

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE



Līga Lauberte

ANALĪTISKĀS PIEEJAS IZVEIDE BIOLOĢISKI
AKTĪVU POLIFENOLU RAKSTUROŠANAI
LIGNOCELULOZES BIOMASĀ

Promocijas darbs

Zinātnes doktora (Ph.D.) grāda iegūšanai ķīmijas nozarē

Apakšnozare: Analītiskā ķīmija

Zinātniskie vadītāji:

Dr. habil. chem. prof. Gaļina Teliševa

Dr. chem., prof. Arturs Vīksna

Konsultante: *Dr. med., asoc. prof. Jeļena Krasilņikova*

Rīga

2020

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Valsts Koksnes ķīmijas institūtā Lignīna ķīmijas laboratorijā un Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes Analītiskās ķīmijas katedrā no 2012. gada līdz 2020. gadam.



**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., prof. vadošā pētniece Gaļina Teliševa (LV Koksnes ķīmijas Institūts)

Konsultante: *Dr. med.*, asoc. prof. Jeļena Krasilņikova (Rīgas Stradiņa Universitāte)

Darba recenzenti:

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

2) *Dr. chem.*, senior researcher Uģis Cābulis (LV Koksnes ķīmijas institūts)

3) *Dr. chem.*, researcher Dzintars Začs (Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR")

Darba aizstāvēšana paredzēta Latvijas Universitātes Ķīmijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2021. gada 4. februārī pulksten 14.00 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

/ Edgars Sūna /

(paraksts)

promocijas padomes sekretārs

/ Vīta Rudoviča /

(paraksts)

© Latvijas Universitāte, 2020

© Līga Lauberte, 2020

KOPSAVILKUMS

Analītiskās pieejas izveide bioloģiski aktīvu polifenolu raksturošanai lignocelulozes biomasā. Lauberte L., zinātniskie vadītāji: *Dr. chem.*, prof. A. Vīksna; *Dr.habil.chem.*, prof. G.Teliševa. Konsultante: *Dr. med.*, asoc. prof. J. Krasilņikova. Promocijas darbs, 119 lappuses, 45 attēli, 21 tabulas, 190 literatūras avoti, 4 pielikumi. Latviešu valodā.

POLIFENOLA SAVIENOJUMI, DIARILHEPTANOĪDI, TRICĪNA-LIGNĪNI, IDENTIFIKĀCIJA, KVANTIFICĒŠANA, ALKŠŅU MIZAS, KVIEŠU SALMI, BIOLOĢISKĀ AKTIVITĀTE.

Promocijas darbā ir veikta analītiskās pieejas* izveide individuālu polifenola savienojumu kvalitatīvai un kvantitatīvai noteikšanai kviešu salmos, baltalkšņa un melnalkšņa mizās. Eksperimentāli izstrādāta metodika alkšņos dominējošā diarilheptanoīda – oregonīna un kviešu salmos tikai nesen atklāto vērtīgo tricīna – lignīna oligomēru ķīmiskai analīzei. Analītiskā pieeja izveidota, izmantojot hromatogrāfiskās un spektrofotometriskās analīzes metodes. Individuālu savienojumu identifikācijai un kvantificēšanai pielietota augsti efektīvā un ultraefektīvā šķidrums hromatogrāfija ar dažādiem detektoriem (UV-FLD, UV-ELS, UV-QDA, UV-ESI/QTOF) vai gāzu hromatogrāfija (Py-GC-MS/MS, GC-FID), kā arī kopējo polifenola savienojumu noteikšanai spektrofotometriskā Folina - Čikolto metode. Bioloģiskās aktivitātes raksturošanai veikta oregonīna un tricīna – lignīna oligomēru attīrīšana, izmantojot preparatīvo hromatogrāfiju un/vai cietfāzes ekstrakciju, iegūstot tos ar augstu hromatogrāfisko tīrību ($\geq 90\%$, LC-MS). Pierādīta to piemērotība kā laboratorijas standartiem hromatogrāfiskai kvantificēšanai kā referenci izmantojot atbilstošās komerciāli pieejamās standartvielas. Oregonīnam veikta LC-UV kvantificēšanas metodes validācija alkšņu mizas ekstraktos, izveidota puskvantitatīva metodika kopējo diarilheptanoīdu satura noteikšanai. Kviešu salmu polifenolu savienojumu saturošos maisījumos, kas iegūti kā cukuru ieguves blakusprodukti, izveidota tricīna kvalitatīva un kvantitatīva analīze, kā arī puskvantitatīva tricīna – lignīna oligomēru savienojumu noteikšana. Identificēti raksturīgākie polifenola savienojumi alkšņu un kviešu salmu ekstraktos. Kviešu salmu ekstraktu bioloģiskā aktivitāte raksturota ar antioksidanto aktivitāti, oregonīnam pirmo reizi pierādīta labvēlīga ietekme uz DNA metilēšanas epiģenētisko procesu un aunu spermas kvalitāti to uzglabājot (iegūti 2 LV patenti).

