarilheptanoīdu saturoša ekstrakta kā antioksidanta ievadišana dažādās majonēzes sistēmās

Piedevas	Piedevu saturs, %	Indukcijas periods, h	Aizsardzības faktors
Bez piedevas	0	1,2	1
TBHQ	0,1	1,8	1,5
Baltalkšņa mizas etilacetāta ekstrakts	0,1	3,5	2,9
E202	0,2	3,1	1,6
E202/E385	0,2/0,01	3,3	1,7

Salīdzinājumā ar sintētisko antioksidantu TBHQ izmantojamās majonēzēs parāda, ka diarilheptanoīdiem ir labāka stabilizēšanas spēja par TBHQ, E202 un E202/E385. Baltalkšņa mizas etilacetāta ekstrakta kā piedevas majonēzē, TBHQ kā piedevas majonēzē un majonēzes bez piedevām oksidēšanās līknes parādītas 3.17. attēlā.



3.17. att. Baltalkšņa (*A. incana*) mizas etilacetāta ekstrakta un sintētiskā antioksidanta TBHQ kā piedevas majonēzes sistēmā oksidēšanās līknes 120 °C temperatūrā

Pētījumu rezultāti parāda ka no baltalkšņa mizas iegūtu ekstraktu ievadīšana pārtikas sistēmās kā majonēzes vai citās līdzīgas pārtikas sistēmas palielina to uzglabāšanas ilgumu un aizstāj sintētiskās piedevas ar dabiskas izcelsmes piedevām. Vienlaikus ekstrakti uzrāda augstu antioksidanto aktivitāti testos ar stabiliem radikāļiem kā, ABTS^{•+} un DFPH[•] un iegūtās IK_{50} vērtības (3.5. tabula) parāda, ka tie uzrāda tuvu un pat labāku antioksidanto aktivitāti salīdzinājumā ar sintētiskajiem antioksidantiem un plaši zināmo veselību veicinošo līdzekli kurkumīnu.

3.5. tabula

Alkšņu mizas etilacetātu ekstraktu, sintētisko antioksidantu un attīrīta ekstrakta, antioksidantās aktivitātes (IK_{50}) novērtējums ar standartnovirzēm, izmantojot ABTS^{•+} un DFPH[•] testus

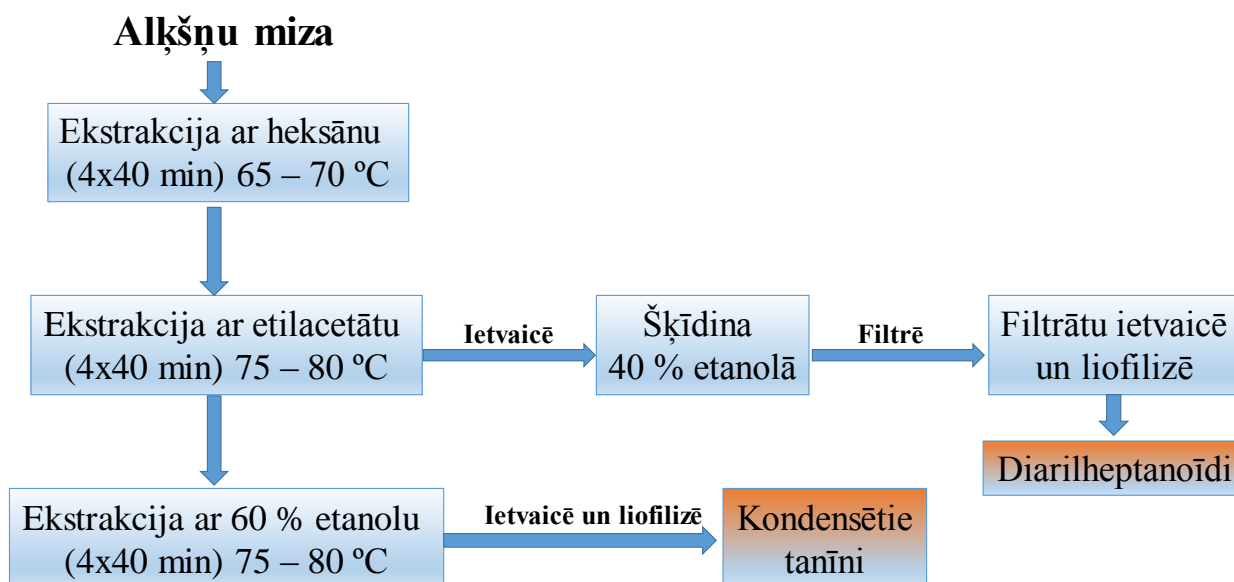
Paraugs	IK_{50} , mg·L ⁻¹	
	ABTS ^{•+}	DFPH [•]
Oregonīns	2,93 ± 0,12	4,7 ± 0,2
Baltalkšņa mizas etilacetāta ekstr.	3,14 ± 0,13	5,52 ± 0,16
Melnalkšņa mizas etilacetāta ekstr.	3,32 ± 0,14	6,16 ± 0,15
Kurkumīns	2,51 ± 0,12	12,7 ± 0,2
Troloks	4,01 ± 0,12	4,72 ± 0,12
TBHQ	2,75 ± 0,12	3,12 ± 0,13

Alkšņu ekstraktus saturoši dažādi veselību veicinoši produkti ir specifiski nišas produkti, kas tiek iegūti pēc pieprasījuma. Latvijas tirgū alkšņu saturoši preparāti, piemēram, melnalkšņa pumpuru ekstrakts uztura bagātinātāja veidā lietošanai arteriālo un perifēro asins cirkulācijas traucējumu gadījumos tiek importēts no Rumānijas. Pašlaik Latvijā augošo alkšņu mizas ekstrakti, izdalīti laboratorijas mērogā LV KĶI, tiek izmantoti uztura bagātinātāja un kosmētisko krēmu ieguvē, tie ir pieejami Latvijas tirgū tikai nesen, tādejādi šo produktu ieguves pamatā ir promocijas darbā izstrādāta un pielāgota, efektīva metodika šo savienojumu ieguvei.

3.2.3. Alkšņu mizas ekstraktu procesu mērogošana

Pamatojoties uz pētījumu rezultātiem, saistītu ar ekstrakcijas metožu un parametru ietekmi uz polifenolu savienojumu izdalīšanu no alkšņu mizām, tika izstrādāta diarilheptanoīdu saturoša alkšņu mizas ekstrakta iegūšanas metodika/protokols (3. pielikums)

Tā kā alkšņu mizām tiek veikta secīga ekstrakcija, ir izstrādāta ekstrakcijas shēma (3.18. attēls). Darbs ir orientēts uz polifenolu savienojumu ieguvei, ar uzsvāru uz diarilheptanoīdiem, tādēļ nepolārā heksāna ekstrakta ķīmiskais sastāvs netiek tuvāk apskatīts, bet arī šis ekstrakts satur bioloģiski aktīvas vielas, galvenokārt triterpēnus [202], kurus plaši izmanto, piemēram, kosmētikas industrijā.



3.18. att. Ekstrakcijas shēma diarilheptanoīdu un kondensēto tanīnu iegūšanai

Izmantojot izstrādāto ekstrakcijas metodiku (ekstrakcijas režīmi, izmantojamo šķīdinātāju tilpumi un izejvielas proporcijas utt.) mērķsavienojumu iegūšanai veikta procesu mērogošanu L.E.V. rūpnīcā. Mērogotas visas ieguves stadijas un risināti problēmjaucājumi, kā šķīdinātāju izvēle to izmantošanas drošībai lielos apjomos. Tika veikta ekstrakcijas metodikas pielāgošana

rūpnieciskiem apjomiem ekstrakcijas uzņēmumā L.E.V., samazinot šķīdinātāju patēriņu (attiecība miza : šķīdinātājs = 1 : 5 tika samazināta uz 1 : 3).

3.3. Polifenolu savienojumu ekstrakcija no priedes koksnes

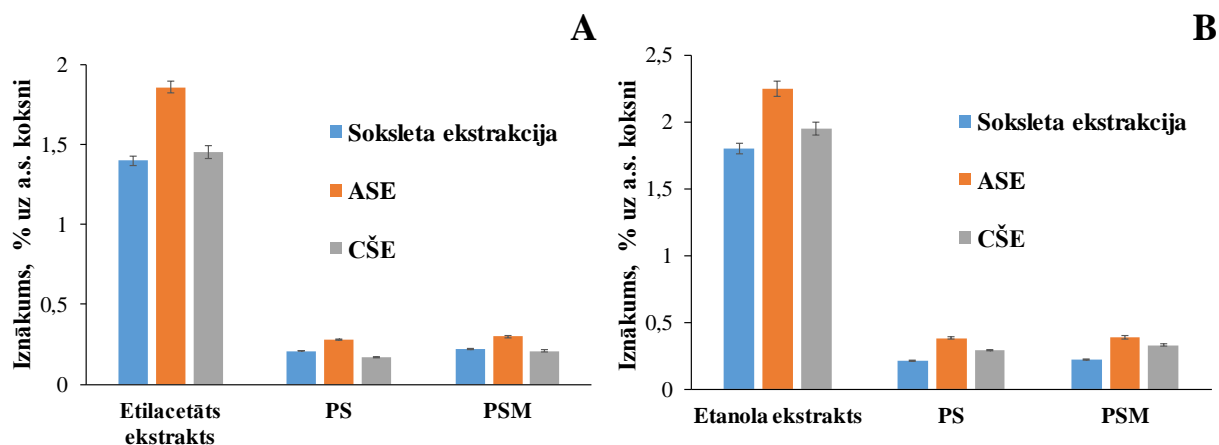
Pēdējos gados pasaulē ir aktualizējušies pinosilvīnu savienojumu pētījumi. Ir pierādīts, ka tie ir bioloģiski vērtīgi savienojumi, kurus var izmantot, piemēram, kā antibakteriālus, oksidatīvā stresa samazinošus līdzekļus un cilvēka vēža šūnu augšanu inhibējošus, asinsvadu, zarnu trakta, aknu slimību ārstējošus līdzekļus [50, 203]. Pinosilvīni ir zemmolekulāri augu polifenoli, kas koncentrējas Priežu dzimtas koku kodolkoksnē un atzarojumu vietu koksnē [191], pēc ķīmiskās struktūras tie pieder stilbēnu savienojumu grupai. To saturs augu izejvielās ir atkarīgs no dažādiem faktoriem kā, piemēram, ģenētikas, pesticīdu vai minerālmēslojuma izmantošanas, klimata un augšanas apstākļiem u.c [203]. Tāpēc ir svarīgi noteikt perspektīvākās ar pinosilvīnu savienojumiem bagātākās priedes koku izplatības arsenālus un morfoloģiskās daļas, kurus varētu izmantot kā izejas materiālu pinosilvīnu iegūšanai. Pinosilvīnu iegūšanai no Latvijas priežu resursiem ir nozīmīga perspektīva, jo priedes ieņem vadošo vietu Latvijas ekonomikā un ir plaši izplatīti koki Latvijas teritorijā (29 % no meža kopplatības). Tas būs pieejams resurss un ņemot vērā ražošanas klastera iespējamo izveidošanu par priedes koksnes pārstrādi, kurā piedalīsies arī mazie ražotāji, kas izmanto nekondīcijas stumbra koksni un atliekas, kā arī vidējie uzņēmumi (piem., koka logu un durvju ražotāji, kuriem ieaugušie zari ir ražošanas atliekas) ražojot izstrādājumus ar lielu pievienoto vērtību, to ražošanas atliekas varēs sekmīgi izmantot kā izejvielu pinosilvīnu ražošanai. Pētījumi dos ekonomisku un sociālu efektu: jaunas darbavietas un produkciju, kas veicinās iedzīvotāju atveseļošanu un apkārtējās vides stāvokļa uzlabošanu.

Pinosilvīns un pinosilvīna monometilēteris, kuri ir dominējošie stilbēnu savienojumi priedes koksnē, tiem ir pierādīta veselību veicinoša iedarbība. Tie ir resveratrola, zināma medicīnas preparāta (sirds slimībām, Alcheimera slimības u.c. slimību ārstēšanai) analogi, kuriem piemīt pretmikrobu un antibakteriālā aktivitāte, antimetastatiskā un pretiekaisuma, kā arī antioksidantā aktivitāte.

3.3.1. Ekstrakcijas metodes un šķīdinātāja ietekme uz pinosilvīnu savienojumu saturu priedes koksnes izdalītos ekstraktos

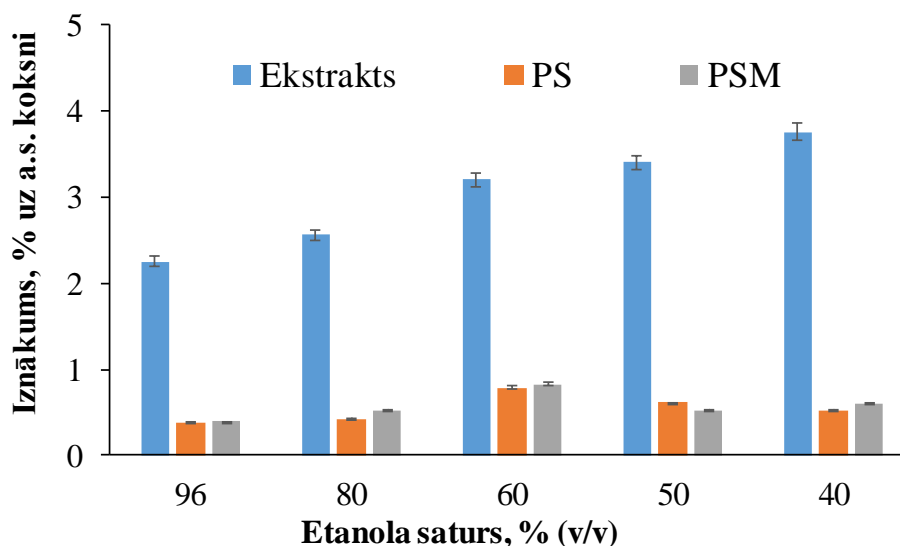
Priedes kodolkoksnes paraugiem tika izmantotas trīs dažādas ekstrakcijas metodes: klasiskā Soksleta ekstrakcija, CŠE un paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija (ASE). 3.19. attēlā ir parādīts, ka ASE metode salīdzinājumā ar pārējām divām pētījumā izmantotajām metodēm ir

visefektīvākā, iegūstot lielāku pinosilvīna (PS) un pinosilvīna monometilētera (PSM) iznākumu.



3.19. att. Soksleta, ASE un CŠE no priedes kodolkoksnis iznākumu salīdzinājums (%) polārām ekstraktvielām, kas iegūtas ar (A) - etilacetātu, (B) – 96 % etanolu un pinosilvīnu (PS un PSM) saturu tajās, daļiņu izmērs < 0,4 mm

Sākumā tika veikta paraugu ekstrakcija ar heksānu lipofīlo savienojumu atdalīšanai. ASE palielina hidrofilo ekstraktvielu iznākumus par ceturto daļu salīdzinājumā ar Soksleta ekstrakciju un CŠE metodi. Meklējot optimālos apstākļus, maksimālai pinosilvīna (PS), un pinosilvīna monometilētera (PSM) iegūšanai tika optimizēta šo savienojumu izdalīšanas metode, mainot etanola ūdens saturu (96; 80; 60; 50; 40 %). Pēc iegūtajiem rezultātiem tika konstatēts (skatīt 3.20. attēlu), ka vispiemērotākie apstākļi PS un PSM iegūšanai ir ekstrakcijai ar 60 % etanola ūdens šķīdumu 90 °C temperatūrā.



3.20. att. Polāro ekstraktvielu, PS un PSM iznākums (%) kodolkoksnis paraugos atkarībā no izmantotās etanola ūdens daudzuma, daļiņu izmērs < 0,4 mm

Pinosilvīna un tā atvasinājumu izdalīšana tika veikta pēc divām ekstrakcijas shēmām: 1) secīga ekstrakcija: heksāns → 60 % etanola ūdens šķīdums un 2) vienpakāpes ekstrakcija ar 60 % etanola ūdens šķīdumu. Turpmākai pinosilvīnu iegūšanai no priedes kodolkoksnes tika izmantota paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija, kā optimālākā ekstrakcijas metode un secīga ekstrakcija: heksāns → 60 % etanola ūdens šķīdums. Paralēli ekstrakcijas apstākļu optimizācijai laboratorijas apstākļos, tika veikta arī pinosilvīna un tā atvasinājumu ekstrakcijas mērogošana L.E.V. uzņēmumā, par kritēriju izmantojot mērķsavienojumu saturu ekstraktos. Lai samazinātu pinosilvīnu iegūšanas laiku un šķīdinātāju patēriņu tika veikts vienpakāpes un divpakāpju ekstrakciju efektivitātes salīdzinājums (skatīt 3.6. tabulu). Priedes kodolkoksnes paraugs (daļiņu izmērs $\leq 0,4$ mm, ņemts 0,5 m augstumā no augsnes virskārtas, mitrajos mežos) tika sadalīts 2 daļās un ekstrahēts pēc abām shēmām: vienpakāpes ar 60 % etanola ūdens šķīdumu (90 °C, 15 min) un divpakāpju ekstrakciju heksāns (90 °C, 15 min) → 60 % etanola ūdens (90 °C, 15 min). Izmantojot vienpakāpes ekstrakciju ar 60 % etanola ūdens šķīdumu iegūst lielāku ekstrakta daudzumu, bet ar divreiz mazāku pinosilvīnu un pinosilvīna monometilētera saturu tajos.

3.6. tabula

Priedes kodolkoksnes vienpakāpes un divpakāpju ekstrakcijas iznākumi (%) ar standartnovirzēm

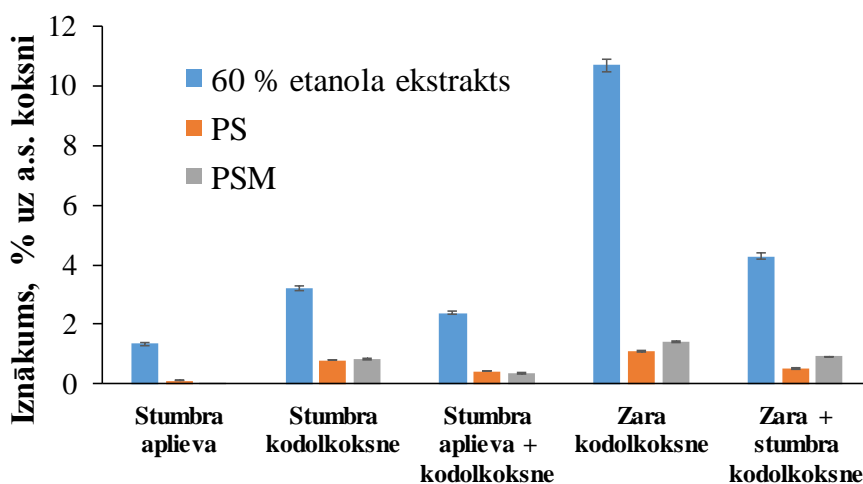
Ekstrakcija	Ekstrakcijas iznākums	Pinosilvīns (PS)		Pinosilvīna monometilēteris (PSM)	
		Ekstraktā	Paraugā	Ekstraktā	Paraugā
1. pakāpju ekstrakcija (60 % etanols ūdens)	7,8 ± 0,2	10,1 ± 0,2	0,78 ± 0,02	12,5 ± 0,2	0,96 ± 0,02
2. pakāpju ekstrakcija (heksāns - 60 % etanols ūdens)	3,21 ± 0,13	24,7 ± 0,4	0,79 ± 0,02	25,9 ± 0,4	0,83 ± 0,02

Izmantojot divpakāpju ekstrakciju, no sākuma atdalot lipofīlās ekstraktvielas ar heksānu, pinosilvīnu saturoša ekstrakta daudzums samazinās gandrīz divas reizes, bet proporcionāli divas reizes palielinās pinosilvīnu saturs ekstraktā. Neizmantojot ekstrakciju ar heksānu mazpolārie savienojumi, kas secīgā ekstrakcijā atdalītos kā lipofīlā frakcija pāriet 60 % etanola ūdens ekstraktā, palielinot ekstrakcijas iznākumu, bet samazinot pinosilvīnu tīrību. Secīgas ekstrakcijas izmantošana ir ieteicama, lai iegūtu tīrākus pinosilvīnu saturošus ekstraktus un nebūtu nepieciešama papildus attīrīšana no savienojumiem, kas apgrūtina tālāku pinosilvīnu analīzes un izmantošanas iespējas. Izmantojot tiešu ekstrakciju ar 60 % etanola ūdens šķīdumu ir apgrūtināta ekstrakta iegūšana sausā veidā, tajā esošie piemaisījumi padara to par sveķiem līdzīgu cietvielu. Ekstrakcijas rezultāti parāda, ka veicot secīgu ekstrakciju, pietiekoši liels

ekstraktvielu iznākums tiek iegūts ar etilacetātu, bet kā ir parādīts tālāk darbā mērķsavienojumu stilbenoīdu ieguvei tas nav piemērotākais šķīdinātājs, to apstiprina arī citu zinātnieku pētījumi [50, 203].

3.3.2. Pinosilvīnu saturoša ekstrakta, PS un PSM saturs atkarībā no priedes morfoloģiskās daļas, paraugu sagatavošanas un augšanas vietas

Pinosilvīna un pinosilvīna monometilētera saturs ir atšķirīgs dažādās priedes koksnes morfoloģiskajās daļās. Tādēļ svarīga ir pareiza priedes koksnes parauga sagatavošana, jo ekstrakcijas iznākums no koksnes mainās vairāk kā uz pusi un attiecīgi arī pinosilvīnu saturs ekstraktos, līdz ar to būtiski ietekmējot ekstraktu tālāku izmantošanu. Pēc parauga sadalīšanas pa sastāvdaļām (skatīt 3.21. att.) var secināt, ka lielāko daļu pinosilvīnu ir zaru koksne, kas ir ieaugušo zaru koksne, bet paralēli pinosilvīnu daudzuma pieaugumam, palielinās arī kopējais ekstraktvielu daudzums. Hidrofīlo (60 % etanola ūdens) ekstraktvielu iznākums dažādās priedes koksnes daļās variē no 1,8 % aplievā līdz pat 10,4 % ieaugušo zaru koksne.