* Analītiskā pieeja – ķīmisko metožu izvēle, definējot izmantojamo tehniku un analītiskās metodes [190]

ANOTATION

Development of an analytical approach for the characterization of biologically active polyphenols in lignocellulosic biomass. Lauberte L., supervisors: *Dr. chem.*, prof. A. Viksna; *Dr.habil.chem.*, prof. G.Telysheva. Consultant: Dr. med., asoc. prof. J. Krasilnikova. PhD thesis, 119 pages, 44 figures, 21 tables, 190 literature references, 4 appendices. In Latvian.

POLYPHENOLS, DIARYLHEPTANOIDS, TRICIN-LIGNINS, IDENTIFICATION, QUANTIFICATION, ALDER BARK, WHEAT STRAW, BIOLOGICAL ACTIVITY.

The PhD Thesis provides the elaboration of an analytical approach[†] for the qualitative and quantitative determination of individual polyphenols in wheat straw and in bark of grey and black alders. An methodology for the chemical analysis of the dominant diarylheptanoid oregonin in alder bark and recently discovered valuable triclin - lignin oligomers in wheat straw was experimentally developed. The analytical approach was developed using combination of chromatographic and spectrophotometric. Liquid chromatography with various detectors (UV-FLD, UV-ELS, UV-QDA, UV-ESI/QTOF) or gas chromatography (Py-GC-MS/MS, GC-FID) was used for identification and quantification of individual compounds and the Folin-Ciocalteu's method for the determination of total polyphenols. To characterize the biological activity, oregonin and triclin-lignins were purified by preparative chromatography and/or solid phase extraction, they were obtained with high chromatographic purity ($\geq 90\%$, LC-MS). Their suitability as laboratory standards for quantification was demonstrated using commercially available reference substances. For oregonin, the LC-UV quantification method was validated in alder bark extracts, and a semi-quantitative methodology for the determination of total diarylheptanoid content was developed. Qualitative and quantitative analysis of triclin and semi-quantitative determination of triclin-lignin oligomers were elaborated in the mixtures containing wheat straw polyphenol compounds obtained as sugar by-products. The most characteristic polyphenols in alder and wheat straw extracts were identified. The antioxidant activity characterises the biological activity of wheat straw extracts. for the first time oregonin was proved to have a beneficial effect on the epigenetic process of DNA methylation and the quality of rams' sperm during storage (2 LV patents were obtained).

[†] Analytical approach– purpose of a chemical analysis that defines technique and analytical method to be applied [190]

SATURS

KOPSAVILKUMS.....	3
ANOTATION	4
SAĪSINĀJUMI.....	8
Ievads.....	9
Pateicības	18
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	19
1.1. Lignocelulozes biomasas biorafinēšanas potenciāls	19
1.2. Augu biomasas ekstraktvielas.....	20
Polifenoli kā nozīmīga augu bioloģiski aktīvo savienojumu grupa	21
1.3. Lapkoku mizu polifenolu izcelsmes ekstraktvielas.....	23
Latvijas alkšņu mizu raksturīgie bioloģiski aktīvie polifenoli - diarilheptanoīdi	25
1.4. Alkšņu polifenola savienojumu bioloģiskās aktivitātes	32
1.5. Bioloģiski aktīvi lignīna atvasinājumi.....	34
1.6. Kviešu salmu tricīna – lignīna savienojumi un to bioloģiskā aktivitāte	37
1.7. Augu polifenolu un to saturošo ekstraktu analīzes metodes.....	39
1.7.1. Augu polifenolu savienojumu spektrofotometriska raksturošana	39
1.7.2. Augu polifenolu gāzes hromatogrāfijas analīze.....	42
1.7.3. Šķidrums hromatogrāfija kā augu polifenolu analīzes metode	43
1.8. Augu ekstraktu kvalitātes kontrole un standartizācija.....	44
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	46
2.1. Pētāmie objekti.....	46
2.2. Aparatūra	48
2.3. Reaģenti.....	49

2.4.	Kopējo polifenolu savienojumu satura noteikšana ekstraktos.....	50
2.5.	Kviešu salmu frakciju šķidrums hromatogrāfijas-masas spektrometrijas analīze.	51
2.6.	Tricinā un tricīna - lignīnu kvalitatīvā un kvantitatīvā analīze kviešu salmu paraugos.....	52
2.7.	Kviešu salmu analītiskā pirolīze	53
2.8.	Augstefektīvā šķidrums hromatogrāfija ar UV detektoru alkšņu mizas ekstraktiem	54
2.9.	Alkšņu mizas ekstraktu ultra efektīvās augstspiediena šķidrums hromatogrāfijas analīze ar UV un gaismas izkliedes detektoru	55
2.10.	Alkšņu mizas UHPLC-ESI-TOF/MS kvalitatīvā analīze	56
2.11.	Preparatīvā hromatogrāfija alkšņa mizas etilacetāta ekstraktam.....	57
2.12.	Oregonīna kvantitatīva noteikšana ar ultraefektīvo augstspiediena šķidrums hromatogrāfu alkšņu mizas ekstraktos	58
2.13.	Tricinā – lignīnu attīrīšana no kviešu salmu ekstraktiem	60
2.14.	Iegūto savienojumu antioksidantās aktivitātes noteikšana ar (ORAC) metodi.	60
2.15.	Oregonīna bioloģiskās aktivitātes pētījumi	61
3.	REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	64
3.1.	Analītiskās pieejas izveide kviešu salmu lignīna saturošo frakciju ķīmiskam raksturojumam.....	64
3.2.	Kviešu salmu lignīna saturošo frakciju ķīmiskais pamatraksturojums	65
3.3.	Lignīna modeļvielu šķidrums hromatogrāfijas – tandēma masspektrometrijas datu bāzes veidošana	70
3.4.	Individālu savienojumu identifikācija un kvantifikācija kviešu salmu lignīna paraugos ar UHPLC-TOF/MS	73
3.5.	Kviešu salmu lignīnu saturošās frakcijas kā dabiskie antioksidanti	82
3.6.	Tricinā un tricīna-lignīnu kompleksu attīrīšana	84

3.7. Analītiskās pieejas izmantošana kviešu salmu raksturošanai kā bioloģiski aktīvo savienojumu avotam.....	85
3.8. Baltalkšņa un melnalkšņa mizas ķīmiskās kompozīcijas analīze	85
3.9. Alkšņu mizas hidrofilo ekstraktu kvalitatīvā un kvantitatīvā analīze ar UHPLC-TOF/MS	86
3.10. Oregonīna noteikšana alkšņu mizas hidrofilajos ekstraktos	90
3.11. Oregonīna attīrīšana no melnalkšņa mizas.....	93
3.12. Oregonīna - Latvijā augošo alkšņu dominējošā diarilheptanoīda savienojuma bioloģiskā aktivitāte.....	95
3.13. Analītiskās pieejas izveide oregonīna un citu alkšņu mizām raksturīgo diarilheptanoīdu analīzei.....	98
SECINĀJUMI.....	102
Izmantotā literatūra	103
Pielikumi.....	121
2.pielikums.....	123
Pirolīzes produktu analīžu rezultāti.....	123
3.pielikums.....	127
Alkšņu mizas hromatogrammas.....	127
4.pielikums.....	129
Lignīna modeļvielu masspektri.....	129