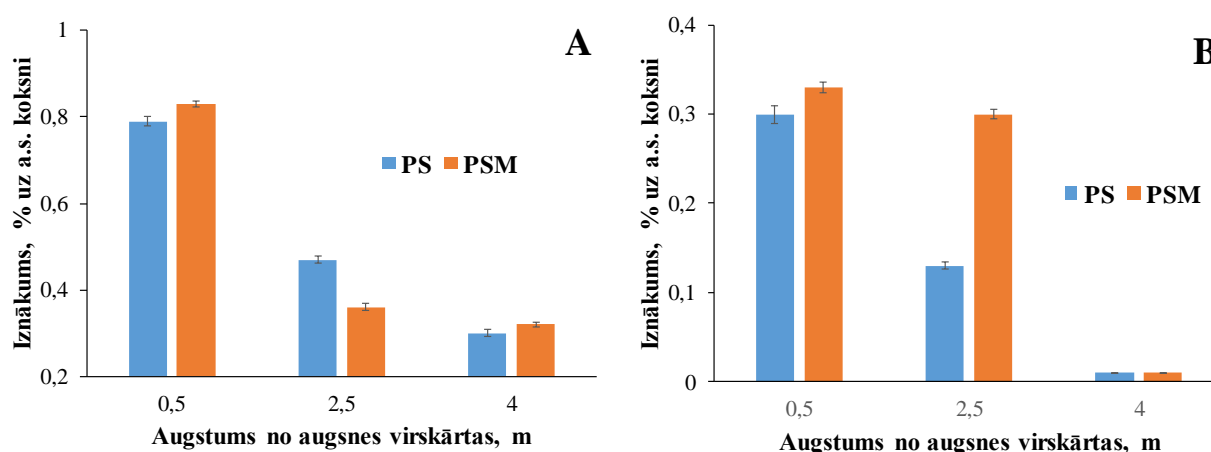
3.21. att. Ekstraktvielu, PS un PSM saturs dažādās priedes koksnes daļās, daļiņu izmērs < 0,4 mm

Lai gan zaros ir visvairāk pinosilvīnu, tie satur arī vairāk piemaisījumu, tai skaitā arī citus polifenolu savienojumus (skatīt 3.7. tabulu). Vislielākais relatīvais pinosilvīna savienojumu daudzums priedes dažādu morfoloģisko daļu polārajos ekstraktos, kas izdalīti secīgā ekstrakcijā (heksāns → 60 % etanola ūdens šķīdums) ir priedes kodolkoksne (~ 50 %, uz a.s. ekstraktu), kā arī otrais lielākais polifenolu savienojumu saturs (3.7. tabula), kas dod papildus bioloģisko aktivitāti. Turpmāk lielāka uzmanība tiks pievērsta tieši hidrofilajiem ekstraktiem, jo stilbēnus (pinosilvīnu, pinosilvīna monometilēteri) satur galvenokārt 60 % etanola ūdens ekstrakts.

Kopējais polifenolu savienojumu saturs (GSE) priedes koksnes dažādās morfoloģiskajās daļās ar standartnovirzēm

Paraugs	Kopējie polifenoli (GSE, g·100 g ⁻¹ ekstrakta)
Stumbra aplieva	12,1 ± 0,2
Stumbra kodolkoksne	43,1 ± 0,6
Stumbra aplieva + kodolkoksne	30,9 ± 0,5
Zara kodolkoksne	55,7 ± 1,1
Zara + stumbra kodolkoksne	40,0 ± 0,5

Izanalizējot 60 dažādu priedes morfoloģisko daļu koksnes paraugus, kuri ņemti dažādos augstumos no mitrā mežā (skat. 3.22. att. (A)) un sausā (skat. 3.22. att. (B)) mežā augošām priedēm redzam, ka mitrajos mežos augušas priedes kodolkoksne (~ 60. gadus veci koki) satur vairāk pinosilvīna un tā atvasinājumus salīdzinot ar sausos apstākļos augošām priedēm. Tā pat arī atkarībā no augstuma mainās polāro ekstraktvielu daudzums, kas iegūts secīgas ekstrakcijas rezultātā, tas samazinās pieaugot augstumam no augsnes virskārtas (skatīt 4. pielikumu).



3.22. att. Pinosilvīnu saturs priedes kodolkoksne atkarībā no koksnes parauga ievākšanas augstuma un vietas, A - mitrie meži, B - sausie meži, daļiņu izmērs < 0,4 mm

Pinosilvīnu daudzums priedes kodolkoksne, kuras augušas mitrajos mežos un ir 90 gadus vecas ir mazāks salīdzinot ar kodolkoksni, kura iegūta no 60 gadus vecām priedēm mitrajos mežos (3.8. tabulā). Paraugi tika ņemti dažādos koka augstumos (0,5; 2,5 un 4 m): lielākais pinosilvīnu savienojumu saturs, kā jau iepriekš noskaidrots, ir līdz 0,5 m augstumā no augsnes virskārtas. Detalizētākiem pētījumiem, kā analizējamie paraugi, tika izvēlēti Latvijā, mitrajos mežos augošas parastās priedes (*P.Sylvestris*) kodolkoksne 0,5 metru augstumā no augsnes virskārtas. Parauga izvēle pamatojās uz rezultātiem, ka mitrajos mežos augušas priedes kodolkoksne satur vairāk pinosilvīna un tā atvasinājumus. Kodolkoksnes paraugi tika izmantoti no divām dažāda vecuma priedēm (90 un 60 gadus vecas), kuras augušas Amatas un Engures novada mitrajos mežos. Lai saglabātu bioloģiski aktīvu savienojumu īpašības visi paraugi pēc sasmalcināšanas

turēti saldētavā (-20 °C). PS un PSM attīrīšanai tika izmantota preparatīvā hromatogrāfija, bet kvantitatīvai noteikšanai augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija (HPLC-FLD-DAD). Pinosilvīnu daudzums kodolkoksnē no priedēm, kuras augušas mitrajos mežos un ir 90 gadus vecas ir mazāks nekā kodolkoksnē, kura iegūta no 60 gadus vecām priedēm mitrajos mežos (3.8. tabula).

3.8. tabula

Pinosilvīna un pinosilvīna monometilētera daudzums (%) ar standartnovirzēm parastās (*P. sylvestris*) priedes kodolkoksnē

Kodolkoksne	PS, %	PSM, %
Priede 90 gadi	0,48 ± 0,02	0,38 ± 0,02
Priede 60 gadi	0,79 ± 0,03	0,83 ± 0,03

Pinosilvīnu daudzumu atšķirību abos kodolkoksnes paraugos varētu skaidrot ar augšanas vietas un koka vecumu starpību, vai arī ar atšķirīgiem koku stresa līmeņiem. Ir pierādīts, ka, piemēram, stress, kas izraisīts koku apstrādājot ar ozonu, vai dažādu mizas mehānisko bojājumu vai sēnīšu infekcijas gadījumā, tiek sintezēti priedē pinosilvīni, kā arī stresa stāvoklī enzīms pinosilvīna 3-O-metiltransferāze kokos esošo pinosilvīnu pārvērš par pinosilvīna monometilēteri [204].

Pinosilvīna un pinosilvīna monometilētera saturs kodolkoksnē, kas iegūta no Latvijā augošām priedēm tika salīdzināts ar šo savienojumu daudzumu Slovēnijā augušu priežu kodolkoksnē. No Slovēnijas iegūtu identisku paraugu analīžu rezultāti parādīja, ka Latvijā augušās priedes kodolkoksnē ir gandrīz trīs reizes vairāk pinosilvīna un tā monometilētera (0,79 % un 0,86 % no sausas koksnes) nekā Slovēnijas parastās priedes kodolkoksnē (0,28 % un 0,30 % no sausas koksnes).

Darbā novērtēta pinosilvīna savienojumu satura variācija starp kokiem, veicot skrīningu 30 mitrajos mežos augušiem priedes kokiem (~ 60 gadus veciem). Pinosilvīnu saturs secīgas ekstrakcijas gaitā no priedes kodolkoksnes iegūtos polāros ekstraktos variē no koka uz koku. Priedes kodolkoksnes 60 % etanola ūdens ekstraktos pinosilvīns variēja no 14 % līdz 25 % un pinosilvīna monometilēteris no 16 līdz 30 %.

3.4. Priedes koksnes ekstraktvielu ķīmiskais raksturojums

No priedes kodolkoksnes un atzarojumu vietu koksnes izdalītiem ekstraktiem, sadarbībā ar Abo Akadēmiju Somijā (PinoBio projekta sadarbības partneris), analizēts ķīmiskais sastāvs. Izmantojot savienojumu grupu analīzi noteikts no priedes koksnes izdalītā ekstrakta

pamatsastāvs (skatīt 3.9. tabulu), tai skaitā pinosilvīna (PS) un pinosilvīna monometilētera (PSM) saturs.

3.9. tabula

Priedes kodolkoksnes un atzarojumu vietu koksnes hidrofilo ekstraktvielu sastāvs (%) ar standartnovirzēm ekstraktā

Savienojumu grupa	Kodolkoksne	Atzarojumu vietu koksne
	60 % etanola ekstraktā	60 % etanola ekstraktā
Cukuri	6,72 ± 0,13	1,64 ± 0,12
Taukskābes	1,20 ± 0,02	0,40 ± 0,01
PSM	25,9 ± 0,5	12,1 ± 0,3
Sveķskābes	6,7 ± 0,2	8,8 ± 0,2
PS	24,7 ± 0,4	5,34 ± 0,14
Lignāni	2,00 ± 0,11	13,0 ± 0,2
Steroli	0,70 ± 0,02	1,27 ± 0,13
Sterilesteri	1,30 ± 0,03	2,03 ± 0,12
Triglicerīdi	zem detektēšanas robežas	1,56 ± 0,12

Priedes kodolkoksnes hidrofilo ekstraktu veido 50,6 % pinosilvīns un tā monometilēteris, savukārt priedes atzarojumu vietu koksni tikai 17,4 %, bet ņemot vērā ekstraktu iznākumu var redzēt, ka no kodolkoksnes iegūst mazāku ekstrakta daudzumu (kodolkoksne 3,2 %, atzarojumu vietu koksne 10,7 %), bet ar lielāku pinosilvīna savienojumu saturu salīdzinājumā ar atzarojumu vietu koksni. Atzarojumu vietu koksnes ekstrakti satur vairāk piemaisījumus kā sveķskābes, sterolus, sterilesterus un triglicerīdus, pēdējos kodolkoksne nesatur. Atzarojumu vietu koksnes ekstraktos lielu daļu ieņem lignāni 13 %, kodolkoksne turpretī tikai 2 %.

Lignāni kopā ar pinosilvīna savienojumiem hidrofilajam ekstraktam dod pievienoto vērtību, jo ir stipri antioksidanti, tādejādi iegūtie kodolkoksnes ekstrakti izrāda gan antibakteriālo, gan antioksidanto aktivitāti. Izņemot stilbenoīdus priedes kodolkoksnes ekstrakti satur arī cukurus, taukskābes un citas skābes.

Antioksidantās aktivitātes novērtēšanai tika izmantota ABTS^{•+} radikāļa inhibēšanas metode. Izvērtējot rezultātus no priedes dažādām morfoloģiskām daļām iegūtiem polāriem ekstraktiem var secināt, ka antioksidantā aktivitāte visiem analizētajiem priedes koksnes paraugiem bija tuva vai lielāka nekā sintētiskajam antioksidantam troloksam. Pinosilvīna un pinosilvīna monometilētera daudzums korelēja ar antioksidanto aktivitāti. Vislielāko antioksidanto aktivitāti (3,21 mg·L⁻¹) uzrādīja priedes kodolkoksnes 60 % etanola ūdens ekstrakts un tas korelēja ar pinosilvīna un tā monometilētera saturu ekstraktā. Pinosilvīns un tā atvasinājumi ir spēcīgi antioksidanti, bet izvērtējot ekstraktu antioksidantās īpašības pēc visiem veiktajiem testa rezultātiem var secināt, ka aktivitāti palielina arī citi ekstraktā esošie savienojumi.

3.5. Priedes koksnes rūpnieciskie atlikumi kā pinosilvīnu ieguves avots

Ievērojot biorafinēšanas koncepciju, kur viena procesa blakusprodukts ir izejviela citam procesam, ir novērtēta priedes koksne, kura iegūta priedes koksnes mehāniskās apstrādes procesā ražojot koka logu rāmjus. Paraugi tika iegūti no divām dažādām ražotnēm (skatīt 3.10. tabulu).

3.10. tabula

Pinosilvīnu un kopējo polifenolu savienojumu saturs (%) ar standartnovirzēm priedes koksnes rūpnieciskajos paraugos

Nr.	PSM uz a.s. koksni	PS uz a.s. koksni	Kopējie polifenoli (GSE, g/100g ekstrakta)
1	0,91 ± 0,02	0,51 ± 0,02	38,6 ± 0,8
2	1,11 ± 0,02	0,94 ± 0,02	51,4 ± 0,9

Ir paredzēts, ka priedes koksnes materiāli, kuri tiek izmantoti koka logu rāmju ražošanā, tiks izmantoti kā izejviela pinosilvīna ieguvei. Papildus arguments šādai izmantošanai ir Latvijas komerciālo ražotāju izmantotās koksnes raksturojums. Īpaši izmantotās koksnes kvalitātes atbilstība A kategorijai un koksnei atbilstošais FSC sertifikāts. Šis pēdējais raksturojums pamatojas uz starptautiskiem meža apsaimniekošanas kritērijiem un principiem [207]. Prasības koksnei, kura ir paredzēta logu rāmju ražošanai atbilst Latvijas *Pinus Sylvestris* koksnes raksturojumam, kas tika noteikts pētījumā kā vispiemērotākā koksne pinosilvīnu ieguvei ar labu iznākumu. Kā perspektīvākais izejas materiāls pinosilvīna un tā atvasinājumu iegūšanai ir rūpnieciskās pārstrādes blakusprodukti no priedes koka loga rāmju ražošanas tos uzreiz samaļot, jo tādā veidā tiek iegūts ekstrakts ar vislielāko pinosilvīnu saturu (52 %) un ekstrakcijas iznākumu lielāku par 4 %. Paralēli tam tiek ietaupīts laiks un izmaksas, jo nav nepieciešama izejas materiāla priekšapstrāde. Svarīgi, ka izejviela (pēc logu rāmju ražošanas) ir pieejama cauru gadu un ir sertificēta, ar nepieciešamām īpašībām.

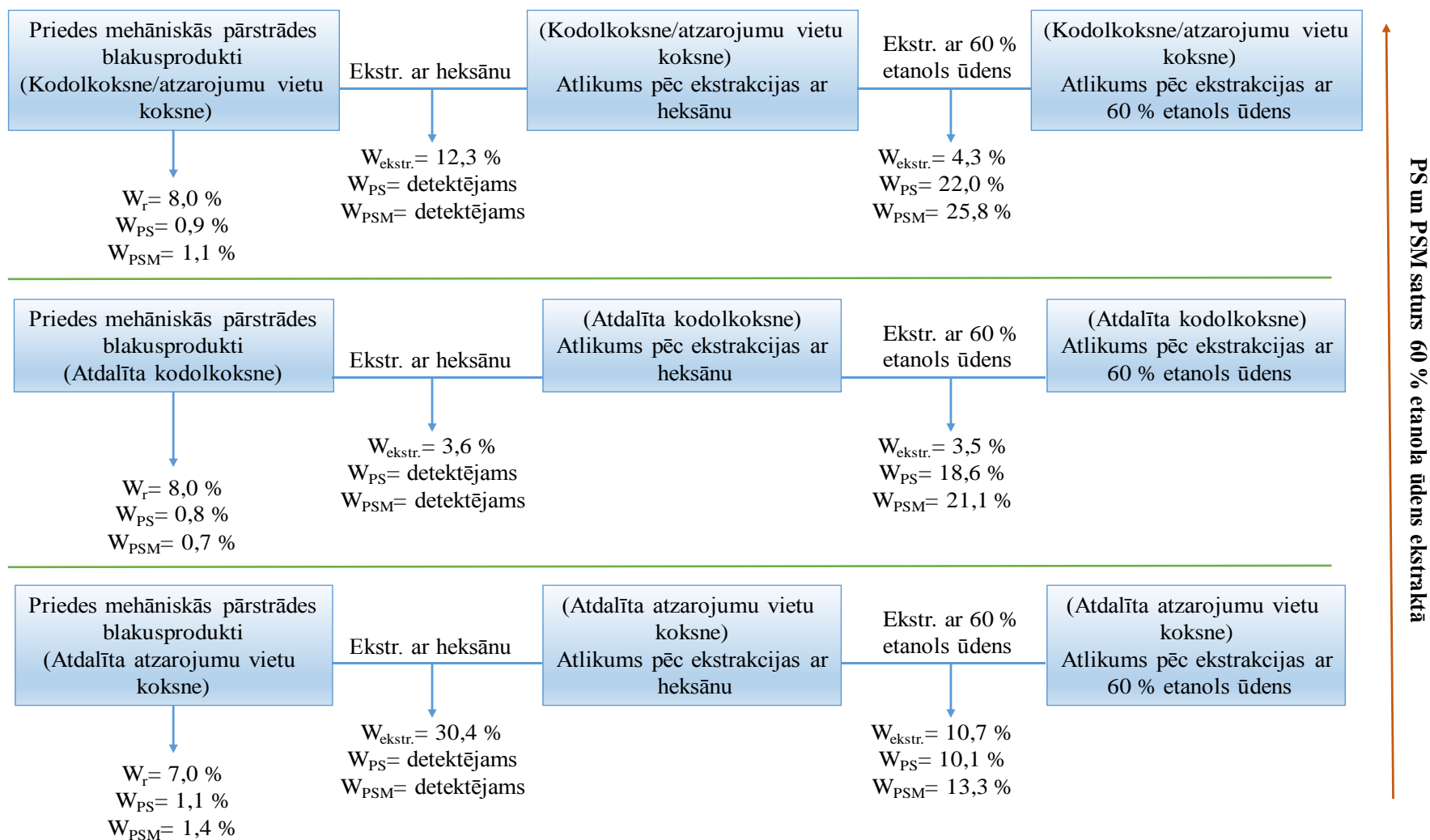
Prasības koksnei, kura ir paredzēta logu rāmju ražošanai, atbilst raksturojumam, kas tika noteikts pētījumā kā vispiemērotākā koksne pinosilvīnu ieguvei ar lielu iznākumu. Šis raksturojums ietver koka vecumu: 60 - 90 gadus veci koki, paraugu ieguves vietu: attālums no koka lejas un ieteicamo kodolkoksnes un atzarojumu vietu koksnes izmantošanu. Salīdzināšanai, spriežot pēc logu rāmju ražošanai izmantojamo priedes koku raksturojuma apraksta, vispiemērotākie ir 60 - 80 gadus veci koki, ieteicamā koka daļa ir stumbrs no koka lejas līdz koka stumbra 6 m augstumam, izmantotie priedes baļķi pirms tālākas apstrādes nedrīkst saturēt aplievu un atzarojumu vietu koksni.

Priedes rūpnieciskās pārstrādes (logu rāmju ražošanas) blakusprodukti tiek iegūti mehāniski kā dažāda izmēra klucīši, kuri pārsvarā sastāv no kodolkoksnes un atzarojumu vietu koksnes,

aptuvenā attiecība variē 20 : 1 līdz 20 : 3 (skatīt 2. pielikumu). Pinosilvīna un tā atvasinājumu ekstrakciju ir iespējams veikt pēc divām ekstrakcijas shēmām: secīgas un tiešas ekstrakcijas. Secīgas ekstrakcijas izmantošana pamatojas uz datiem, ka lipofilās ekstraktvielas samazina mazpolāru vai polāru savienojumu tīrību, tādēļ lai iegūtu pinosilvīnu un tā atvasinājumus ar mazāku piemaisījumu daudzumu ir ieteicams veikt priedes rūpniecisko blakusproduktu, pēc logu rāmju ražošanas, secīgu ekstrakciju.

3.5.1. Priedes rūpniecisko blakusproduktu secīga ekstrakcija

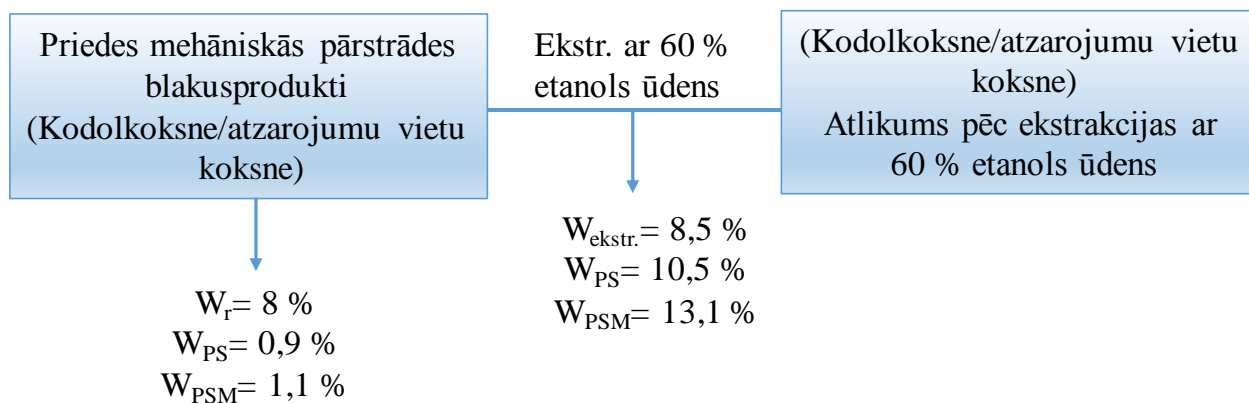
Vispirms izejvielu ekstrahē ar nepolāru šķīdinātāju heksānu vai petrolēteri, lai atdalītu salīdzinoši nepolārus savienojumus, tad tiek veikta ekstrakcija ar 60 % etanola ūdens šķīdumu. Priedes rūpnieciskie blakusprodukti tika samalti bez dalīšanas morfoloģiskajās daļās. Pinosilvīnu un tā atvasinājumus no priedes rūpnieciskajiem (logu rāmju ražošanas) blakusproduktiem var iegūt arī tos sadalot morfoloģiskajās sastāvdaļās: kodolkoksnē un atzarojumu vietu koksnē, bet tad tiek iegūts mazāks to saturs ekstraktos salīdzinājumā ar nedalītu paraugu (skatīt 3.23. attēlu). Nedalīto paraugu gadījumā tiek ietaupīts arī veicamā darba laiks un izmaksas. Ekstraktos no pinosilvīna tipa stilbēniem dominē pinosilvīns (PS) un tā monometilēteris (PSM). Pinosilvīna un tā monometilētera saturs paraugos noteikts ar augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju (HPLC-DAD), izmantojot ārējā standarta metodi. Visi ekstrakcijas iznākumi noteikti gravimetriski un izteikti procentos uz absolūti sausu paraugu.



3.23. att. Priedes rūpniecisko (logu rāmju ražošanas) blakusproduktu secīgas ekstrakcijas shēma pinosilvīnu iegūšanai

Priedes rūpniecisko blakusproduktu tiešā ekstrakcija

Veicot priedes rūpniecisko blakusproduktu, pēc logu rāmju ražošanas, tiešo ekstrakciju (skatīt 3.24. attēlu) tiek ietaupīts laiks un izmaksas, jo parauga apstrāde notiek vienā stadijā. Atšķirībā no secīgas ekstrakcijas pinosilvīns un tā monometilēteris tiek iegūts ar mazāku tīrību ekstraktos, bet ar lielāku ekstraktvielas iznākumu no izejvielas.



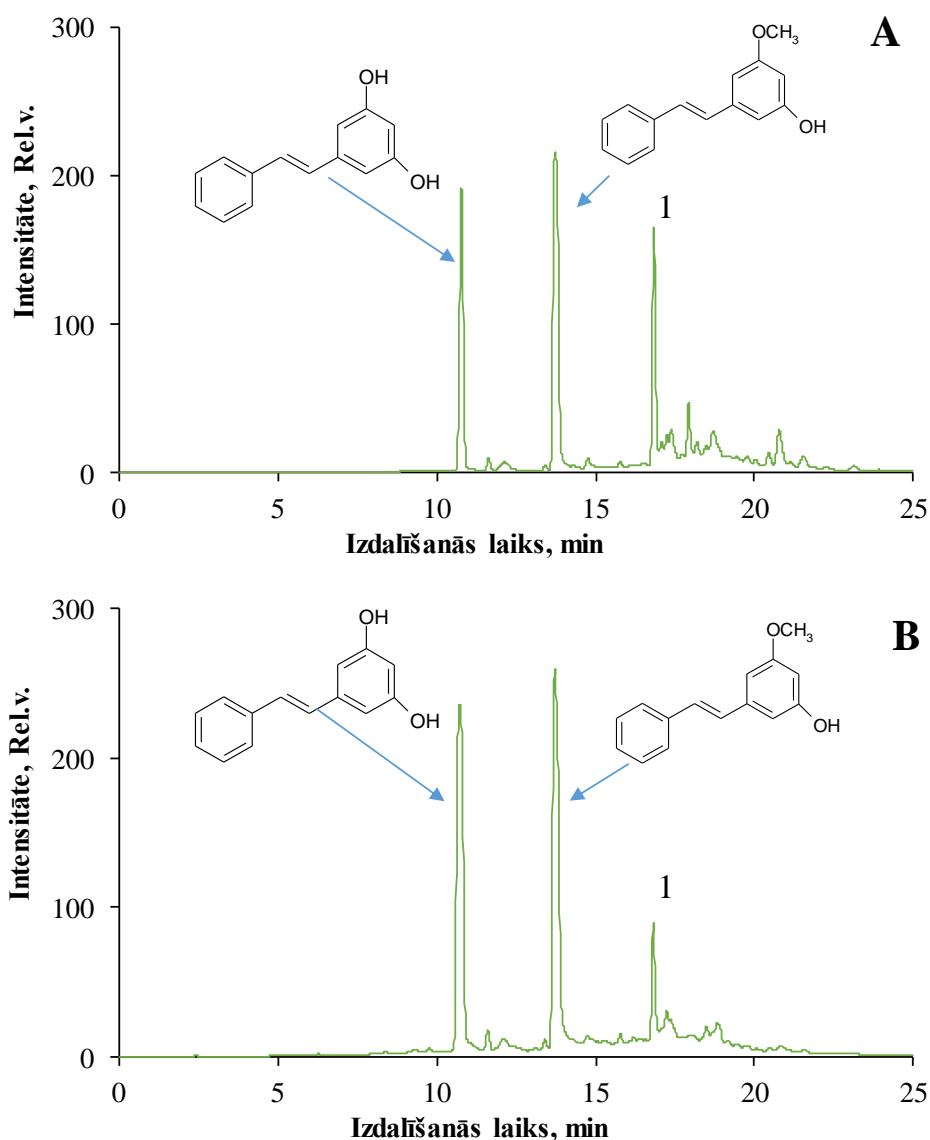
3.24. att. Priedes rūpniecisko (logu rāmju ražošanas) blakusproduktu tiešās ekstrakcijas shēma

Tiešā ekstrakcija no priedes koka blakusproduktiem ar 60 % etanola ūdens maisījumu samazina PS un PSM ieguves laiku un izmaksas salīdzinājumā ar secīgu ekstrakciju, kurā tiek atdalīti nepolārāki savienojumi, kā arī palielina izekstrahēto pinosilvīnu saturu. Tiešā ekstrakcija ir piemērota tikai, ja PS un PSM ir nepieciešami ar tīrību ekstraktos līdz 24 %.

3.5.2. Priedes rūpniecisko blakusproduktu ekstraktu analīze

Pēc UV spektriem, raksturīgākie 60 % etanola ūdens ekstrakta absorbcijas maksimumi gan secīgas, gan tiešās ekstrakcijas gadījumā ir $\lambda = 300$ nm un 280 nm. Tādēļ HPLC hromatogrammas tiek uzņemtas 60 % etanola ūdens ekstraktiem pie abiem šiem viļņa garumiem. Iegūtās hromatogrammas pinosilvīnu savienojumiem pie 300 nm prezentētas 3.25. attēlā.

Hromatogrammas 60 % etanola ūdens ekstraktiem gan pēc secīgas, gan tiešās ekstrakcijas ir uzņemtas vienādos hromatogrāfiskajos apstākļos un vienādas koncentrācijas šķīdumiem. Savienojumu koncentrācija ir proporcionāla hromatogrāfisko joslu laukumam, no šīm hromatogrammām varam secināt, ka, izmantojot tiešu ekstrakciju, (3.25. attēlā (A)) iegūstam, papildus PS un PSM, lielāku daudzumu neidentificēta savienojuma 1, kas secīgas ekstrakcijas gadījumā (3.25. attēlā (B)) varētu būt pārgājis heksāna ekstraktā, jo vielas izdalās polaritātes samazināšanās secībā. Savienojums 1 pēc struktūras varētu būt līdzīgs pinosilvīna savienojumiem (jo absorbē pie 300 nm) un ir nepolārākas dabas nekā PS vai PSM.



3.25. att. 60 % etanola ūdens (A) – tiešas ekstrakcijas (B) – secīgas ekstrakcijas ekstraktu HPLC-FLD hromatogrammas, $\lambda = 300$ nm

60 % etanola ūdens ekstraktiem tika uzņemtas hromatogrammas arī pie $\lambda = 280$ nm, iegūtās hromatogrammas dotas 5. pielikumā. Var novērot, ka papildus PS un PSM (absorbē arī pie 280 nm), tiešas ekstrakcijas gadījumā tiek noteikts neidentificēta hromatogrāfiskā josla savienojumam, kas ir nepolārākas dabas salīdzinot ar PS un PSM un kura struktūrā nav saites, kas varētu absorbēt pie 300 nm un nevar tikt detektēts ar fluorescences detektoru (FLD). Pēc literatūras datiem atzarojumu vietu koksne, kas arī ietilpst rūpniecisko blakusproduktu pēc logu rāmju ražošanas, satur vēra ņemamus daudzumus lignānu, kuriem raksturīgais absorbcijas maksimums atrodas pie 280 nm.

3.5.3. Priedes rūpniecisko blakusproduktu 60 % etanola ūdens ekstraktu antioksidantā aktivitāte

Priedes rūpniecisko (pēc logu rāmju ražošanas) blakusproduktu 60 % etanola ūdens ekstraktu antioksidantā aktivitāte ir dota 3.11. tabulā. Tiešā ekstrakcijā iegūtā ekstrakta antioksidantā aktivitāte ir mazāka nekā secīgā ekstrakcijā, to var skaidrot, ka šis ekstrakts satur vairāk citu savienojumu bez pinosilvīna atvasinājumiem, salīdzinot ar secīgo ekstrakciju.

3.11. tabula

Priedes rūpniecisko (pēc logu rāmju ražošanas) blakusproduktu 60 % etanola ūdens ekstraktu antioksidantā aktivitāte ar standartnovirzi ABTS^{•+} testā

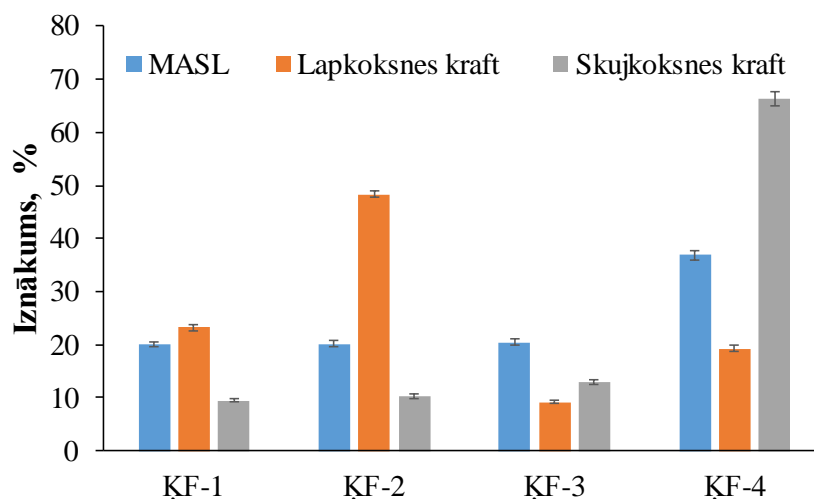
60 % etanola ūdens ekstrakts	Antioksidantā aktivitāte ABTS ^{•+} , IK ₅₀ , mg·L ⁻¹
Tiešā ekstrakcija	10,9 ± 0,2
Secīgā ekstrakcija	3,70 ± 0,12

3.6. Pinosilvīnu saturošu ekstraktu ieguves mērogošana L.E.V. ekstraktvielu rūpnīcā

Tika veikta ekstrakcijas metodes pielāgošana rūpnieciskiem apjomiem ekstrakcijas uzņēmumā L.E.V., samazinot šķīdinātāju patēriņu (attiecība kodolkoksne : 60 % etanola ūdens šķīdums = 1 : 5 un mazāk, kā arī izvērtēta iespēja ekstraktu žāvēšanai, izmantojot pieejamo žāvēšanas iekārtu. Ņemot vērā rūpnieciskos apstākļus tiek gatavotas rekomendācijas koksnes ekstraktu sagatavošanai gan sausā, gan šķidrā veidā, kurus varēs izmantot realizēšanai tirgū. Uz pinosilvīna bāzes iegūti divi saules aizsargkrēmi, kas satur dabīgu augu izcelsmes ultravioletā starojumu sorbētāju: lignīna un pinosilvīnu kompozīciju. Augu lielmolekulāriem un zemmolekulāriem polifenoliem kā lignīns un pinosilvīni, pateicoties to struktūrai, ir ievērojama UV absorbcija un tos var uzskatīt par ādas aizsarglīdzekļiem plašā UV diapazonā (210 - 450 nm).

3.7. Augu biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu secīga ekstrakcija ar dažādas polaritātes šķīdinātājiem, izmantojot ultraskaņas aktivāciju

Darbā izpētīti augu biomasas ķīmiskās (skujkoksnes un lapkoksnes *kraft LignoBoost* lignīni) pārstrādes blakusprodukti un no melnalkšņa koksnes izdalītais lignīna preparāts (MASL). Pateicoties augstam polifenolu savienojumu saturam šajos paraugos tie ir perspektīvas izejvielas vērtīgu produktu iegūšanai. Šī mērķa realizācijai ir nepieciešams izmantot piemērotas polimēro polifenolu izdalīšanas un attīrīšanas metodes. Izmantojot fracionēšanu ar organiskajiem šķīdinātājiem to polaritātes pieaugšanas secībā pēc aprakstītas shēmas (2.4. attēlā), no skujkoksnes un lapkoksnes *kraft LignoBoost* tehniskajiem lignīniem un MASL (3.26. attēlā), ieguva četras ķīmiskās frakcijas.



3.26. att. Skujkoksnes un lapkoksnes *kraft LignoBoost* lignīnu un MASL frakcionēšanas iznākumi (%) KF-1 (dihlormetānā šķīstošā frakcija); KF-2 (propanolā šķīstošā frakcija); KF-3 (metanolā šķīstošā frakcija); KF-4 (izvēlētajos šķīdinātajos nešķīstošā frakcija)

Redzams, ka skujkoksnes *kraft LignoBoost* gadījumā KF-1 (dihlormetānā šķīstoša frakcija) un KF-2 (propanolā šķīstoša frakcija) iznākumi ir 2 - 5 reizes mazāki, salīdzinājumā ar lapkoksnes *kraft LignoBoost* un MASL attiecīgajām ķīmiskajām frakcijām, bet KF-4 (izvēlētajos šķīdinātajos nešķīstošā frakcija) iznākums ir ievērojami lielāks un sastāda 66,3 % no izejas parauga masas. Tas varētu liecināt par augstāku polāro piemaisījumu - ogļhidrātu saturu šajā paraugā. Savukārt lapkoksnes KF-2 (propanolā šķīstoša frakcija) ir dominējošā un sastāda 48,3 % no izejas parauga masas.

3.7.1. Augu biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu secīgas ekstrakcijas rezultātā iegūto ķīmisko frakciju raksturojums

Iegūto ķīmisko frakciju analītiskās pirolīzes dati parāda (3.12. tabula), ka frakcionēšana ar organiskajiem šķīdinātājiem ievērojami samazina MASL nefrakcionēta parauga ogļhidrātu piemaisījuma saturu no 29,9 % līdz dažiem procentiem un ievērojami palielina lignīna atvasinājumu saturu paraugos. Savukārt skujkoksnes un lapkoksnes *kraft LignoBoost* nefrakcionēti lignīni ir ar lignīna atvasinājumu daļu virs 97 % un nav ar tik lielu ogļhidrātu atvasinājuma daudzumu kā MASL izejas lignīnam un tā nešķīstošajai frakcijai.

Nefrakcionētu lignīnu un no tiem iegūtām ķīmiskām frakcijām kopējais lignīna un ogļhidrātu atvasinājumu pirolīzes produktu relatīvais daudzums (%) ar standartnovirzēm, izmantojot Py-GC/MS/FID

Paraugs	Ogļhidrātu atvasinājumi (%)	Lignīna atvasinājumi (%)
MASL		
Nefrakcionēts	29,9 ± 0,3	70,1 ± 0,5
ĶF-1	0,53 ± 0,05	99,5 ± 0,2
ĶF-2	5,72 ± 0,12	94,3 ± 0,5
ĶF-3	3,55 ± 0,12	96,5 ± 0,3
ĶF-4	66,4 ± 0,4	33,6 ± 0,3
Skujkoksnes kraft LignoBoost lignīns		
Nefrakcionēts	1,80 ± 0,05	97,0 ± 0,9
ĶF-1	2,20 ± 0,08	92,3 ± 0,8
ĶF-2	2,40 ± 0,09	95,5 ± 0,7
ĶF-3	1,61 ± 0,09	97,3 ± 0,8
ĶF-4	1,80 ± 0,03	97,5 ± 0,6
Lapkoksnes kraft LignoBoost lignīns		
Nefrakcionēts	2,52 ± 0,04	97,4 ± 0,5
ĶF-1	0,72 ± 0,02	97,9 ± 0,8
ĶF-2	0,73 ± 0,03	98,6 ± 0,5
ĶF-3	2,21 ± 0,03	97,4 ± 0,8
ĶF-4	8,50 ± 0,09	91,5 ± 0,2

Salīdzinot MASL iegūtās frakcijas ar organiskajiem šķīdinātājiem un frakcijas, kas iegūtas ar jonu šķīdriem, ir parādīts, ka jonu šķīdriem var pilnībā izšķīdināt MASL paraugu, un izmantojot “antisolventus” iegūt ogļhidrātu un lignīnu saturošas frakcijas, savukārt organiskajos šķīdinātājos tas šķīst daļēji tādēļ izmantojot organiskos šķīdinātājus secīgi $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{C}_3\text{H}_7\text{OH} \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$ iegūst atšķirīgas ķīmiskās frakcijas un izmantotajos organiskajos šķīdinātājos nešķīstošo frakciju. Iegūtās frakcijas ar šiem organiskajiem šķīdinātājiem savā starpā atšķiras ar molekulāro masu sadalījumu (M_w), polidispersitātes (PDI) un funkcionālo grupu saturu (3.13. tabula), kā arī struktūras atšķirībām (skatīt 3.14. tabulu).

Funkcionālo grupu saturs (%), molekulārās masas sadalījums (Da) un PDI sadalījums ar standartnovirzēm kraft LignoBoost un MASL lignīnos un to ķīmiskajās frakcijās

Paraugs	-OH _{fenola} saturs, %	-OCH ₃ saturs, %	M_w	PDI
Skujkoksnes kraft LignoBoost lignīns				
Nefrakcionēts	3,72 ± 0,04	13,40 ± 0,02	12138	13,5
ĶF-1	5,84 ± 0,09	12,52 ± 0,06	698	5,1
ĶF-2	4,53 ± 0,02	16,77 ± 0,09	2087	4,0
ĶF-3	4,30 ± 0,09	14,10 ± 0,07	4465	3,7
ĶF-4	3,82 ± 0,05	13,53 ± 0,12	18636	4,2
Lapkoksnes kraft LignoBoost lignīns				
Nefrakcionēts	4,12 ± 0,05	18,87 ± 0,11	4786	11,4

3.13. tabulas turpinājums

Paraugs	-OH _{fenola} saturs, %	-OCH ₃ saturs, %	M _w	PDI
ĶF-1	4,91 ± 0,03	18,40 ± 0,11	799	4,3
ĶF-2	4,13 ± 0,02	19,76 ± 0,13	1996	5,1
ĶF-3	3,85 ± 0,05	19,94 ± 0,11	4488	2,1
ĶF-4	3,01 ± 0,04	16,29 ± 0,08	18396	3,7
MASL				
Nefrakcionēts	3,36 ± 0,03	11,19 ± 0,08	52467	25,1
ĶF-1	5,05 ± 0,05	22,81 ± 0,13	738	5,9
ĶF-2	3,84 ± 0,04	20,37 ± 0,17	1997	4,5
ĶF-3	3,47 ± 0,03	19,81 ± 0,16	4360	4,0
ĶF-4	3,02 ± 0,04	16,32 ± 0,09	38739	12,5

Iegūtās frakcijas savā starpā raksturojas ar polidispersitātes (PDI) samazinājumu frakcionēšanas rezultātā salīdzinot ar nefrakcionētiem paraugiem un molekulārās masas pieaugumu pieaugot šķīdinātāja polaritātei $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{C}_3\text{H}_7\text{OH} \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$. Izmantojot secīgu ekstrakciju ar organiskajiem šķīdinātājiem ir iespējams panākt izejas parauga homogenizēšanu. Polidispersitātes vērtības frakcijām ir daudz zemākas par izejas parauga polidispersitātes vērtību. Metanolā šķīstošā frakcija ir homogēnāka salīdzinot ar citām ķīmiskām frakcijām pēc molmasas sadalījuma. Lignīna homogenizēšana pēc molekulārās masas sadalījuma var veicināt to veiksmīgu izmantošanu dažādiem mērķiem. Funkcionālo grupu: augstam fenola hidroksilgrupu saturam un metoksilgrupu saturam ir liela nozīme lignīna antioksidantā aktivitātē.

3.14. tabula

Dažādu savienojumu relatīvais saturs (%) ar standartnovirzēm *kraft LignoBoost* un *MASL* lignīnos un to ķīmiskajās frakcijās *Py-GC/MS/FID* termiskās degradācijas produktos

Paraugs	Gvajacil+Siringil fenoli	Bez aizvietotājiem sāņķēdē	Skābekli saturošas grupas sāņķēdē
Skujkoksnes kraft LignoBoost lignīns			
Nefrakcionēts	88,2 ± 0,7	36,9 ± 0,9	13,7 ± 0,5
ĶF-1	93,7 ± 0,6	28,5 ± 0,7	22,4 ± 0,7
ĶF-2	88,0 ± 1,1	41,9 ± 0,8	9,6 ± 0,4
ĶF-3	87,8 ± 0,5	38,1 ± 0,4	10,4 ± 0,4
ĶF-4	87,8 ± 0,8	37,3 ± 0,4	11,9 ± 0,4
Lapkoksnes kraft LignoBoost lignīns			
Nefrakcionēts	95,9 ± 0,4	37,3 ± 0,7	8,3 ± 0,3
ĶF-1	96,9 ± 0,4	33,6 ± 0,5	14,2 ± 0,6
ĶF-2	95,7 ± 0,3	38,2 ± 0,8	7,3 ± 0,2
ĶF-3	94,9 ± 0,6	38,0 ± 0,4	8,0 ± 0,3
ĶF-4	94,8 ± 0,8	34,0 ± 0,8	8,8 ± 0,2
MASL			
Nefrakcionēts	96,1 ± 0,1	31,3 ± 0,9	22,1 ± 0,3
ĶF-1	98,2 ± 0,2	17,5 ± 0,6	45,3 ± 0,8
ĶF-2	95,3 ± 0,6	31,9 ± 0,6	16,6 ± 0,3
ĶF-3	95,4 ± 0,6	31,8 ± 0,4	12,0 ± 0,3
ĶF-4	92,2 ± 0,8	30,1 ± 0,3	14,8 ± 0,6

3.14. tabulā ir parādīti lignīnu un to ķīmisko frakciju struktūras īpašības, kurām ir vadošā loma parauga antioksidantās aktivitātes ietekmēšanai. Gvajacil- un siringilprodukti raksturo *o*-metoksilgrupas saturošu fenilpropāna vienību (FPV) daudzumu. Skābekli saturošas grupas sākējā (pārsvarā karbonilgrupas) saturs ir palielināts visiem paraugiem dihlormetāna frakcijās. Karbonilgrupas ir mazāk polāras, salīdzinot ar hidroksilgrupām, tāpēc nefrakcionēta lignīna daļa, kas satur šīs grupas, salīdzinoši labāk izšķīst salīdzinoši nepolārajā dihlormetānā. Paaugstinātais skābekli saturošu grupu saturs fenilpropāna sānu ķēdē dod negatīvu ietekmi uz antioksidanto aktivitāti.

3.7.2. Augu biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu secīgas ekstrakcijas rezultātā iegūto ķīmisko frakciju antioksidantās aktivitātes novērtēšana

Antioksidantās aktivitātes raksturošanai ir izmantoti testi ar dažādiem radikāļiem (ABTS^{•+} un DPPH[•] un ORAC). Lai salīdzinātu paraugus savā starpā, kā arī ar plaši izmantojamo sintētisko antioksidantu troloksu, ir aprēķinātas paraugu IK₅₀ vērtības, kas parāda, kāda antioksidanta koncentrācija ir nepieciešama, lai uz pusi samazinātu sākotnējo brīvā radikāļa koncentrāciju. Jo lielāka ir antioksidanta aktivitāte, jo zemāka ir IK₅₀ vērtība.

Pēc iegūtajām IK₅₀ redzam, ka frakcionējot izejas paraugus gan ar organiskajiem (3.15. tabula), gan ar jonu šķīdumiem (3.20. tabula) ir iespējams ietekmēt to antioksidanto aktivitāti.

Skujkoksnes *kraft LignoBoost* lignīna gadījumā ĶF-1 uzrāda lielākas IK₅₀ vērtības salīdzinoši pret izejas paraugu, savukārt ĶF-2 ir zemākas IK₅₀ vērtības, kas norāda uz augstāko antioksidanto aktivitāti. Lapkoksnes *kraft LignoBoost* lignīna un MASL gadījumā tāpat skujkoksnes *kraft LignoBoost* lignīna gadījumā zemu IK₅₀ vērtību uzrāda ĶF-2, savukārt ĶF-3 parāda līdzīgus rezultātus kā izejas tehniskais lignīns. Vissliktākā inhibēšanas spēja ir ĶF-4, kas ir ar viszemāko lignīna, fenola un metoksilgrupu saturu.

3.15. tabula

Skujkoksnes, lapkoksnes *kraft LignoBoost* un MASL lignīnu un to ķīmisko frakciju antioksidantās aktivitātes ar standartnovirzēm testos ar dažādiem radikāļiem

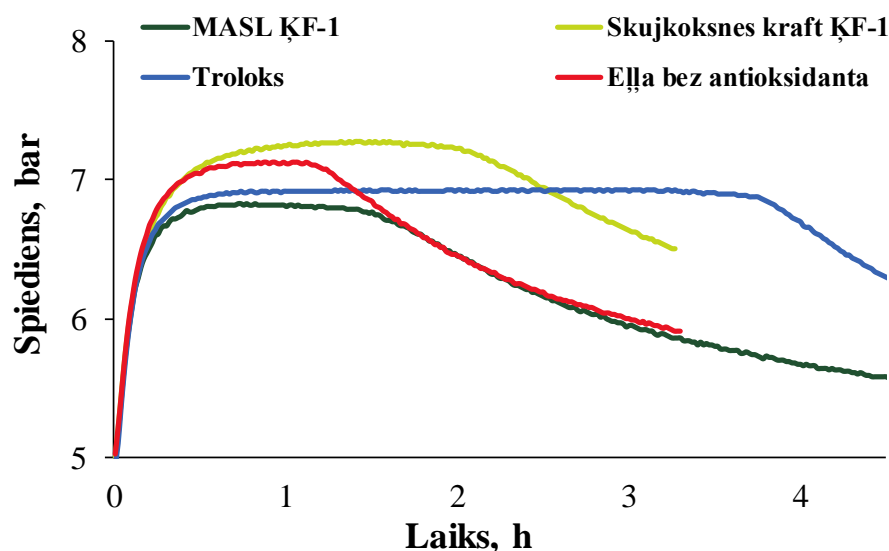
Paraugs	ABTS ^{•+} IK ₅₀ , mg·L ⁻¹	DFPH [•] IK ₅₀ , mg·L ⁻¹	ORAC mmol TE·g ⁻¹
Skujkoksnes <i>kraft LignoBoost</i> lignīns			
Nefrakcionēts	3,82 ± 0,13	17,4 ± 0,2	5,8 ± 0,2
ĶF-1	4,15 ± 0,12	21,0 ± 0,4	8,6 ± 0,3
ĶF-2	3,1 ± 0,2	11,0 ± 0,3	5,1 ± 0,2
ĶF-3	3,87 ± 0,15	13,0 ± 0,4	3,5 ± 0,2
ĶF-4	4,71 ± 0,12	21,1 ± 0,4	1,72 ± 0,12
Lapkoksnes <i>kraft LignoBoost</i> lignīns			
Nefrakcionēts	4,8 ± 0,2	15,0 ± 0,6	5,6 ± 0,4
ĶF-1	4,16 ± 0,12	17,6 ± 0,4	8,1 ± 0,6
ĶF-2	3,7 ± 0,2	11,3 ± 0,3	5,7 ± 0,4

3.15. tabulas turpinājums

Paraugs	ABTS ^{•+} IK ₅₀ , mg·L ⁻¹	DFPH [•] IK ₅₀ , mg·L ⁻¹	ORAC mmol TE·g ⁻¹
ĶF-3	4,29 ± 0,12	12,0 ± 0,3	4,8 ± 0,3
ĶF-4	6,4 ± 0,2	17,4 ± 0,7	2,4 ± 0,2
MASL			
Nefrakcionēts	5,86 ± 0,14	33,3 ± 0,4	2,53 ± 0,11
ĶF-1	2,83 ± 0,13	15,4 ± 0,3	6,3 ± 0,2
ĶF-2	4,64 ± 0,15	17,8 ± 0,2	5,1 ± 0,2
ĶF-3	5,47 ± 0,16	16,2 ± 0,2	3,9 ± 0,3
ĶF-4	21,2 ± 0,3	72,3 ± 0,8	2,31 ± 0,12
Troloks*	4,01 ± 0,12	4,72 ± 0,12	3,92 ± 0,13

*References antioksidants

Kā redzams 3.15. tabulā, darbā izmantotie skujkoksnes un lapkoksnes *kraft LignoBoost* lignīni kā arī MASL un to ķīmiskās frakcijas, kas izdalītas ar organiskajiem šķīdinātājiem visos radikāļu inhibēšanas testos uzrāda diezgan augstu antioksidanto aktivitāti salīdzinot ar troloksu kā references antioksidantu, tie ir vai nu labāki vai tuvi references antioksidanta vērtībai. Neskatoties uz labo antioksidanto aktivitāti radikāļu deaktivēšanas testos tie uzrādīja diezgan zemu antioksidanto aktivitāti ievadot tos citās sistēmās kā antioksidantus, kā piemēram, rapšu eļļā un oksidējot to ar skābekli paaugstinātā temperatūrā. Bet tas ir skaidrojams ar paraugu un substrāta (rapšu eļļa) savietojamību, jo eļļas sistēma ir nepolāra attiecībā pret izejas lignīnu un to frakcijām, tāpēc tos nebija iespējams izšķīdināt, izņēmums ir ar dihlormetānu izdalītā frakcija (ĶF-1), kura ir lipofīlākas dabas un to ir iespējams ievadīt eļļu saturošās sistēmās un veikt testus, skatīt 3.27. attēlā.



3.27. att. Skujkoksnes *kraft LignoBoost* lignīna ĶF-1, MASL ĶF-1, rapšu eļļas bez pievienotas piedevas un sintētiskā antioksidanta troloksa antioksidantā aktivitāte rapšu eļļas oksidēšanas testā

Rezultāti parāda, ka rapšu eļļai bez pievienota antioksidanta oksidēšanās līkne sāk kristies ātrāk par visām pārējām līknēm, kas norāda ka izvēlētie šajā sistēmā ievadītie paraugi aizkavē eļļas oksidēšanos ar skābekli paaugstinātā temperatūrā.

3.7.3. *Kraft LignoBoost* lignīna ietekme uz PU kompozītmateriāla termooksidēšanas destrukciju

Skujkoksnes un lapkoksnes *kraft LignoBoost* lignīnu un no tiem ar organiskajiem šķīdinātājiem iegūtās ķīmiskās frakcijas tika ievadītas PU kompozītmateriālā ar saturu 2,5 % no kopējās masas. Iegūtais kompozītmateriāls ar ievadītiem perspektīviem antioksidantiem tika sildīts gaisa atmosfērā un pētīta to termo-oksidēšanās destrukcija. Iegūtie dati parādīja pētāmo paraugu antioksidanto efektu, kas izpaužas kā PU kompozītmateriāla oksidēšanās sākuma ($T_{sākuma}$) un maksimālās (T_{maks}) temperatūras nobīde salīdzinot ar PU kompozītmateriālu bez pievienota antioksidanta (3.16. tabula). Augstāko antioksidanto efektu uzrādīja propanola un metanola ekstraktu saturošie PU kompozītmateriāli. Var redzēt, ka paraugi ar pievienoto ekstraktu kavē $T_{sākuma}$ (kas rāda pie kādas temperatūras sākas masas zudumi paraugam) par 10 - 35 °C, kā arī uzlabojas tādi rādītāji kā maksimālais degradācijas ātrums, kas rāda cik ātri viela tiek termooksidēta. Struktūras īpašības, kas labvēlīgi ietekmē iegūto paraugu antioksidanto aktivitāti, ir alkilaizvietotāju klātbūtne (bez skābekli saturošajiem aizvietotājiem vai dubultsaitēm).

3.16. tabula

Skujkoksnes un lapkoksnes *kraft LignoBoost* lignīnu un to ķīmisko frakciju ietekme uz poliuretāna kompozītmateriāla termooksidēšanas destrukciju

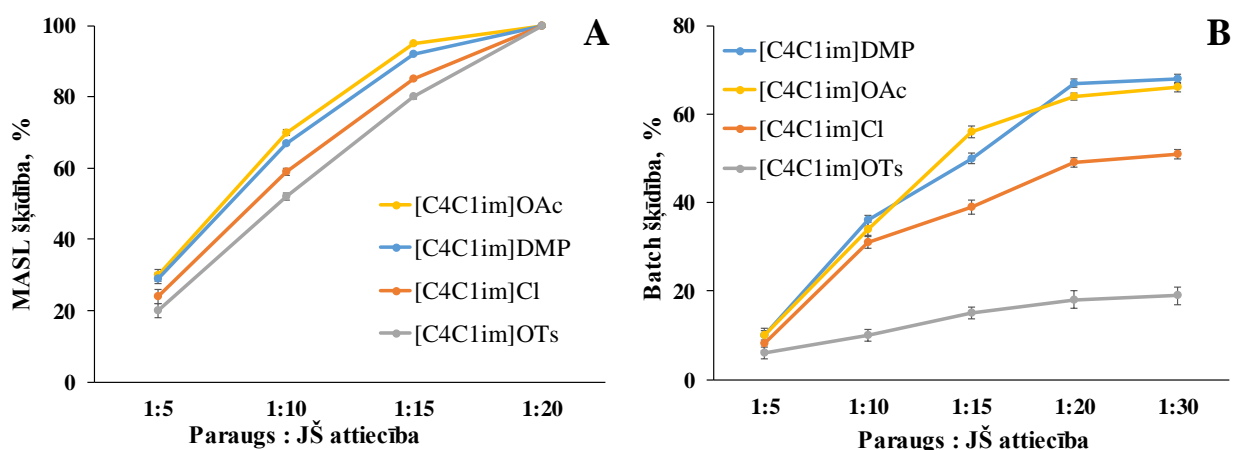
Paraugšs	$T_{sākuma}$, °C	T_{maks} , °C	Maksimālais degradācijas ātrums, mg·min ⁻¹
Bez piedevas	270	300	0,96
Skuju koku koksnes <i>kraft LignoBoost</i> lignīns			
Nefrakcionēts	280	320	0,57
ĶF-1	290	320	0,64
ĶF-2	303	330	0,47
ĶF-3	295	325	0,50
Lapkoku koksnes <i>kraft LignoBoost</i> lignīns			
Nefrakcionēts	290	321	0,56
ĶF-1	290	320	0,59
ĶF-2	305	330	0,34
ĶF-3	301	325	0,40

3.8. Augu biomasas blakusproduktu ekstrakcija/frakcionēšana ar jonu šķīdriem vērtīgu polifenolu savienojumu ieguvei

Ir parādīts promocijas darbā izmantoto lignocelulozes biomasas mehāniskās un ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu augstais kompozicionālais neviendabīgums pēc lignīna satura un struktūras: (45 - 97 %), ogļhidrātu satura (2 - 55 %), ekstraktvielu satura (0,1 - 35 %) un pelnu satura (0,4 - 6 %), tādēļ pētījuma metodoloģija balstās uz pieeju, kas ir virzīta uz “zaļu” un ilgtspējīgu dabīgo produktu ekstrakcijas/frakcionēšanas metožu izstrādi. “Zaļā” ekstrakcija pamatojas uz ekstrakcijas procesu atklājumiem un izstrādi, kas samazina enerģijas patēriņu, pieļauj alternatīvu šķīdinātāju un atjaunojamu dabīgo produktu izmantošanu, un nodrošina drošu un augstas kvalitātes ekstraktu/produktu iznākumu. Jonu šķīdri, pateicoties šķīdinātāja spēka, augstās ķīmiskās un termālās stabilitātes dēļ, salīdzinot ar klasiskiem organiskiem šķīdinātājiem [206], ir labi piemērojami dabīgo produktu, biopolimēru “zaļai” ekstrakcijai, kaut gan aktīvi pētījumi biopolimēru apstrādei ar jonu šķīdriem tiek pētīti tikai pēdējos gados un galvenokārt sākumā tika vērsti tikai uz celulozes izdalīšu no dažādiem augu materiāliem nepievēršot tik lielu uzmanību polifenolu savienojumiem. Ar mērķi noskaidrot JŠ mijiedarbību ar augu biomasas galvenajiem komponentiem svarīgi bija izpētīt dažāda veida biomasas frakcionēšanu, izmantojot jonu šķīdriem ar uzsvāru iegūt vērtīgus polifenolus biorafinēšanas kontekstā. Promocijas darba gaitā tika iegādāti gan komerciāli pieejami, gan sintezēti jonu šķīdri uz imidazolija katjona bāzes. Tiem bija vai nu 1-butil-3-metilimidazolijs ($[C_4C_1im]$) katjons, ar atšķirīgiem anjoniem, kā dimetilfosfāts (DMP), acetāts (OAc), tozilāts (OTs) un hlorīds (Cl) vai arī imidazolija katjona sastāvā bija dažāda ķēdes garuma alifātiski aizvietotāji (1-etil-3-metilimidazolijs ($[C_2C_1im]$), 1-butil-3-metilimidazolijs ($[C_4C_1im]$), 1-oktil-3-metilimidazolijs ($[C_8C_1im]$) un 1-dodecil-3-metilimidazolijs ($[C_{12}C_1im]$), lai novērtētu gan katjona, gan anjona ietekmi lignocelulozes biomasas apstrādē ar jonu šķīdriem.

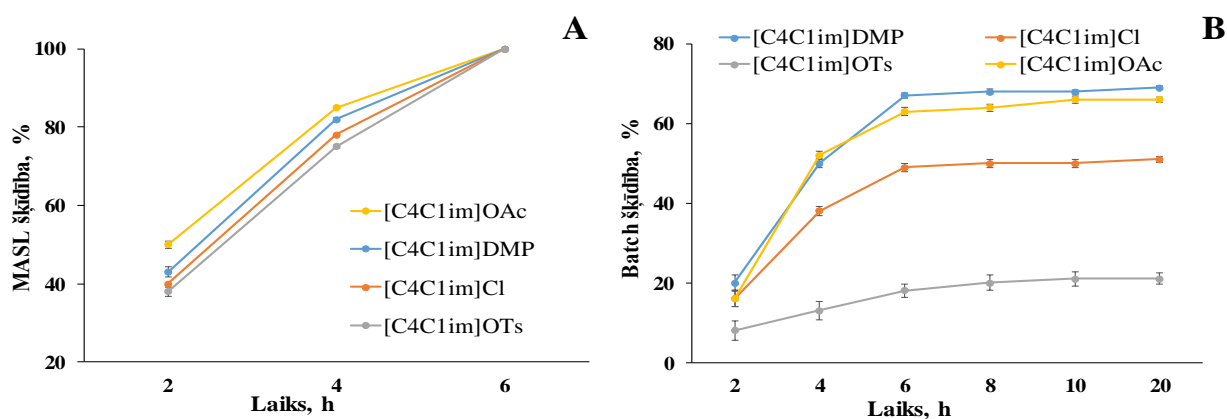
3.8.1. Ar lignīnu bagātu lignocelulozes biorafinēšanas blakusproduktu šķīšanas procesa pētījumi dažādos jonu šķīdriem

Pētījumu rezultāti parādīja dažādu ar lignīnu bagātu lignocelulozes biorafinēšanas blakusproduktu šķīšanas procesus dažādos jonu šķīdriem, kā arī dažādās JŠ pret lignīnu bagātu lignocelulozes biorafinēšanas blakusproduktu attiecībās. Veicot laboratorijā iegūtā sārma lignīna no melnalkšņa koksnes (MASL) un no degvielas etanola ražošanas iegūtā blakusprodukta (lignīna saturoša blakusprodukta - Batch) apstrādi ar dažādiem jonu šķīdriem tika veikti pētījumi, lai noteiktu piemērotāko JŠ pret paraugs attiecību visefektīvākai paraugu izšķīdināšanai attiecīgajos JŠ skatīt 3.28. attēlu.



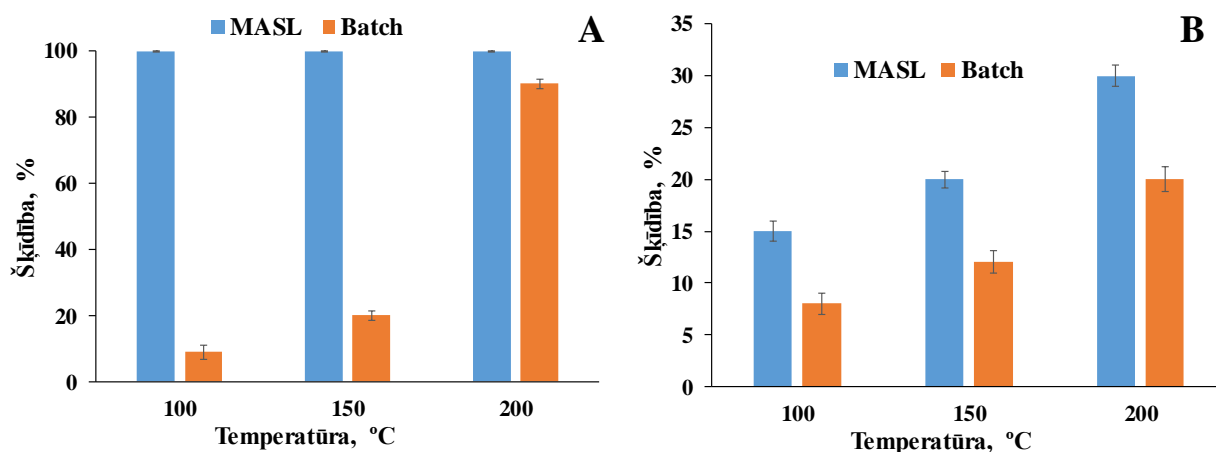
3.28. att. MASL (A) un Batch (B) šķīdība dažādu JŠ masu attiecībās

Iegūtie lignocelulozes biomasas šķīdības rezultāti ar jonu šķīdriem parādīja, ka melnalkšņa sārma lignīnu (MASL) ir iespējams pilnībā izšķīdināt visos darbā izmantotajos jonu šķīdumos gan ar atšķirīgiem anjoniem, gan ar katjoniem. Visoptimālākos šķīšanas rezultātus MASL apstrādē ar jonu šķīdriem izdevās sasniegt paraugs pret JŠ attiecībā 1 : 20 (3.28. attēlā (A)). Savukārt, lignocelulozes atlikuma pēc skujuoku fermentatīvās hidrolīzes degvielas etanola ieguves procesā (Batch) apstrādes rezultāti (3.28. attēlā (B)) parādīja, ka to pilnībā nevar izšķīdināt nevienā no darbā izmantotajiem JŠ, tomēr arī šajā gadījumā optimālākā parauga attiecība pret JŠ ir 1 : 20, tas saskan ar dažādu autoru darbiem par dažādu lignocelulozes materiālu šķīšanu dažādos JŠ [207]. Literatūrā [208] ir atrodama informācija arī par lielākām paraugu pret jonu šķīdriem attiecībām, lai šķīdinātu augu biomasu, tas ir skaidrojams ar augu biomasas dažādību, kā arī ar dažādu jonu šķīdriem dabu. Pētījumu rezultāti parādīja, ka vislabākā lignocelulozes šķīdināšanas spēja ir 1-butil-3-metilimidazolijs dimetilfosfāta ([C₄C₁im]DMP) un 1-butil-3-metilimidazolijs acetāta ([C₄C₁im]OAc) jonu šķīdriem salīdzinājumā ar pārējiem darbā izmantotajiem JŠ. Izmantojot optimālo parauga jonu šķīdriem attiecību tika veikti pētījumi šķīšanas procesa laika optimizēšanai (3.29. attēls).



3.29. att. Lignocelulozes materiāla (A)-MASL (B)-Batch šķīdība dažādos JŠ atkarībā no laika. Daļiņu izmērs < 0,4 mm, maisījuma temperatūra 100 °C, parauga JŠ masu attiecība 1 : 20

3.29. attēlā (A) redzams, ka 6 stundas ir pietiekošs laiks, lai pilnībā izšķīdinātu MASL paraugu attiecīgajos JŠ, savukārt Batch gadījumā parauga šķīdība ir sliktāka attiecīgajos jonu šķīdumos, pat pēc 20 stundām, bet piemērotākais laiks ir 6 - 7 stundas, jo tad tiek sasniegts maksimālais iznākums un laikam palielinoties šķīdība pieaug nenozīmīgi. Fracionēšanas procesa aktivācijai tika lietota arī mikroviļņu enerģija (3.30. attēlā (A)) 30 minūtes, 100 °C; 150 °C un 200 °C temperatūrās lignocelulozes materiālu šķīdības pētījumiem [C₄C₁im]DMP, iepriekš lietotās attiecībās, lai noskaidrotu optimālākos režīmus fracionēšanai.

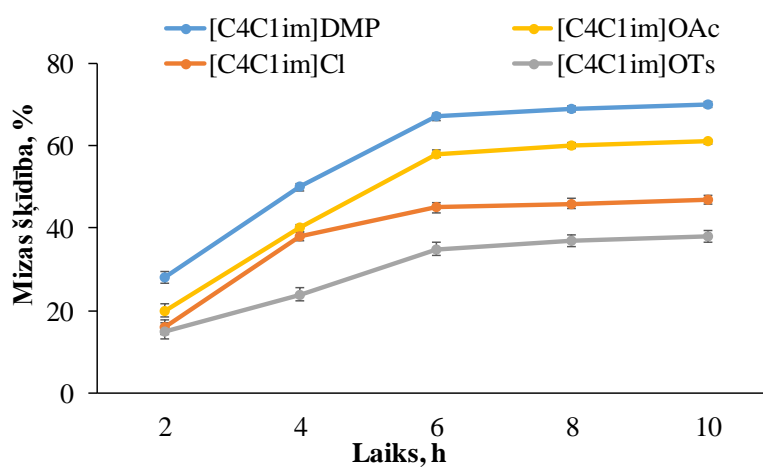


3.30. att. Lignocelulozes materiāla šķīdība [C₄C₁im]DMP jonu šķīdumā (A) - izmantojot mikroviļņu enerģiju 30 min. 100 °C, 150 °C, 200 °C temp. (B) - glicerīna vannā 30 min. 100 °C; 150 °C; 200 °C temperatūrā, daļiņu izmērs < 0,4 mm, parauga JŠ masu attiecība 1 : 20

No MASL un Batch šķīdības rezultātiem 1-butil-3-metilimidazolijs dimetilfosfātā, lietojot mikroviļņu enerģiju dažādās temperatūrās, redzams, ka iepriekšējos eksperimentos labi šķīstošais MASL lignocelulozes materiāls izšķīst pilnībā [C₄C₁im]DMP jau pēc 30 minūtēm 100 °C temperatūrā. Lietojot konvektīvo sildīšanu glicerīna vannā 30 minūtes 100 °C temperatūrā tas šķīst tikai 15 %. Redzams, ka izmantojot mikroviļņu enerģiju, šķīšanas procesu var paātrināt vismaz desmit reizes. Turpretī Batch parauga šķīdības rezultāti parāda, ka izmantojot mikroviļņu enerģiju 100 °C temperatūrā pēc 30 minūtēm paraugs šķīst aptuveni 10 % [C₄C₁im]DMP jonu šķīdumā. Palielinot temperatūru līdz 150 °C šķīdība palielinās gandrīz divas reizes, savukārt 200 °C temperatūrā šķīdība palielinās, sasniedzot 90 %. Tas ir skaidrojams, ne tikai ar šķīdības ieguldījumu, bet arī ar lignocelulozes materiālu degradāciju augstā temperatūrā, ko tālākajos pētījumos apstiprina analītiskās pirolīzes rezultāti. Izmantojot biomasas šķīdības pētījumus ar JŠ mikroviļņu tehnikā, tika novērots, ka lietojot mikroviļņu enerģiju tiek panākts efektīvāks biomasas parauga šķīšanas process, bet šķīdība ir atkarīga no biomasas parauga dabas. Veicot fracionēšanu, izmantojot “antisolventus”, paraugus šķīdinot mikroviļņu tehnikā novērojami sakrītoši rezultāti salīdzinājumā ar sildīšanu glicerīna vannā. Mikroviļņu ietekme uz fracionēšanu samazina reģenerējamo daļu (mērķproduktus) no JŠ

izšķīdušās daļas izmantojot attiecīgos “antisolventus” (skatīt 3.17. tabulu). Bet jāņem vērā fakts, ka piemēram, Batch un baltalkšņa mizas gadījumā pats izejas paraugs šķīst nepilnīgi un atšķirīgi visos izmantotajos režīmos.

Nākamajos frakcionēšanas pētījumos ar jonu šķīdumiem kā lignocelulozes materiāls tika izmantots mežu apsaimniekošanas atlikumi (alkšņa miza). Šo eksperimentu gaitā tika variēts ar jonu šķīduma parauga attiecībām, temperatūru un frakcionēšanas laiku un izvērtēta to ietekme uz frakcionēšanas procesiem. Mainot JŠ un parauga masu attiecību tika iepriekš konstatēts, ka piemērotākā attiecība ir 1 : 20. Frakcionējot ir iegūtas dažādas JŠ šķīstošās un nešķīstošās frakcijas dažādos jonu šķīdumos (skatīt 3.31. attēlu).



3.31. att. Baltalkšņa (*A. incana*) mizas šķīdība dažādos jonu šķīdumos, daļiņu izmērs < 0,4 mm, parauga JŠ masu attiecība 1 : 20

Iegūtie rezultāti parādīja tādu pašu tendenci kā iepriekšējos eksperimentos, labākie jonu šķīdumi baltalkšņa mizas apstrādei ir [C₄C₁im]DMP un [C₄C₁im]OAc un apstrādes laiks 6 - 8 stundas. Tā kā [C₄C₁im]DMP jonu šķīdums parādīja labākos šķīdības rezultātus visā pētījuma gaitā, tad pamatojoties uz to ar [C₄C₁im]DMP tika veikti detalizētāki pētījumi bioloģiski aktīvu savienojumu ieguvei no darbā izmantotajiem lignocelulozes biomasas paraugiem.

3.8.2. JŠ izšķīdušā lignocelulozes materiāla frakcionēšana ar dažādiem “antisolventiem” un iegūto frakciju raksturošana

Pamatojoties uz literatūras datiem [206, 208], kā “antisolventi” ir testēti dažādi organiskie šķīdinātāji (etanols, acetons, etilacetāts), kā arī to maisījumi ar ūdeni. Pētījumu rezultāti parādīja, ka, lietojot izvēlētos “antisolventus”, var atdalīt ogļhidrātu frakciju no polifenolu frakcijas ar diezgan lielu selektivitāti līdz pat 98 % atkarībā no biomasas parauga. Mainot šķīdināšanas procesa fizikālos parametrus, ir pierādīta to ietekme uz izejas parauga šķīšanas procesu, kā arī tālākās frakcionēšanas ar “antisolventa” šķīdumiem un no tiem izdalītajiem

polifenolu un ogļhidrātu daudzuma sadalījumu JŠ šķīstošajās frakcijās. Ogļhidrātu saturošas frakcijas iegūšanai tika izmantots “antisolvents” - acetons : ūdens (1 : 1), bet polifenolu saturošas frakcijas iegūšanai paskābināts ūdens (pH = 2) (3.17. tabula).

3.17. tabula

No MASL, Batch un baltalkšņa mizas JŠ šķīstošās daļas apstrādes rezultātā ar “antisolventiem” 1 un 2 to iegūto frakciju iznākumi (%) ar standartnovirzēm

JŠ + frakcionēšanas apstākļi	1. frakciju masa, % no izejas parauga masas	2. frakciju masa, % no izejas parauga masas
MASL (šķīdība 100 % visos JŠ)		
[C ₄ C ₁ im]DMP, 6h/100 °C	21,3 ± 0,6	46,6 ± 0,6
[C ₄ C ₁ im]Cl, 6h/100 °C	13,6 ± 0,4	14,0 ± 0,3
[C ₄ C ₁ im]OTs, 6h/100 °C	1,04 ± 0,06	38,4 ± 0,8
[C ₄ C ₁ im]OAc, 6h/100 °C	24,9 ± 0,4	42,7 ± 0,7
[C ₈ C ₁ im]OTs, 6h/100 °C	30,7 ± 0,6	11,1 ± 0,2
[C ₁₂ mim]OTs, 6h/100 °C	19,0 ± 0,2	21,4 ± 0,5
[C ₄ C ₁ im]DMP, mikroviļņos 30min/100 °C	20,3 ± 0,5	42,7 ± 0,4
[C ₄ C ₁ im]DMP, mikroviļņos 30min/150 °C	15,5 ± 0,2	29,6 ± 0,5
Batch (šķīdība atšķirīga dažādos JŠ)		
[C ₄ C ₁ im]DMP, 6h/100 °C	45,1 ± 1,0	3,4 ± 0,2
[C ₄ C ₁ im]Cl, 6h/100 °C	34,0 ± 0,9	1,75 ± 0,12
[C ₄ C ₁ im]OTs, 6h/100 °C	1,16 ± 0,07	3,8 ± 0,3
[C ₄ C ₁ im]OAc, 6h/100 °C	28,2 ± 0,8	1,52 ± 0,11
[C ₄ C ₁ im]DMP, mikroviļņos 30min/100 °C	1,33 ± 0,11	3,9 ± 0,2
[C ₄ C ₁ im]DMP, mikroviļņos 30min/150 °C	7,9 ± 0,2	3,3 ± 0,2
[C ₄ C ₁ im]DMP, mikroviļņos 30min./200 °C	23,6 ± 0,7	14,6 ± 0,4
Baltalkšņa miza (šķīdība atšķirīga dažādos JŠ)		
[C ₄ C ₁ im]DMP, 6h/100 °C	28,3 ± 0,8	2,43 ± 0,11
[C ₄ C ₁ im]Cl, 6h/100 °C	8,8 ± 0,3	0,8 ± 0,02
[C ₄ C ₁ im]OTs, 6h/100 °C	10,2 ± 0,3	0,9 ± 0,04
[C ₄ C ₁ im]OAc, 6h/100 °C	9,5 ± 0,3	1,12 ± 0,08
[C ₄ C ₁ im]DMP, mikroviļņos 30min/100 °C	14,6 ± 0,4	1,38 ± 0,09
[C ₄ C ₁ im]DMP, mikroviļņos 30min/150 °C	10,2 ± 0,3	0,9 ± 0,04

1. - Izgulsnēta ar “antisolventu” - acetons ūdens šķīdumu (1 : 1)

2. - Izgulsnēta ar “antisolventu” - ūdens (pH=2)

Izmantojot analītisko pirolīzi (Py-GC/MS), ir raksturots ķīmiskais sastāvs nefrakcionētiem paraugiem un, ka lietojot dažādus “antisolventus” atdalāmas dažādas savienojumu grupas. Izvērtējot iegūto informāciju, ir iespējams piemērot “antisolventus” vēlamo mērķa savienojumu ieguvei, kā arī noteikt nevēlamu blakusproduktu, kā piemēram, JŠ

sadalīšanās produktu klātesamību iegūtajās frakcijās. Tādā veidā tiek novērtēta paraugu tīrība un tiek noteikts vai ir nepieciešama atkārtota apstrāde - atkārtota paraugu mazgāšana ar izmantoto “antisolventa” šķīdumu. Saskaņā ar analītiskās pirolīzes datiem iegūtie ekstrakti ievērojami atšķiras no izejas paraugiem un arī savā starpā (skatīt 6. pielikumu). 3.18. tabulā ir parādīts lignīna degradācijas produktu saturs pirolīzes produktos. Lignīna pirolīzes produktu relatīvais saturs ir tieši proporcionāls lignīna saturam analizējamajā paraugā. Kā rezultātā ir izstrādāta metode efektīvai JŠ sadalīšanās produktu atdalīšanai no mērķprodukta, ietverot karsto mazgāšanu ar sonifikāciju. Ogļhidrātu saturošās frakcijas iegūšanai tika izmantots “antisolvents” - acetons : ūdens (1 : 1), bet polifenolu saturošās frakcijas iegūšanai paskābināts ūdens (pH = 2). Iegūto frakciju daudzumi, apstrādājot JŠ šķīstošajās frakcijas ar attiecīgiem “antisolventiem”, apkopoti 3.17. tabulā.

3.18. tabula

MASL, Batch un baltalkšņa mizas neapstrādātu un apstrādātu ar [C₄C₁im]DMP dažādos režīmos un pēc apstrādes ar “antisolventu” 2 sastāva raksturojums izmantojot Py-GC/MS ar standartnovirzēm

MASL	Neapstrādāts	6 h/100 °C	Mikroviļņos 30 min/100 °C	Mikroviļņos 30 min/150 °C
Lignīna atvasinājumi, %	70,1 ± 0,5	98,4 ± 0,8	95,3 ± 0,7	96,7 ± 0,5
Ogļhidrātu atvasinājumi, %	29,9 ± 0,3	1,64 ± 0,11	4,7 ± 0,2	3,32 ± 0,12
Batch	Neapstrādāts	6 h/100 °C	Mikroviļņos 30 min/100 °C	Mikroviļņos 30 min/150 °C
Lignīna atvasinājumi, %	35,8 ± 0,5	96,6 ± 0,9	99,7 ± 0,9	98,2 ± 0,8
Ogļhidrātu atvasinājumi, %	64,2 ± 0,5	3,4 ± 0,2	0,30 ± 0,02	1,84 ± 0,12
Baltalkšņa miza	Neapstrādāts	6 h/100 °C	Mikroviļņos 30 min/100 °C	Mikroviļņos 30 min/150 °C
Lignīna atvasinājumi, %	26,5 ± 0,4	89,5 ± 0,9	82,0 ± 0,7	78,9 ± 0,8
Ogļhidrātu atvasinājumi, %	73,5 ± 0,6	10,5 ± 0,3	18,0 ± 0,2	21,1 ± 0,5

Lignīna degradācijas produktu saturs pirolīzes produktos iegūts summējot visu lignīna degradācijas produktu smaiļu laukumus un attiecinot iegūto summu pret visu pirogrammā esošo smaiļu laukumu summu.

Gandrīz visiem paraugiem optimālas polifenolu savienojumu saturošās frakcijas (2. frakcija) izdevās sasniegt, izmantojot paraugu apstrādi ar [C₄C₁im]DMP jonu šķīdumu 6 stundas 100 °C temperatūrā. Lignocelulozes materiāla apstrāde ar darbā izmantotajiem jonu šķīdumiem samazināja to neviendabīgumu pēc lignīna un ogļhidrātu savienojuma satura (3.18. tabula).

Lignīna frakciju tīrība, atkarībā no izmantotā jonu šķidrums anjona sasniedz pat 99 %. 3.18. tabulā ir parādīts, ka neapstrādāts MASL paraugs raksturojas ar diezgan lielu neviendabīgumu, izejas paraugs satur 29,9 % ogļhidrātu piemaisījumus, savukārt apstrādes rezultātā ar JŠ dažādos režīmos tika iegūts homogēnāks ekstrakts ar lignīna atvasinājumu saturu paraugos lielāku par 98 %. Ņemot vērā attiecīgās izmantotās fracionēšanas metodes iegūtās frakcijas daudzumus (3.17. tabula) redzam, ka vislielākais iznākums 46,6 % no MASL izejas masas (2. frakcija) ir paraugam, kas iegūts to karsējot glicerīna vannā 6 stundas 100 °C temperatūrā ar [C₄C₁im]DMP jonu šķidrumu, savukārt zemāks iznākums ir mikroviļņos apstrādātam 30 minūtes 150 °C temperatūrā attiecīgi tikai 29,6 % no izejas masas. Batch un baltalkšņa mizas izejas paraugi raksturojas ar augstu ogļhidrātu atvasinājumu saturu attiecīgi (64,2 % un 73,5 %). Fracionēšanas rezultātā ar [C₄C₁im]DMP ir iespējams iegūt frakcijas ar samazinātu ogļhidrātu atvasinājumu daudzumu līdz pat 0,3 %. Mikroviļņu izmantošana lignocelulozes materiālu apstrādē ar jonu šķidrumiem ir efektīva, lai ātrāk izšķīdinātu attiecīgo lignocelulozes materiālu JŠ, bet tā ne vienmēr dod labāko iznākumu un parauga tīrību tālākos apstrādes posmos, izmantojot “antisolventus”, lai iegūtu polifenolu bagātas frakcijas. Apstrādājot izšķīdušo paraugu JŠ ar attiecīgo “antisolventu” tika atdalīta ogļhidrātu daļa uzlabojot ar lignīnu bagātu lignocelulozes biorafinēšanas blakusproduktu homogenitāti un tādejādi mainot fizikāli ķīmiskos parametrus, kā polidispersitāti to samazinot un izmainot molekulasmasas sadalījumu. Gelfiltrācijas hromatogrāfijas rezultāti parādīja, ka lignīniem pēc apstrādes ar dažādiem jonu šķidrumiem ir daudz zemāka molekulārā masa (3.19. tabula) un 7 līdz 9 reizes zemāka polidispersitāte PDI, salīdzinot ar izejas paraugu.

3.19. tabula

Izejas un apstrādātu MASL ar dažādiem JŠ un izdalīto polifenolu saturošām frakciju molekulārā masas (Da) un polidispersitātes (PDI) rezultāti

Paraugs	Mw, Da	PDI
MASL neapstrādāts	7617	25,1
MASL [C ₄ C ₁ im]DMP	3730	2,8
MASL [C ₄ C ₁ im]Cl	5751	3,6
MASL [C ₄ C ₁ im]OTs	2844	3,5
MASL [C ₄ C ₁ im]OAc	2533	3,3

Pamatojoties uz iegūtajiem rezultātiem, dažām ar JŠ iegūtajām frakcijām veikti bioloģiskās aktivitātes pētījumi. Izvērtējot bioloģiski aktīvo savienojumu aktivitāti un iegūto polifenolu frakciju raksturlielumus ar JŠ, novērtēta to izmantošanas iespēja kā antioksidantiem dažādās sistēmās novēroja labu antioksidanto aktivitāti (skat. 3.20. tabula) kā spēju dezaktivēt stabilus brīvos radikāļus. Ievadīšanu polifenolu saturošas frakcijas PU kompozītmateriālā kā

antioksidantus tie palielināja ($T_{\text{sākuma}}$, °C) temperatūru termooksidēšanās destrukcijas apstākļos salīdzinot ar PU kompozītmateriālu bez pievienota antioksidanta.

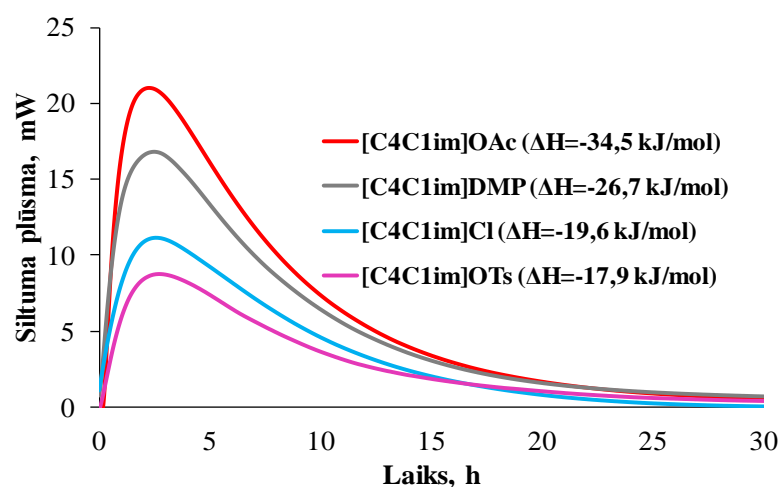
3.20. tabula

Izejas un polifenolu saturošu MASL frakciju antioksidantās aktivitātes novērtējums dažādās sistēmās (radikālu šķīdumos un kompozītmateriālā – PU), lietojot dažādus jonu šķīdumus

Paraugs	DFPH*, IK_{50} , $mg \cdot L^{-1}$	ORAC, TE $mmol \cdot g^{-1}$	$T_{\text{sākuma}}$, °C
MASL neapstrādāts	$33,3 \pm 0,4$	$2,53 \pm 0,15$	338
MASL [C ₄ C _{1im}]DMP	$23,04 \pm 0,2$	$2,82 \pm 0,12$	343
MASL [C ₄ C _{1im}]Cl	$31,1 \pm 0,3$	$2,65 \pm 0,13$	340
MASL [C ₄ C _{1im}]OTs	$20,2 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,2$	348
MASL [C ₄ C _{1im}]OAc	$24,1 \pm 0,2$	$2,81 \pm 0,14$	345

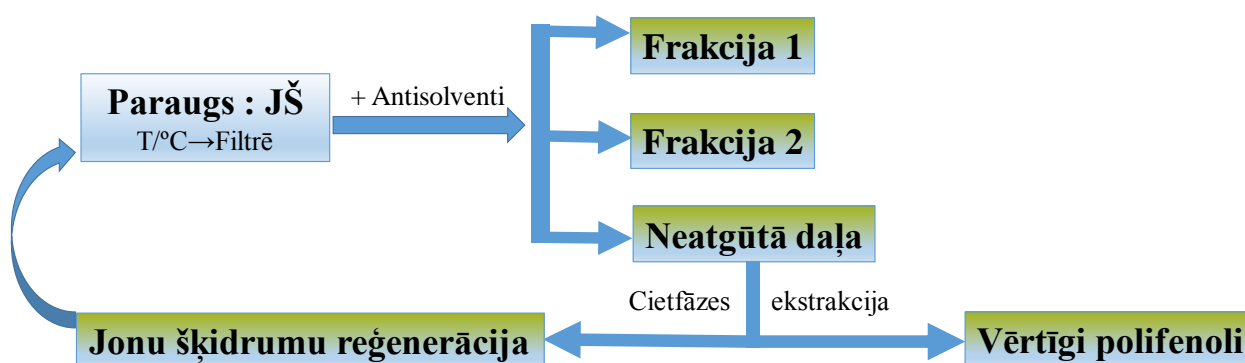
PU kompozītmateriāls bez antioksidanta ($T_{\text{sākuma}}$, = 320 °C)

Visas, ar jonu šķīdumiem iegūtās polifenolu saturošās frakcijas, dažādos testos uzrādīja labāku antioksidanto aktivitāti, salīdzinot ar neapstrādātu paraugu. Iegūtā polifenolu saturošā frakcija pēc apstrādes ar [C₄C_{1im}]OTs jonu šķīdumu uzrāda vislabāko aktivitāti visos antioksidantās aktivitātes testos, ko var skaidrot ar tās zemo molekulāro masu, augstu siringiltipa fenilpropanoīda substrukūru saturu paraugā. Salīdzinājumā ar nefrakcionētu MASL paraugu polifenolu saturošām frakcijām, kas iegūtas pēc apstrādes ar [C₄C_{1im}]OTs un [C₄C_{1im}]DMP fenilpropāna ķēdes alfa pozīcijas vietā palielinās CH₂ grupu daudzums un samazinās skābekļa atomu skaits fenilpropāna ķēdē, kas dod pozitīvu ietekmi uz antioksidanto aktivitāti. Metoksilgrupu saturs gvajacil- un siringiltipa fenilpropanoīda substrukūrā būtiski ietekmē antioksidanto aktivitāti. Ievadot paraugus kā antioksidantus poliuretāna (PU) kompozītmateriālā 2,5 % no kopējās masas, tie paaugstināja PU kompozītmateriāla izturību pret termooksidēšanos, salīdzinot ar PU kompozītmateriālu bez pievienota antioksidanta. Izmantojot kalorimetriju, noteikts, ka lignīna šķīdība ir eksotermisks process, kurā entalpijas ΔH variē no -17 ([C₄C_{1im}]Cl) līdz -35 ([C₄C_{1im}]OAc) kJ/mol (3.32. attēls).



3.32. att. MASL parauga šķīšanas JŠ procesa kalorimetrijas līknes un izdalītais siltuma daudzums

Tā kā ar darbā izmantotajiem “antisolventiem” nav iespējams atgūt visu no jonu šķīdumos izšķīdušā lignocelulozes materiāla, tad tika izstrādāta cietfāzes ekstrakcijas metode (3.33. attēlā), efektīvākai individuālu savienojumu un savienojumu grupu atdalīšanai. Šīs papildus pielietošana deva iespēju papildus reģenerēt JŠ un iegūt papildus produktus ar augstu pievienoto vērtību. Piemēram, no alkšņu mizas un priedes skuļām iegūti dihidroflavonoīdi, dihidroflavonoli, prodelfinidīni un proantocianidīni u.c. (skatīt 7. pielikumu). Frakcionējot alkšņu mizu ar JŠ tika iegūti vērtīgi polifenolu savienojumi ar plašu praktiskās izmantošanas spektru, piemēram, ferulskābes atvasinājumi (esteri ar taukspirtiem). Ferulskābei un tās atvasinājumiem piemīt bioloģiskā aktivitāte, turklāt ferulskābi plaši izmanto kā pārtikas piedevu. Paralēli proantocianidīniem, iegūti arī prodelfinidīni jeb gallokatehīna veidoti tanīnu savienojumi un arī oleuropeina atvasinājumi. Ar jonu šķīdumiem iegūtiem mazmolekulāriem polifenolu kā flavonīdu, tanīnu un ferulskābes atvasinājumu savienojumiem, piemīt plašas praktiskās izmantošanas iespējas. Tos var izmantot kā pārtikas piedevas, kosmētisko produktu sastāvdaļas un pat kā potenciālas aktīvās vielas homeopātisko farmaceitisko preparātu sastāvā. Daudzās valstīs iepriekš minēto savienojumu izmantošana šajās jomās jau ir oficiāli apstiprināta un produkti atrodas brīvā tirgus aprītē. Cietfāzes ekstrakcija ļauj efektīvi palielināt savienojumu atgūstamību no JŠ izšķīdušās daļas, ko nevar reekstrahēt ar “antisolventiem”, kā arī ļauj reģenerēt jonu šķīdumu, kas biomasas apstrādē ar jonu šķīdumiem pasaulē ir problēmjaucājums.



3.33. att. Pilnās izmantošanas shēma jonu šķīdumu reģenerācijai un vērtīgu polifenolu iegūšanai no ar “antisolventiem” neatgūtās jonu šķīdumos izšķīdušā lignocelulozes daļas

SECINĀJUMI

1. Izmantojot astoņas dažādas ekstrakcijas metodes (Soksleta, CŠE, ASE, FBE, superkritiskā CO₂, ekstrakcijas mikroviļņos un ultraskaņā, kā arī macerācija) ir pierādīts, ka perspektīvākā ir ASE lai no alkšņu mizām, ar vislabāko selektivitāti, iegūtu hidrofilās ekstraktvielas (oregonīna saturs līdz pat 75 %).
2. Vērtīgu polifenolu savienojumu iegūšanai, superkritiskās CO₂ ekstrakcijas izmantošana ir neselektīva ar mazu iznākumu, bet tā ir perspektīva kā priekšapstrādes metode, lai no augu biomasas ekstrahētu lipofilus savienojumus, aizstājot gaistošos organiskos šķīdinātājus ar CO₂ kā “zaļu” šķīdinātāju.
3. Pirmo reizi veikti pētījumi par alkšņu mizas diarilheptanoīdu saturošu ekstraktu ietekmi uz majonēzes stabilitāti pret oksidēšanos. Ievadot tos majonēzes sistēmā tikai 0,05 % no majonēzes masas, stabilitāte palielinās divas reizes salīdzinājumā ar majonēzi bez piedevām. Salīdzinot ar TBHQ kā sintētisko antioksidantu ir parādīts, ka diarilheptanoīdu saturošiem ekstraktiem, izdalītiem no alkšņiem, ir labāka stabilizēšanas spēja to perspektīvai izmantošanai kā dabiskas izcelsmes antioksidantus lipīdu saturošu pārtikas sistēmu stabilizācijā.
4. Pirmo reizi veikts diarilheptanoīdu saturošu ekstraktu satura novērtējums baltalkšņa un melnalkšņa iekšējās, ārējās un nedalītās mizās, parādot, ka baltalkšņa mizas sadalīšana iekšējā un ārējā mizā ir neefektīva, bet melnalkšņa mizas sadalīšana atkarībā no mērķsavienojumu klāsta un to tīrības pakāpes ekstraktos ir perspektīva.
5. Latvijas mitrajos mežos augušanas priedes kodolkoksnē (~ 60 g. veci koki) ir perspektīva izejviela pinosilvīnu iegūšanai. Pinosilvīna un tā atvasinājumus saturs ir 8 reizes vairāk nekā aplievā un 3 reizes vairāk nekā sausajos mežos augušu priežu kodolkoksnē. Līdz ar to priedes koksnes pārstrādes (pēc logu rāmju ražošanas) blakusprodukti ir perspektīva izejviela pinosilvīna un tā atvasinājumu ieguvei ar iznākumu vairāk nekā 2 % uz a.s. koksni.
6. Izmantojot vienpakāpes ekstrakciju ar 60 % etanola ūdens šķīdumu iegūst lielāku pinosilvīnu saturoša ekstrakta daudzumu, bet ar mazāku pinosilvīnu saturu tajā. Secīgas ekstrakcijas izmantošana ir ieteicama, lai iegūtu tīrākus pinosilvīnus, izslēdzot ekstrakta/produkta papildus attīrīšanu.
7. Ir parādīta diarilheptanoīdu un stilbenoīdu saturošu ekstraktu ieguves metodes pārnese no laboratorijas apstākļiem uz rūpnieciskiem apjomiem sadarbībā ar ekstrakcijas rūpnīcu L.E.V., tādejādi izveidojot mērķsavienojumu eksperimentālās partijas, kas tālāk jau tiek izmantotas „HEMMOS” sērijas kosmētikas līdzekļu (aizsargājošos, mitrinošos

un barojošos krēmos, SIA "FIDE"), kā arī uztura bagātinātāja "ORVITAL" ieguvē (tirgū esoši produkti, SIA "FIDE").

8. Skujkoksnes un lapkoksnes *kraft Lignoboost* tehniskie lignīni un MASL ir heterogēni pēc sastāva, kas apgrūtina to izmantošanu par izejvielām antioksidantu un citu produktu ražošanā. Ekstrakcija ar dažādiem šķīdinātājiem ļauj iegūt homogēnākus lignīna produktus ar augstu antioksidanto aktivitāti dažādās testa sistēmās. Ir parādīts, ka, to ievadišana poliuretāna kompozītmateriālā (2,5 % no kopējās masas) ievērojami stabilizē šo materiālu pret termooksidēšanās destrukciju, kā arī ir izdalīta frakcija, kurai piemīt laba savietojamība ar nepolāriem substrātiem (rapšu eļļa), kas perspektīvā varētu tikt izmantota šo sistēmu stabilizēšanai.
9. Izstrādātas metodes izvēlēto biomasas paraugu fracionēšanai ar dažādiem JŠ, optimizējot masu attiecības, temperatūru, ekstrakcijas laiku, „antisolventu” lietošanu, kā arī iegūto paraugu attīrīšanu no piemaisījumiem iegūstot vērtīgas polifenolu saturošas frakcijas ar tīrību līdz pat 99 %.
10. Mikroviļņu lietošana biomasas fracionēšanā ar JŠ samazina šķīšanas laiku. Papildus cietfāzes izmantošana ļauj no JŠ izšķīdušās neatdalītās daļas ar “antisolventiem” iegūt vērtīgus polifenolus un reģenerēt JŠ.
11. Ir sasniegta efektīvāka un ekoloģiski drošāka dažādu vērtīgu polifenolu, ar augstām antioksidanta īpašībām, ieguve no dažādiem Latvijas un ES atjaunojamiem resursiem, kuri līdz šim ir izmantoti neadekvāti to potenciālajai vērtībai, ieskaitot mežsaimniecības biomasu un ar lignīnu bagātus biorafinēšanas produktus, dodot būtisku ieguldījumu bioekonomikas attīstīšanā, kas ir aktuāla Latvijas tautsaimniecībai un atbilst Eiropas Savienības stratēģiskajiem uzdevumiem.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Ruane, J., Sonnino, A., Agostini, A. Bioenergy and the potential contribution of agricultural biotechnologies in developing countries. *Biomass Bioenergy* **2010**, *34*, 1427 - 1439.
2. Perlack, R.D., Wright, L.L., Graham, R.L., Turhollow, A. Stokes, B., Erbach, D. Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply. DOE/GO-102995-2135 or ORNL/TM- 2005/66. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, **2005**, 1 - 60.
3. Octave, S., Thomas, D. Biorefinery: toward an industrial metabolism. *Biochimie* **2009**, *91*, 659 - 664.
4. Ruth, M., Laffen, M., Timbario, A.T. Hydrogen Pathways: Cost, Well-to-Wheels Energy Use, and Emissions for the Current Technology Status of Seven Hydrogen Production, Delivery, and Distribution Scenarios. Technical Report NREL/TP-6A1-46612 September **2009**
5. Vishnu, M., Mala, R. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* **2012**, *38*, 522 - 550.
6. Erinsh, P., Cinite, V., Jakobson, M., Gravitis, J. Wood as multicomponent crosslinked polymer system. *Appl. Polymer Symp.* **1976**, *26*, 1117 - 1138.
7. Fowler, P., Krajačić, G., Lončar, D., Duić, N. Modeling the energy potential of biomass - H2RES. *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34* (16), 7027 - 7040.
8. Agbor, V.B., Ciceka, N., Sparling, R., Berlin, A., Levina, D.B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29* (6), 675 - 685.
9. Sen, A., Pereira, H., Olivella, M.A., Villaescusa, I. Heavy metals removal in aqueous environments using bark as a biosorbent. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2015**, *12*, 391 - 404.
10. McKendry, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour. Technol.* **2002**, *83*, 37 - 46.
11. Lucas, M., Macdonald, B.A., Wagner, G.L., Joyce, S.A., Rector, K.D. Ionic Liquid Pretreatment of Poplar Wood at Room Temperature: Swelling and Incorporation of Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2* (8), 2198 - 2205.
12. Yang, G., Jaakkola, P. Wood chemistry and isolation of extractives from wood. Literature study for BIOTULI project, *Saimaa University of Applied Sciences* **2011**, 1 - 28.
13. Gräsvik, I. Ionic liquids in bio-refining. Synthesis and applications. *Phd thesis*. Umeå University, **2013**
14. Kenealy, W., Houtman, C., Laplaza, J., Jeffries, T., Horn, E. Pretreatments for converting wood into paper and chemicals. *ACS Symp. Ser.* **2007**, *954*, 392 - 408.

15. Hu, G., Heitmann, J., Rojas, O. Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues. *BioResources* **2008**, *3*, 270 - 294.
16. Rowell, M.R. Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites, Second Edition, CRC Press, **2012**, 9 - 34.
17. Segneanu, A.E., Cziple, F., Vlazan, P., Sfirloaga, P., Grozescu, I., Gherman, D. V. Biomass Extraction Methods, Biomass Now - Sustainable Growth and Use, **2013**.
18. Tadesse, H., Luque, R. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4*, 3913 - 3929.
19. McCormick, K., Kautto, N. The Bioeconomy in Europe: An Overview. *Sustainability* **2013**, *5* (6), 2589 - 2608.
20. Global Bioeconomy Summit. Communiqué of the Global Bioeconomy Summit 2015 - Making Bioeconomy Work for Sustainable Development. Berlin, **2015**, 10.
21. Scarlet, N., Dallemand, J- F., Monforti-Ferrario, F., Nita, V. The role of biomass and bioenergy in a future bioeconomy: Policies and facts. *Environmental Development* **2015**, *15*, 3 - 34.
22. Schneider, U. A., McCarl, B.A. Economic Potential of Biomass Based Fuels for Greenhouse Gas Emission Mitigation. *Environmental and Resource Economics* **2003**, *24* (4), 291 - 312.
23. Vancov, T., Alston, A.S, Brown, T., McIntosh, S. Use of ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels. *Renewable Energy* **2012**, *45*, 1 - 6.
24. Kheshgi, H. S., Prince, R. C., Marland, G. The potential of biomass fuels in the context of global climate change: Focus on transportation fuels. *Annu. Rev. Energy Env.* **2000**, *25*, 199-244.
25. COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT. State of play on the sustainability of solid and gaseous biomass used for electricity, heating and cooling in the EU. EUROPEAN COMMISSION. Brussels, 28.7.2014 SWD, **2014**, 259 final
26. Cherubini, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management* **2010**, *51*, 1412 - 1421.
27. Sjostrom, E . Wood Chemistry fundamentals and applications: Academic press, inc) **1993**, 111 - 113.
28. Stark, A. Ionic liquids in the biorefinery: a critical assessment of their potential. *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4*, 19 - 32.
29. Petrus, L., Noordermeer, M. A. Biomass to biofuels, a chemical perspective. *Green chemistry* **2006**, *8*, 861 - 867.

30. Scalbert, A., Manach, C., Morand Rémésy, C., Jiménez, L. Dietary phenolic compounds and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 287 - 306.
31. Giacobbo, A., Oliveira, M., Mira, H., Duarte, E., Bernardes, A.M., de Pinho, M. Ultrafiltration based process for the recovery of polysaccharides and phenolic compounds from winery effluents. *Sep. Sci. Technol.* **2013**, *48*, 438 - 444.
32. Paraskeva, C.A., Papadakis, V.G., Tsarouchi, E., Kanellopoulou, D.G., Koutsoukos, P.G. Membrane processing for olive mill wastewater fractionation. *Desalination* **2007**, *213*, 218 - 229.
33. Pietarinen, P., Willfor, S., Ahotupa, M., Heming, J., Homlbom. B. Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *J. Wood Sci.* **2006**, *52*, 436 - 444.
34. Piwowarska, N., Gonzalez-Alvarez, J. Extraction of antioxidants from forestry biomass: Kinetics and optimization of extraction conditions. *Biomass Bioenergy* **2012**, *43*, 42 - 51.
35. Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep.* **2000**, *17*, 215 - 234.
36. Zhong, G.S., Wan, F. An outline on the early pharmaceutical development before Galen. *Chin J Med Hist.* **1999**, *29*, 178 - 182.
37. Baker, D.D., Chu, M., Oza, U., Rajgarhia, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat Prod Rep.* **2007**, *24*, 1225 - 1244.
38. Kong, D.X., Li, X.J., Tang, G.Y., Zhang, H.Y. How many traditional Chinese medicine components have been recognized by modern Western medicine? A chemoinformatic analysis and implications for finding multicomponent drugs. *ChemMedChem.* **2008**, *3*, 233 - 236.
39. Acamovic, T., Brooker, J.D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proc Nutr Soc.* **2005**, *64* (3) 403-412.
40. Gharras, H.E. Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44*, 2512 - 2518.
41. Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X., Liu, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem.* **2002**, *50* (25), 7449 - 7454.
42. Karakaya, S., El, S.N., Taş, A.A. Antioxidant Activity of Some Foods Containing Phenolic Compounds. *Int J Food Sci Nutr.* **2001**, *52*, 501 - 508.
43. Pusztai, R., Abrantes, M., Sherly, J., Duarte, N., Molnar, J., Ferreira, M.J.U. Antitumor-promoting activity of lignans: Inhibition of human cytomegalovirus IE gene expression. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 451 - 454.

44. Elinav, E., Nowarski, R., Thaiss, C.A., Hu, B., Jin, C., Flavell, R.A. Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 759 - 771.
45. Medola, J.F., Cintra, V.P., Pesqueira e Silva, É.P.C., de Andrade Royo, V., da Silva, R., Saraiva, J., Albuquerque, S., Bastos, J.K., Silva, M.L., Tavares, D.C. (-)-Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 638 - 642.
46. Umezawa, T., Okunishi, T., Shimada, M. Stereochemical diversity in lignan biosynthesis. *Wood Research: bulletin of the Wood Research Institute Kyoto University*, **1997**, *85*, 96 - 125.
47. Gordaliza, M., García, P.A., del Corral, J.M., Castro, M.A., Gómez-Zurita, M.A. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon.* **2004**, *44* (4), 441 - 459.
48. Brunow, G., Kilpelainen, I., Sipila, J., Syrjanen, K., Karhunen, P., Setala, H., Rummako, P. In: *Lignin and lignan Biosynthesis. Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin.* Ed by Lewis N.G., Sarkanen, S. American Chemical Society, Washington, **2000**, 131 - 147.
49. Rossi, D., Guerrini, A., Bruni, R., Brognara, E., Borgatti, M., Gambari, R., Maietti, S., Sacchetti, G. Trans-Resveratrol in nutraceuticals: issues in retail quality and effectiveness. *Molecules* **2012**, *17* (10), 12393 - 12405.
50. Fang, W., Hemming, J., Reunanen, M., Eklund, P., Pineiro, E.C., Poljanšek, I., Oven, P., Willför, S. Evaluation of selective extraction methods for recovery of polyphenols from pine. *Holzforschung*, **2013**, *67*, 843 - 851.
51. Willför, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., Reunanen, M.H., Eklund, P.C., Sjöholm, R.E., Eckerman, C.S., Pohjamo, S.P., Holmbom, B.R. Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *J Agric Food Chem.* **2003**, *51* (26), 7600 -7606.
52. Jančinová, V., Perečko, T., Nosál, R., Harmatha, J., Smidrkal, J., Drábiková, K. The natural stilbenoid pinosylvin and activated neutrophils: effects on oxidative burst, protein kinase C, apoptosis and efficiency in adjuvant arthritis. *Acta Pharmacol Sin.* **2012**, *33* (10), 1285 - 92.
53. Wilken, R., Veena, M.S., Wang, M.B., Srivatsan, E.S. Curcumin: A review of anti - cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer* **2011**, *10* (1), 1 - 19.

54. Claeson P., Claeson U. P., Tuchinda P., Reutrakul V. Occurrence, Structure and Bioactivity of 1,7 - Diarylheptanoids. *In Studies in Natural Products Chemistry*, **2002**, 26, 881 - 908.
55. Ramirez-Ahumada M., Del C., Timmermann B. N., Gang D. R. Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zinger officinale*): Identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry* **2006**, 67, 2017 - 2029.
56. Joo, S.S., Kim, S.G., Choi, S.E., Kim, Y.B., Park, H.Y., Seo, S.J., Choi, Y.W., Lee, M.W., Lee, D. Suppression of T cell activation by hirsutenone, isolated from the bark of *Alnus japonica*, and its therapeutic advantages for atopic dermatitis, *Eur. J. Pharmacol* **2009**, 614, 98 - 105.
57. Keseru G. M., Nogradi M. The chemistry of Natural Diarylheptanoids. *In Studies in Natural Products Chemistry* **1995**, 17, 357 - 393.
58. O'Rourke, C., Byres, M., Delazar, A., Kumarasamy, Y., Nahar, L., Stewart, F., Sarker, D. Hirsutanonol, oregonin and genkwanin from the seeds of *Alnus glutinosa* (*Betulaceae*). *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, 33, 749 - 752.
59. Ma, J., Jin, X., Yang, L., Liu, Z. L. Diarylheptanoids from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry* **2004**, 65, 1137 - 1143.
60. Kaewamatawong, R., Boonchoong, P., Teerawatanasuk, N. Diarylheptanoids from *Curcuma comosa*. *Phytochem. Lett.* **2009**, 2, 19 - 21.
61. Gellerstedt, G., Önnerrund, H. Inhomogeneities in the chemical structure of hardwood lignins. *Holzforschung* **2003**, 57, 255 - 265.
62. Braun, F. E. The Chemistry of Lignin. Acad Press: New York, **1952**, 808.
63. Brunow, G., Lundquist, G. Functional Groups and Bonding Patterns in Lignin (Including the Lignin-Carbohydrate Complexes) Lignin and Lignans Advances in Chemistry Edited by Cyril Heitner, Donald R. Dimmel and John A. Schmidt CRC Press **2010**, 267 - 299.
64. Ralph, J., Brunow, G., Boerjan, W. Lignins. John Wiley & Sons, Ltd. (**2007**)
65. Glasser, W. G.; Northey, R. A.; Shultz, T. P. Lignin: historical, biological and materials perspectives. *Am. Chem. Soc.* **2000**, 27, 14 - 15.
66. Boudet A. M.; Kajita S.; Grima-Pettenati J.; Goffner D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends Plant Sci.* **2003**, 8, 576 - 581.
67. Rencoret. J., Marques, G., Gutierrez, A., Nieto, L., Barbero, J.J., Martinez, A.T., del Rio, J.C. Isolation and structural characterization of the milled-wood lignin from *Paulownia fortunei* wood. *Ind.Crop.Prod.* **2009**, 30 (1), 137 - 143.

68. Lora, J., Naceur, B.M., Gandini, A. Industrial Commercial Lignins: Sources, Properties and Applications. In: Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources, Eds. Naceur, B.M., Gandini, A. Elsevier, Amsterdam, **2008**, 225 - 241.
69. Lora, H. J., Glasser, W. G. Recent industrial applications of lignin: A sustainable alternative to non - renewable materials. *J. Polym. Environ.* **2002**, *10*, 39 - 48.
70. Haveren, J., Scott, E.L., Sanders, J. Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **2008**, *2*, 41 - 57.
71. Gärtner, A., Gellerstedt, G., Tamminen, T. Determination of phenolic hydroxyl groups in residual lignin using a modified UV - method. *J. Nord. Pulp Pap. Res.* **1999**, *14*, 163 - 170.
72. Gandini, A. Lignins as macromonomers in the synthesis of polymeric materials. In International Forum on Market of Sulphur - free Lignin, Saint Martin, France, **1991**, 63 - 64.
73. Fengel, D., Wegener, G. Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter. Berlin - New York, **1984**, 512.
74. Gellerstedt, G., Lindorfs, L. In Structural changes in lignin during kraft cooking. 4: Phenolic hydroxyl groups in wood and kraft pulp. Svensk. Papperstidn., **1984**, 115 - 118.
75. Sjöström, E., Alén, R.. Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking, Springer-Verlag Berlin, **1998**
76. Rautakivi, A. Availability of woody biomass for biorefining in Europe. NWBC-2009 Proceedings of the 2nd Nordic Wood Biorefinery Conference, Helsinki, Finland, September 2 - 4, **2009**, 7 - 13.
77. Pouteau, C., Cathala, B., Dole, P., Kurek, B., Monties, B. Structural modification of Kraft lignin after acid treatment: characterization of the apolar extracts and the influence on the antioxidant properties in polypropylene. *Ind. Crops Prod.* **2005**, *21*, 101 - 108.
78. Vishtal, A., Kraslawski, A. Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources* **2011**, *6*, 3547 - 3568.
79. Tomani, P. The LignoBoost process. *Cellulose Chem. Technol.* **2010**, *44*, 53 - 58.
80. Norberg, I. Carbon fibres from kraft lignin. Doctoral Thesis. KTH. Stockholm 2012
81. Berglin, N., Tomani, P., Salman, H., Herstad Svard S., Amand L.E. Pilot Scale Combustion Studies with Kraft Lignin as a Solid Biofuel. Tappi Engineering Pulping and Environmental conference, August 24-27, **2008**, Portland, Oregon USA, 197 - 202.
82. Haslam, E., Cai, Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 41 - 66.
83. Porter, L.J. Tannins. Methods in Plant Biochemistry-Plant Phenolics, Series Ed. P.M. Dey and J.B. Harbone, Academic Press, London, 1, **1989**, 390

84. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouysgu A.L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**, 50 (3), 555 - 778.
85. Kashiwada, Y., Nonaka, G.I., Nishioka, I., Ballas, L.M., Jiang, J.B., Janzen, W.P., Lee, K.H. Tannins as selective inhibitors of protein kinase C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1992**, 2, (3), 239 - 244.
86. Sprugin, V. G., Kuznecova, N. Oligomeric proanthocyanidin complex as perspective regulators of metabolic disturbances at alcohol abuse. Pacific Oceanological Institute: Vladivostok, **2006**, 2, 81.
87. Teliševa, G., Dižbite, T., Bikovens, O., Krasilņikova, J. Baltalkšņa miza kā izejviela bioloģiski aktīvu polifenolu, ķimikāliju un sorbentu iegūšanai. In: Lapu koku audzēšanas un racionālas izmantošanas pamatojums, jauni produkti un tehnoloģijas Rīga, **2009**, 170 - 173.
88. Burbulis, I. E., Winkel-Shir, B. Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **1999**, 96 (22), 12929 - 12934.
89. Hanawa, F., Tower, G. Flavones from *Alnus Rubra* Bong seed coat. *Bulletin of FPRI*, **2003**, 387, 85 - 91.
90. Ferreira, D., Bekker, R. Oligomeric Proanthocyanidins: Naturally Occurring O-Heterocycles. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 193 - 212.
91. Bandele, O.J., Osheroff, N. (-)-Epigallocatechin Gallate, A Major Constituent of Green Tea, Poisons Human Type II Topoisomerases. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21, 936 - 943.
92. Clark, J.H., Deswarte, F.E.I., Farmer, T.J. The integration of green chemistry into future biorefineries. *Biofuels Bioprod Bioref.* **2009**, 3, 72 - 90.
93. Gronnow, M.J. White, R.J. Clark, J.H. Macquarrie, D.J. Energy efficiency in chemical reactions: a comparative study of different reaction techniques. *Org Process Res Dev.* **2005**, 9, 516 - 518.
94. Gathergood, N. Recent Advances in Green Chemistry. Chapter 2. The role of green chemistry in biomass processing and conversion. Edited Haibo Xie. Wiley, **2013**, 27 - 38.
95. Chemat, F., Vian, M A., Cravotto, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 8615 - 8627.
96. Huang, H.J., Ramaswamy, S., Tschirner, U.W., Ramarao, B.V. A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Sep Purif Technol.* **2008**, 62, 1- 21.
97. Huber, G. W., Dumesic, J. A. An overview of aqueous-phase catalytic processes for production of hydrogen and alkanes in a biorefinery. *Catal. Today* **2006**, 111, 119 - 32.

98. <https://www.iea.org/search/?q=biorefinery#gsc.tab=0&gsc.q=biorefinery&gsc.page=1>
99. Backlund, I., Karlsson, L., Mattsson, L., Bergsten, U. Biorefinery product potentials using tree biomass as feedstock - A survey on opportunities and threats to the new wood products industry. *Biomass and bioenergy*, **2014**, 70, 207 - 216.
100. Mikkola, J-P., Sklavounos, E., King, A. W. T., Virtanen, P. The Biorefinery and Green Chemistry, in *Ionic Liquids in the Biorefinery Concept: Challenges and Perspectives*, RSC *Green Chemistry* **2015**, 36, 1 - 37.
101. Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R., Tschaplinski, T. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science* **2006**, 311, 484 - 489.
102. Bert, V., Neu, S., Zdanevitch, I., Friesl-Hanl, W., Collet, S., Gaucher, R., Puschenreiter, M., Müller, I., Kumpiene, J. How to manage plant biomass originated from phytotechnologies? Gathering perceptions from end-users. *Int J Phytoremediation*. **2017**, Mar 21:0. doi: 10.1080/15226514.2017.1303814. [Epub ahead of print]
103. Harvey, D. *Modern analytical chemistry*. The McGraw-Hill Companies: **2000**.
104. Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, 48 (8), 3713 - 3729.
105. Gião, M. S., Pereira, C. I., Fonseca, S. C., Pintado, M. E., Malcata, F. X. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia sp.* and *Satureja montana*. *Food Chemistry* **2009**, 117 (3), 412 - 416.
106. Co, M., Koskela, P., Eklund-Akergren, P., Srinivas, K., King, J. W., Sjöberg, P. J. R., Turner, C. Pressurized liquid extraction of betulin and antioxidants from birch bark. *Green Chemistry* **2009**, 11, (5), 668 - 674.
107. Pandey, A., Negi, S., Binod, P., Larroche, C. *Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies*; Elsevier: Amsterdam, **2015**, 206 - 222.
108. Mussatto, S.I. *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*; Elsevier: Amsterdam, **2016**, 447 - 450.
109. Waterman, P., Mole, S. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, Blackwell, Scientific Publications, Oxford, 1994
110. Ambrosino, P., Fresa, R., Fogliano, V., Monti, S.M., Ritieni, A., Extraction of azadirachtin A from neem seed kernels by supercritical fluid and its evaluation by HPLC and LC/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47 (12), 5252 - 5256.

111. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **2013**, *117*, 426 - 436.
112. Luque de Castro, M.D., Garcia-Ayuso, L.E.,. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* **1998**, *369* (1-2), 1 - 10.
113. Plaza, M., Turner, C. Pressurized hot water extraction of bioactives. *Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *71*, 39 - 54.
114. Herrero, M., Puyana, M.C., Jose, J.A., Ibanez, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, **2013**, *43*, 67 - 83.
115. Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry* **2006**, *98*, (1), 136 - 148.
116. Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J.A., Castro-Puyana, M. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. In: Hayes, M. (Ed.), *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. Springer, **2012**, 55 - 98.
117. Polyphenol Market by Product Type (Apples, Green Tea, Grape Seed, and Others) and Application (Functional Beverages, Functional Food, Dietary Supplements, and Others) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, (2014-2022). Available from: <https://www.alliedmarketresearch.com/polyphenol-market> Accessed 2017 January
118. Ameer, K., Shahbaz, H.M., Kwon, J-Ho. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2017**, *16*, 295 - 315.
119. Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J. Agric. Food. Chem.* **2009**, *57* (11), 4988 - 4994.
120. Mendiola, J.A., Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1152*, 234 - 246.
121. Cowan M., Plant Products as Antimicrobial Agents. *J. Clin. Microbiol. Reviews* **1999**, *12* (4), 564 - 582.
122. Wijekoon, M.M.J.O., Bhat, R., Karim, A.A. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etilingera elatior* Jack.) inflorescence. *Journal of Food Composition and Analysis* **2011**, *24*, 615 - 619.

123. Gurjar, M.S., Ali, S., Akhtar, M., Singh, K.S. Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences* **2012**, 3 (3), 425 - 433.
124. Nascimento dos Santos, F., de Oliveira, T.A., Lima, K.C.S., de Andrade, J.I.A., da Silva, D.X., Amaral, L.V., Moya, H.D., Ronchi-Teles, B., Matsuura, T., Nunez, C.V. *Montrichardia linifera* (Araceae) biological potential, phytochemical prospection and polyphenol content. *Univ. Sci.* **2014**, 19 (3), 213 - 224.
125. Ding, L., Zuo, Q., Li, D., Fang, X., Gao, X., Zhao, F., Qiu, F. A new phenone from the roots of *Paeonia suffruticosa* Andrews. *Nat.Prpd.Res.* **2017**, 31 (3), 253 - 260.
126. Camel, V., Recent extraction techniques for solid matrices - supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave -assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst.* **2001**, 126 (7), 1182 - 1193.
127. Routray, W., Orsat, V. Microwave - Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food Bioprocess Technol.* **2012**, 5, 409 - 424.
128. Brunner, G., Mass transfer from solid material in gas extraction. *Ber.Bunsenges. Physical Chemistry*, **1984**, 88, 887 - 891.
129. Gil-Chavez, G.J., Villa, J.A., Ayala-Zavala, J.F., Heredia, J.B., Sepulveda, D., Yahia, E.M., Gonzalez-Aguilar, G.A. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2013**, 12, 5 - 23.
130. Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International centre for science and high technology. *Trieste* **2008**, 21 - 33.
131. Caverio, S., García-Riscoa, M.R., Marína, F.R., Jaimea, L., Santoyoa, S., Señoránsa, F.J., Regleroa, G., Ibañezb, E. Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano: Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays. *The Journal of Supercritical Fluids* **2006**, 38 (1), 62 - 69.
132. Daood, H.G., Illes, V., Gnayfeed, M.H., Meszaros, B., Horvath, G., Biacs, P.A. Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and subcritical propane. *J. Supercrit. Fluids* **2002**, 23, 143 - 152.
133. Hawthorne, S.B. Analytical-scale supercritical fluid extraction. *Anal. Chem.* **1990**, 62 (11), 633 - 642.
134. Huang, Z., Shib, X.H., Jiang, W.J. Theoretical models for supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A* **2012**, 1250, 2 - 26.

135. Zabot, G. L., Moraes, M. N., Meireles, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Botanic Matrices: Experimental Data, Process Parameters and Economic Evaluation. *Recent Patents on Engineering*, **2012**, *6*, 182 - 206.
136. Diaz-Maroto, M.C., Perez-Coello, M.S., Cabezudo, M.D. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices: comparison with simultaneous distillation - extraction. *J. Chromatogr. A*. **2002**, *947*, 23 - 29.
137. Ju, Z.Y., Howard, L.R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5207 - 5213.
138. Kikuchi, Y., Kawamura, F., Ohira, T., Yatagai, M. Accelerated Solvent Extraction of Taxanes Compounds from *Taxus cuspidate*. *Journal of the Japan Wood Research Society* **1997**, *43* (11), 971 - 974.
139. Pinker, A., Marsh, K.N., Pang, S., Staiger M. P. Ionic Liquids and Their Interaction with Cellulose. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6712 - 6728.
140. Yang, L., Sun, X., Yang, F., Zhao, C., Zhang, L., Zu, Y. Application of Ionic Liquids in the Microwave-Assisted Extraction of Proanthocyanidins from *Larix gmelini* Bark. *Int J. Mol. Sci.* **2012**, *13* (4), 5163 - 5178.
141. Schrems, M., Brandt, A., Welton, T., Liebner, F., Rosenau, T., Potthast, A. Ionic liquids as media for biomass processing: opportunities and restrictions. *Holzforshung* **2011**, *65*, 527 - 533.
142. Han, D., Row, K.H. Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology. *Molecules* **2010**, *15*, 2405 - 2426.
143. Achinivu, E.C., Howard, R.M., Li, G., Gracz, H., Wesley A. Henderson, W.A. Lignin extraction from biomass with protic ionic liquids. *Green Chem.* **2014**, *16*, 1114 - 1119.
144. Yoo, C.G., Yunqiao Pu, Y., Ragauskas, A.J. Ionic liquids: Promising Green Solvents for Lignocellulosic Biomass Utilization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2017**, *5*, 5 - 11.
145. Zhanga, H.F., Yangb, X.H., Wangc, Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, **2011**, *22*, 672 - 688.
146. Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. Microwave Assisted Extraction - An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews* **2007**, *1* (1), 7 - 18.

- 147.Chan, C.H., Yusoff, R., Ngoh, G.C. Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering research and design* **2014**, 92 (6), 1169 - 1186.
- 148.Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **2013**, 18, 2328 - 2375.
- 149.Zhou, H.Y., Liu, C.Z. Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1129, 135 - 139.
- 150.Teh, S.S., Niven, B.E., Bekhit, A. El-Din A., Carne, A., Birch, J. Optimization of Polyphenol Extraction and Antioxidant Activities of Extracts from Defatted Flax Seed Cake (*Linum usitatissimum L.*) Using Microwave-assisted and Pulsed Electric Field (PEF) Technologies with Response Surface Methodology. *Food Sci. Biotechnol.* **2015**, 24 (5), 649 - 1659.
- 151.Ruan, G.H., Li, G.K. The study on the chromatographic fingerprint of Fructus xanthii by microwave assisted extraction coupled with GC-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2007**,1;850(1-2), 241 - 248.
- 152.Tatke, P., Jaiswal, Y. An Overview of Microwave Assisted Extraction and its Applications in Herbal Drug Research. *Research Journal of Medicinal Plant* **2011**, 5 (1), 21 - 31.
- 153.Han, Y.X., Wang, G.N., Shi, Z.Z., Wang, F. Comparison of Microwave Method with Traditional Method to Extract Tea Polyphenols. *Advanced Materials Research* **2014**, 933, 183 - 186.
- 154.Bouras, M., Chadni, M., Barba, F.J., Grimi, N., Bals, O., Vorobiev, E. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Quercus bark. *Industrial Crops and Products* **2015**, 77, 590 - 601.
- 155.Letellier, M., Budzinski, H. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis* **1999**, 27, 259 - 271.
- 156.Tumuluru, J.S., Sokhansanj, S., Hess, J.R., Wright, C.T., Boardman, R.D. A review on biomass torrefaction process and product properties for energy applications. *Industrial Biotechnology* **2011**, 7 (5), 384 - 401.
- 157.Prins, M.J., Ptasiński, K.J., Janssen, F.G.G.J. Torrefaction of wood: Part 1. Weight loss kinetics. *J. Anal Appl Pyrolysis* **2006**, 77 (1), 28 - 34.
- 158.Shoulaiifar, T.K., DeMartini, N., Willför, S., Pranovich, A., Smeds, A.I., Virtanen, T.A.P., Maunu, S-L., Verhoeff, F., Kiel, J.H.A., Hupa, M. Impact of Torrefaction on the Chemical Structure of Birch Wood. *Energy Fuels* **2014**, 28, 3863 - 3872.

159. Luthria, D.L., Mukhopadhyay, S., Kwansa, A.L. A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. *Science of Food and Agriculture* **2006**, *86* (9), 1350 - 1358.
160. Koel, M., Kaljurand, M. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78* (11), 1993 - 2002.
161. Kamboj, A., Gupta, R., Rana, A., Kaur, R. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from extracts of *Terminalia Bellerica*. *Ejbps.* **2015**, *2* (3), 201 - 215.
162. Wang, D., Lu, J., Miao, A., Xie, Z., Yang, D. HPLC-DAD-ESI-MS/MS Analysis of Polyphenols and Purine Alkaloids in Leaves of 22 Tea Cultivars in China, *J. Food Comp. Anal.* **2008**, *21*, 361 - 369.
163. Vlietinck, A.J., Aper, S. Biological Screening Methods in the search for Pharmacologically Active Natural Products. In: *Bioactive Compounds from Natural Sources*; Tringali, C. Ed.; Taylor&Francis: London, **2001**, 39 - 40.
164. Liimatainen, J., Karonen, M., Sinkkonen, J., Helander, M., Salminen, J.P. Characterization of Phenolic Compounds from Inner Bark of *Betula pendula*. *Holzforschung* **2012**, *66*, 171 - 181.
165. Boeriu C. G., Bravo D., Gosselink R. J. A., Van Dam J. E. G. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Ind. Crops prod.* **2004**, *20*, 205 - 218.
166. Lin S. Y., Dence C. W. *Methods in lignins chemistry*; Springer Verlag: Berlin – Heidelberg, **1992**, 577
167. Faix, O. Condensation indices of lignins determined by FTIR-spectroscopy. *Holz Roh Werkst.*, **1991**, *49* (9), 356.
168. Scholze B., Hanser C., Meier D. Characterization of the water - insoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolytic lignin) Part II. GPC, carbonyl groups, and ¹³C-NMR. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2001**, *58*, 387 - 400.
169. Pranovich, A. V., Reunanen, M., Sjöholm, R., Holmbom, B. Dissolved lignin and other aromatic substances in thermomechanical pulp waters. *J. Wood Chem. Techn.* **2005**, *25*, 109 - 132.
170. Carmen G., Dominique B., Gosselink R.J.A., van Dam E.G. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Ind. Crops Prod.* **2004**, *20* (2), 205 - 218.

171. Guerra, A., Filpponen, I., Lucia, L.A., Argyropoulos, D.S. Comparative Evaluation of Three Lignin Isolation Protocols for Various Wood Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 9696 - 9705.
172. Ancos, B., Gonzalez, E.M., Cano, M.P. Ellagic Acid, Vitamin C, and Total Phenolic Contents and Radical Scavenging Capacity Affected by Freezing and Frozen Storage in Raspberry Fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4565 - 4570.
173. Lucini, L., Pellizzonia, M., Pellegrino, R., Molinari, G.P., Colla, G. Phytochemical constituents and *in vitro* radical scavenging activity of different Aloe species. *Food Chemistry* **2015**, *170* (1), 501 - 507.
174. Heo, B.G., Park, Y.J., Park, Y.S., Bae, J.H., Cho, J.Y., Park, K., Jastrzebski, Z., Gorinstein, S. Anticancer and antioxidant effects of extracts from different parts of indigo plant. *Ind Crop Prod.* **2014**, *56*, 9 - 16.
175. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* **1995**, *28*, 25 - 30.
176. Balasundram, N., Kalyana Sundram, K., Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri - industrial by - products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **2006**, *99*, 191 - 203.
177. Dagne, E., Bistrat, D., Viljoen, A., van Wyk, B.E. Chemistry of Aloe Species. *Current Organic Chemistry*, **2000**, *4* (10), 1055 - 1078.
178. Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* **2004**, *84*, 551 - 562.
179. Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chemistry*, **2005**, *53*, 4290 - 4302.
180. Pisoschi, A.M., Negulescu, G.P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem & Anal Biochem.* **2011**, *1*, (1),
181. Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J. M., Diaz-Alperi, J. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **2002**, *34*, 37 - 46.
182. Chaves, S., Canário, S., Carrasco, M. P., Mira, L., Santos, M. A. Hydroxy(thio)pyrone and hydroxy(thio)pyridinone iron chelators: Physico-chemical properties and anti-oxidant activity. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *114*, 38 - 46.
183. Vaganek, A., Rimarčík, J., Lukeš, V., Klein, E. On the energetics of homolytic and heterolytic O-H bond cleavage in flavonoids. *Comput. Theor. Chem.* **2012**, *991*, 192 - 200.

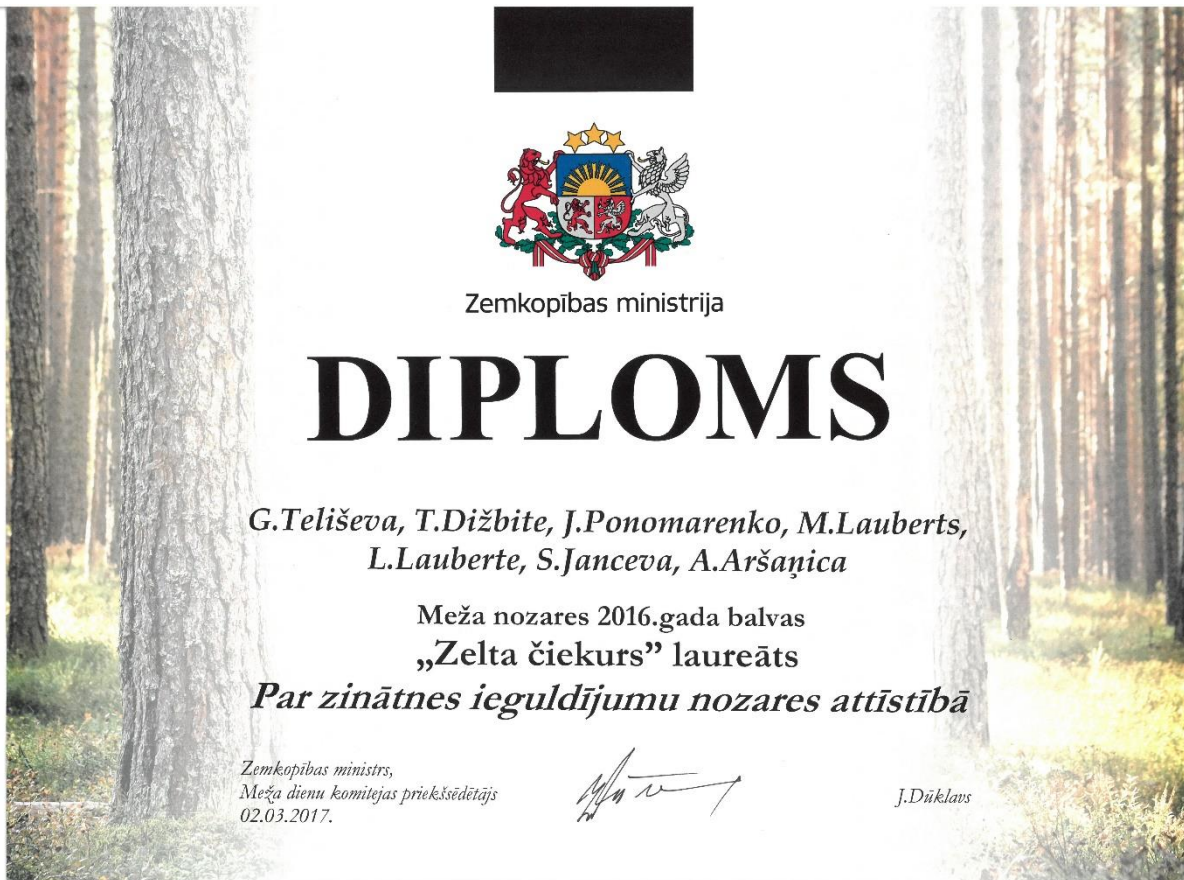
184. Sjöström, E. Wood chemistry. Fundamentals and Applications; Academic Press, Inc., **1993**, 111 - 113.
185. Tokareva, E. N., Pranovich, A. V., Fardim, P., Daniel, G., Holmbom, B. Analysis of wood tissues by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Holzforschung* **2007**, 647 - 655.
186. Thring R. W., Griffin S. L. The heterogeneity of two Canadian kraft lignins. *Can. J. Chem.* **1995**, 73, 629 - 631.
187. Zaķis Ģ. Lignīnu un to atvasinājumu funkcionālā analīze; Zinātne: Rīga, **1987**, 182 - 183.
188. Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **2008**, 76, 965 - 977.
189. Droša pārtikas apstrāde: kopīgi standarti ekstrakcijas šķīdinātājiem. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/LV/TXT/?uri=LEGISSUM:sa0022> skatīts 21.07. 2017
190. Ahmad, A., Alkarkhi, A. F. M., Hena, S., Siddique, B. M., Dur, K. W. Optimization of Soxhlet Extraction of *Herba Leonuri* Using Factorial Design of Experiment. *International Journal of Chemistry* **2010**, 2, 198 - 205.
191. Willför, S., Nisula, L., Hemming, J., Reunanen, M., Holmbom, B. Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 2: Knots and stemwood of fir species. *Holzforschung*, **2004**, 58, 650 - 659.
192. Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technol. Biotechnol.* **2013**, 51 (1), 84 - 91.
193. Klarić, M., Oven, P., Gorišek, Z., Španić, N., Pervan, S. Yield of Stirred Cold Maceration and Extraction of Milled European Black Alder Wood and Bark using Different Solvents. *BioResources* **2016**, 11 (4), 9244 - 9254.
194. Gava, A.F., Simandi, B., Plander, Sz., Sxarka, Sz., Szoke, E., Kery, A. Betulaceae and Plantanaceae Plants as Alternative Sources of Selected Lupane-Type Triterpenes. Their Composition Profile and Betulin Content. *Acta Chromatographica* **2009**, 21, 671 - 681.
195. Hakkila, P. Utilization of Residual Forest Biomass. *Springer Science & Business Media*, **2012**, 568, 163 - 167.
196. Vergara-Salinas, J.R., Pérez-Jiménez, J., Torres, J.L., Agosin, E., Pérez-Correa, J.R. Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (*Thymus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (44), 10920 - 10929.

197. Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škergeta, M., Knez, Ž., Bren, U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **2016**, *11*;21(7). pii: E901. doi: 10.3390/molecules21070901.
198. Fuchino, H., Konishi, S., Satoh, T., Yagi, A., Saitsu, K., Tatsumi, T., Tanaka, N. Chemical Evaluation of Betula Species in Japan. II. Constituents of Betula platyphylla var. japonica. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1033 - 1038.
199. Li, K., Geng, X., Simonsen, J., Karchesy, J. Novel wood adhesives from condensed tannins and polyethylenimine. *International Journal of Adhesion & Adhesives* **2004**, *24*, 327 - 333.
200. Fine, A.M. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Alternative Medicine Review.* **2000**, *5* (2), 144 - 151.
201. Janceva, S., Lauberte, L., Dizhbite, T., Krasilnikova, J., Telysheva, G., Dzenis, M. (2017) Protective effects of proanthocyanidins extracts from the bark of deciduous trees in lipid systems. *Holzforschung* **2017**, *71*, 675 - 680.
202. Bikovens, O., Roze, L., Pranocich, A., Peunanen, M., Telyshev, G. Characterization of chemical composition of lipophilic extractives from grey alder (*Alnus incana*). *BioResources* **2013**, *8* (1), 350 - 357.
203. Conde, E., Fang, W., Hemming, J., Willför, S., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C. Water - Soluble Components of Pinus pinaster Wood. *BioResources* **2013**, *8*, 2017 - 2063.
204. Hovelstad, H., Leirset I., Oyaas, K., Fiksdahl, A. Screening analysis of pinosylvin stilbenes, resin acids and lignans in Norwegian conifers. *Molecules* **2006**, *11*, 103 - 114.
205. Forests for all forever <https://ic.fsc.org/en/fsc-system> skatīts 21.07. 2016
206. Arvela, P.M., Anugwom, I., Virtanen, P., Sjoholm, R., Mikkola, J.P. Dissolution of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids-A review. *Industrial Crops and Products* **2010**, *32*, 175 - 201.
207. Dong, Y., Lin-Xin, Z., Tong-Qi, Y., Xin-Wen, P., Run-Cang, S. Studies on the structural characterization of lignin, hemicelluloses and cellulose fractionated by ionic liquid followed by alkaline extraction from bamboo. *Industrial Crops and Products* **2013**, *43*, 141 - 149.
208. Kline, L.M., Hayes, D.G., Womac, A.R., Labbe, N. Simplified determination of lignin content in hard and soft woods via UV spectrometric analysis of biomass dissolved in ionic liquids. *BioResources* **2010**, *5* (3), 1366 - 1383.
209. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/LV/TXT/?qid=1471863102250&uri=CELEX:02006R1881-20160401>

PIELIKUMI

1. PIELIKUMS

Meža nozares 2016 gada balva



Zemkopības ministrs,
Meža dienu komitejas priekšsēdētājs
02.03.2017.

J.Dūklavs

2. PIELIKUMS

Kodolkoksne esošo atzarojumu vietu daudzumu atšķirība dažādos rūpnieciskās pārstrādes (pēc logu rāmju ražosanas) blakusproduktos



3. PIELIKUMS

Diarilheptanoīdu saturoša alkšņu mizas ekstrakta iegūšanas metodika/protokols

1. Pieļaujama izejvielas (mizas) mitrums līdz 10 %.
2. Nosver 20 g parauga un pārnes kolbā, tad aplej ar 120 mL šķīdinātāja – heksāna. Kolbas saturu ekstrahē 40 minūtes 65 - 70 °C temperatūrā ar atteces dzesinātāju. Pēc pirmās ekstrakcijas nedaudz atdzesē, saturu filtrē un mizu mazgā ar nelielu daudzumu šķīdinātāja (tīru heksānu). Šo ekstrakcijas ciklu (ekstrakcija, filtrēšana un mazgāšana) atkārto četras reizes (4 x 40 min).
3. Pēc ekstrakcijas ar heksānu mizu nosusina, velkmes skapī ik pa brīdim apmaisot, lai atbrīvotos no heksāna atlikuma.
4. Nosusināto mizu tālāk ekstrahē ar etilacetātu 75 - 80 °C temperatūrā. Ekstrakcijas režīms (laiks, šķīdinātāju daudzums un ciklu skaits) ir tāds pats kā ekstrakcijai ar heksānu (4 x 40 min, 4 x filtrē un mazgā ar tīru šķīdinātāju etilacetātu). Izekstrahēto mizu nofiltrē un nosusina velkmes skapī, lai atbrīvotos no etilacetāta, ik pa laikam apmaisot mizu.
5. Iegūto ekstraktu ietvaicē (pazeminātā spiedienā, lai temperatūra nepārsniegtu 50 °C) līdz tiek nodestilēts viss šķīdinātājs.
6. Ietvaicēto ekstraktu šķīdina 40 % etanola ūdens šķīdumā 1 : 5, izkrīt zaļas krāsas nogulsnes (lipofīli savienojumi), tās atdala filtrējot. Nogulsnes tālāk netiek izmantotas.
7. Nofiltrēto ekstraktu ietvaicē līdz tiek nodestilēts etanols, lai ūdens ekstraktu būtu iespējams liofilizēt.
8. Ietvaicēto ekstraktu liofilizē sausu ekstraktvielu (bagātu ar diarilheptanoīdiem) iegūšanai.

4. PIELIKUMS

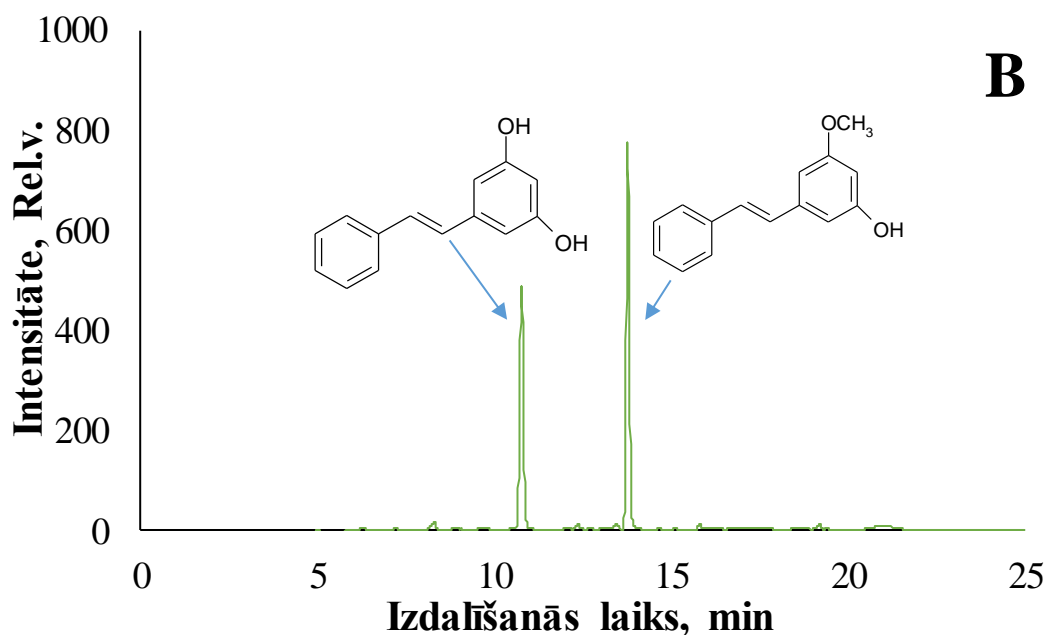
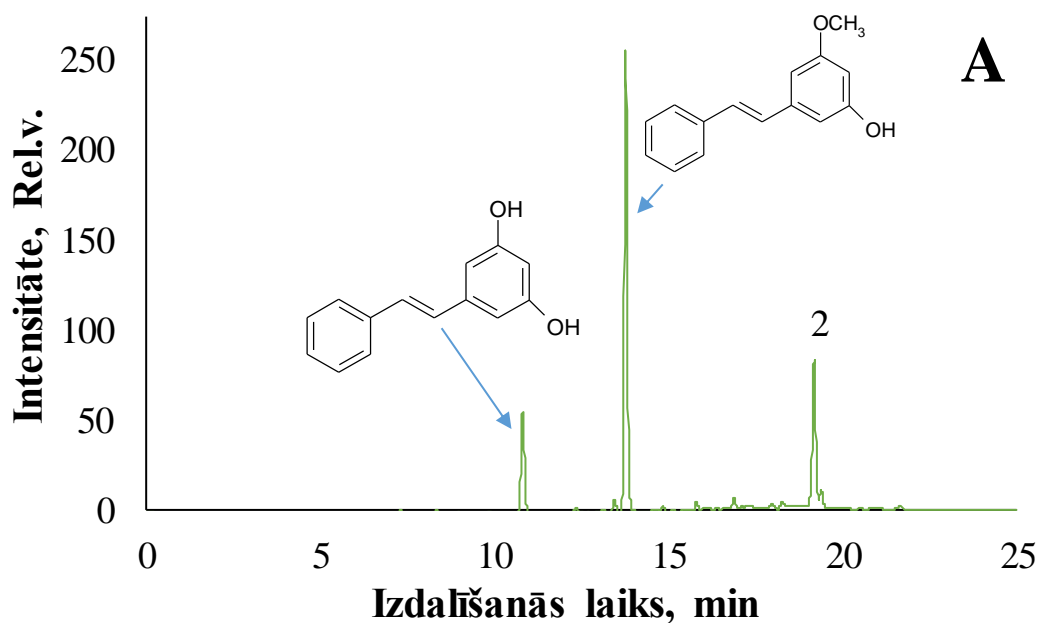
60 % etanola ūdens ekstrakta, PS un PSM, iznākums uz a.s. koksni atkarībā no parauga ievākšanas vietas, morfoloģiskās daļas un augstuma

Priedes koksnes apzīmējums	60% EtOH iznākums, w/w, %	PS saturs (%) a.s. koksnē	PSM saturs (%) a.s. koksnē	Priedes koksnes apzīmējums	60% EtOH iznākums, w/w, %	PS saturs (%) a.s. koksnē	PSM saturs (%) a.s. koksnē
1SKZ	0,93	0,01	0,01	1SAZ	0,93	+	+
1SKS	1,28	0,13	0,30	1SAS	1,71	0,08	0,15
1SKR	1,84	0,30	0,53	1SAR	2,28	0,08	0,15
2SKZ	1,49	0,16	0,47	2SAZ	1,29	0,12	0,24
2SKS	1,51	0,19	0,46	2SAS	1,30	0,02	+
2SKR	2,21	0,28	0,67	2SAR	2,12	0,07	0,15
3SKZ	1,48	0,10	0,22	3SAZ	1,02	0,01	+
3SKS	1,27	0,12	0,29	3SAS	1,20	0,08	0,14
3SKR	2,58	0,17	0,48	3SAR	1,63	0,08	0,14
1MKZ	1,29	0,31	0,41	1MAZ	1,31	+	+
1MKS	2,31	0,42	0,43	1MAS	1,29	0,14	0,12
1MKR	2,50	0,63	0,53	1MAR	1,69	+	+
2MKZ	2,21	0,30	0,57	2MAZ	1,10	0,01	0,02
2MKS	2,90	0,66	0,80	2MAS	0,92	0,01	0,01
2MKR	3,23	0,80	0,91	2MAR	1,85	+	+
3MKS	1,76	0,27	0,36	3MAZ	1,82	+	+
3MKZ	2,02	0,40	0,32	3MAS	2,12	0,07	0,07
3MKR	3,08	0,75	0,64	3MAR	2,10	0,24	0,18

S – sausais mežs; M – mitrais mežs; K – kodolkoksne, A- aplieva,
 Z – 4 m augstums no koka apakšas; S – 2,5 m; R– 0,5 m
 + - zem detektēšanas robežas

5. PIELIKUMS

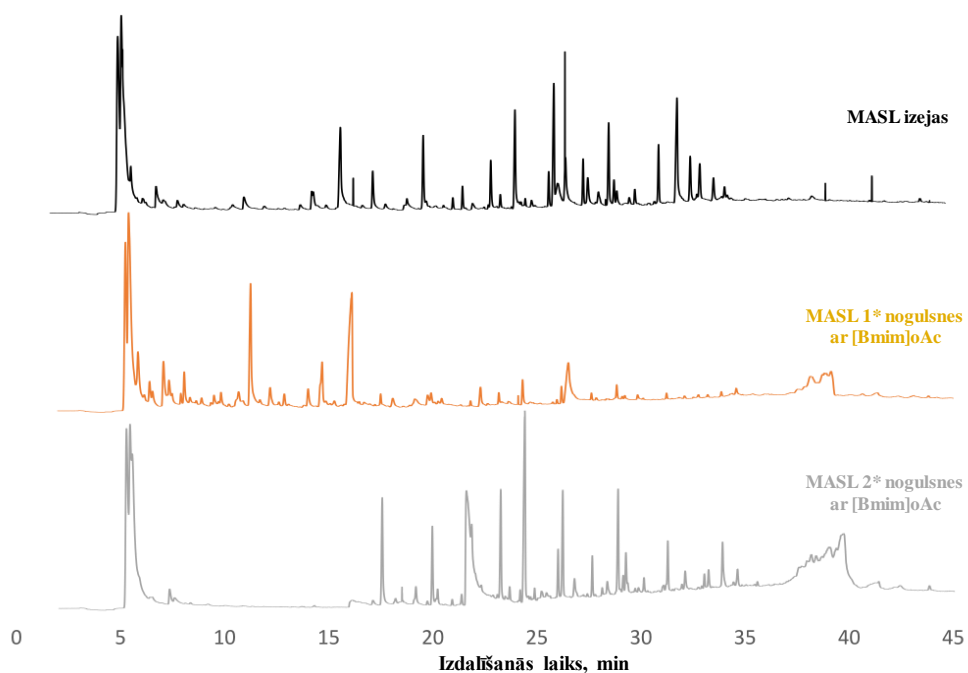
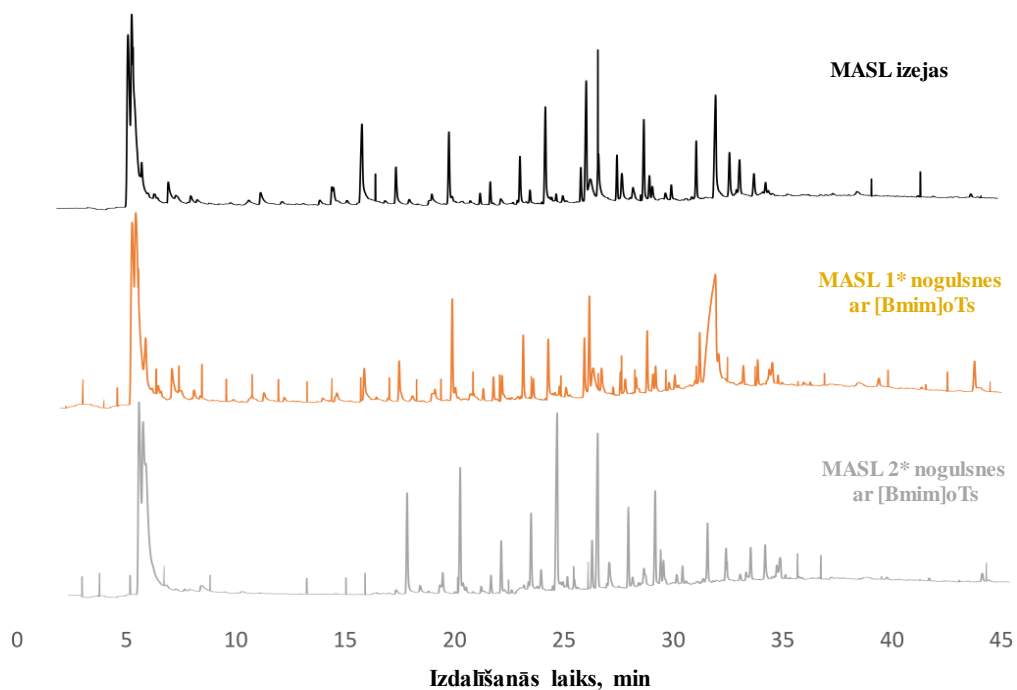
Priedes rūpniecisko (pēc logu rāmju ražošanas) blakusproduktu 60 % etanola ūdens tiešās ekstrakcijas (A) un secīgās ekstrakcijas (B) ekstraktu hromatogrammas

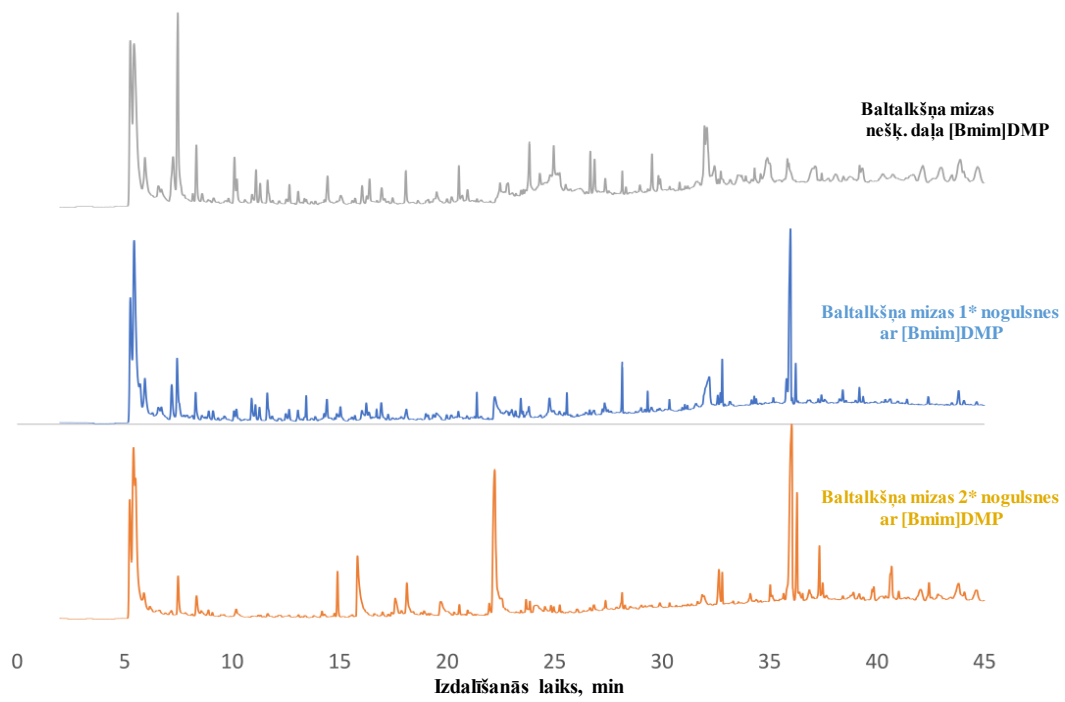


60 % etanola ūdens ekstraktu HPLC-DAD hromatogrammas, $\lambda=280\text{nm}$, kolona Zorbax Extend C18, $5\mu\text{m}$, (4,6 x 250 mm), temperatūra: $30\text{ }^\circ\text{C}$, injekcijas tilpums: $20\ \mu\text{L}$, eluents A: 5 % metanols + 0,1% skudrskābe, eluents B metanols + 0,1% skudrskābe. Gradienta režīms 30 - 100 % eluents B

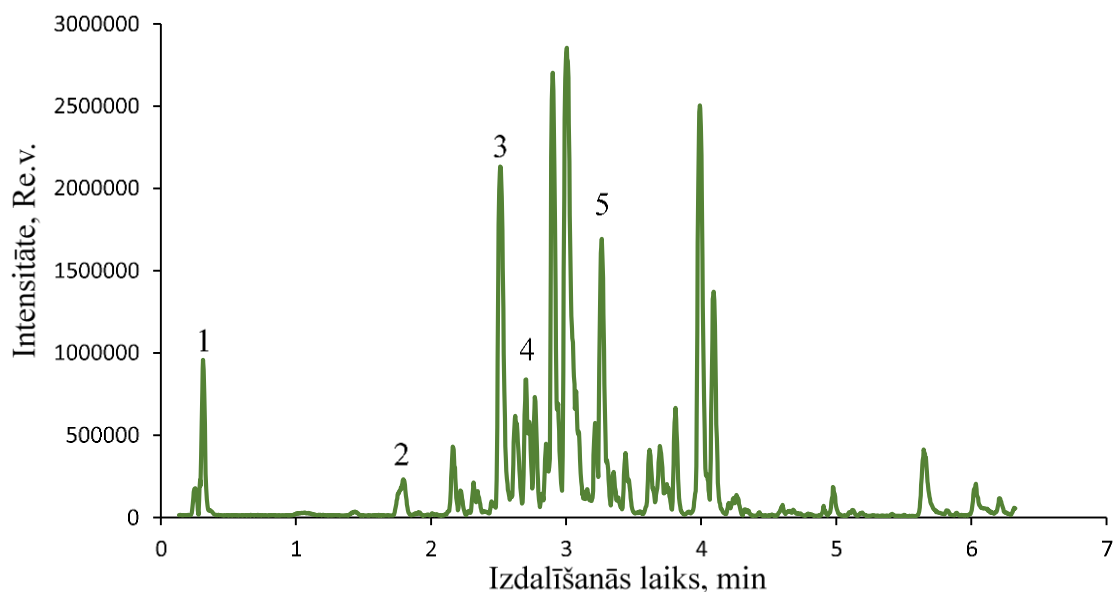
6. PIELIKUMS

MASL un baltalkšņa mizas frakcionēšanas rezultātā ar dažādiem jonu šķidrumiem pēc apstrādes ar “antisolventiem” iegūto produktu analītiskās pirolīzes hromatogrammas





7. PIELIKUMS



Kopējā jonu hromatogramma baltalkšņa mizas [C₄C₁im]Cl frakcijai pēc attīrīšanas ar C18 kolonnu, izmantojot etanolu kā eluentu

Individuālu polifenolu savienojumu raksturojums alkšņu mizas vidēji polāros un polāros ekstraktos, izmantojot LC-ESI-MS/MS

Nr.	Rt (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmenta joni (m/z)	Provizoriskā identifikācija
1	0,31	285	197; 125; 97	Flavonoīdu atvasinājums
2	1,69	385	319; 301; 193; 178	Ferulskābes atvasinājums
3	2,48	639	319; 301; 193; 178	Ferulskābes atvasinājums
4	2,68	827	715; 413; 319; 289; 245; 153	Katehīna/epikatehīna atvasinājums
5	3,24	687	385; 317; 287; 259; 245	Katehīna/epikatehīna atvasinājums

Promocijas darbs “**Polifenolu izdalīšana no dažādiem augu biomasas pārstrādes atlikumiem ar videi draudzīgām ekstrakcijas metodēm un iegūto produktu vispusīga raksturošana**” izstrādāts Latvijas Valsts Koksnes Ķīmijas Institūta Lignīna ķīmijas laboratorijā un Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Māris Lauberts

Paraksts: _____/M. Lauberts/

Rekomendējam darbu aizstāvēšanai:

Zinātniskie vadītāji:

Dr. chem., prof. Arturs Vīksna _____ /A. Vīksna/

Dr. habil. chem., Tatjana Dižbite _____ /T. Dižbite/

Darbs iesniegts:

LU Ķīmijas nozares Promocijas padomē _____

Padomes sekretārs: _____/J. Logins/

Darbs aizstāvēts Promocijas padomes sēdē

_____ protokols Nr. _____

Padomes sekretārs: _____/J. Logins/