SAĪSINĀJUMI

ASE- paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija	MRM- multi-reakciju monitorings
BA- baltalksnis	MS- masspektrometrija
DAH- diarilheptanoīdi	mtDNS- mitohondriju DNS
DNS- dezoksiribonukleīnskābe	NMR- kodolu magnētiskās rezonanses spektroskopija
ELS- iztvaicēšanas gaismas izkliedes detektors	ORAC- skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitāte
ESI- elektroizsmidzināšanas jonizācija	OREG- oregonīns
EtOAc- etilacetāts	PBS- fosfāta buferšķīdums
FID- liesmas jonizācijas detektors	Pent- pentoze
FLD- fluorescences detektors	Py-GC/MS/FID- analītiskā pirolīze / gāzu
GC- gāzu – šķīduma hromatogrāfija	Rel.v.- relatīvās vienības
HC- hidrodinamiskā kavitācija	RSD- relatīvā standartnovirze
GSE- gallusskābes ekvivalenti	SEC- eksklūzijas hromatogrāfija
HPLC- augsti efektīvā šķīduma hromatogrāfija	UHPLC- ultra augstefektīvā šķīduma hromatogrāfija
IK ₅₀ - nepieciešamā antioksidanta koncentrācija, lai uz pusi samazinātu brīvo radikāļu daudzumu	US- zemas frekvences ultraskaņa
LC- šķīduma hromatogrāfija	UV- ultravioletais detektors
LOD- noteikšanas robeža	VCL- spermatozoīdu pārvietošanās ātrums
LOQ- kvantitatīvās noteikšanas robeža	WS- kviešu salmi
MA- melnalksnis	QDA- kvadrupola masspektrometrs
MEFs- peļu embrionālie fibroblasti	QTOF- kvadrupola-nolidošanas laika tandēma masspektrometrs
TMS – trimetilsilāns	

IEVADS

Viena no galvenajām Latvijas bagātībām ir meži un tajos esošie augu resursi. Tādēļ ir nepieciešams attīstīt ekonomiku, kas pamatojas uz racionālāku atjaunojamo vietējo resursu izmantošanu. Šeit nozīmīga ir biorafinēšana, ar to saprotot visu augu morfoloģisko daļu, arī biomasas pārstrādes blakusproduktu vērtīgu izmantošanu. Īpašu vietu no koksnes mehāniskās pārstrādes atlikumiem ieņem miza, tā sastāda ievērojumu daudzumu no koka biomasas (10-12 %) un tā ir zināma kā bagāts ekstraktvielu avots, tomēr pašlaik to sadedzina, neizmantojot tās pievienoto vērtību. Racionāli netiek izmantoti arī lauksaimniecības industrijas blakusprodukti, piemēram, salmi. Mūsdienās vērtīgu savienojumu, galvenokārt bioloģiski aktīvu vielu iegūšana arvien vairāk attīstās izmantojot augu pārstrādes procesu atlikumus. Tā tiek ievērota ilgtspējība, piešķirot biomasas pārstrādes blakusproduktiem vērtību, tos izmantojot jaunu produktu ieguvei, gūstot vienlaicīgu ekonomisku un ekoloģisku labumu. Lai paplašinātu augu pārstrādes atlikumu izmantošanu trūkst informācijas par to ķīmisko sastāvu un īpašībām, ir nepieciešama plašāka un detalizētāka izpēte, tai skaitā potenciālo izmantošanas iespēju apzināšana. Dabas vielu izteiktā strukturālā un funkcionālā dažādība, daudzuma un ķīmiskā sastāva variācija piesaista lielu interesi, jo tās var tikt izmantotas daudzās zinātnes nozarēs, piemēram, lauksaimniecībā, farmācijā, pārtikas un kosmētikas rūpniecībā u.c. Pēdējos gados arvien aktuālāki kļūst lignīna pētījumi no augu pārstrādes blakusproduktiem, uzsvāru liekot tieši uz zemmolekulāriem vai oligomēriem lignīnu atvasinājumiem, pavisam nesen ir atklāta sekundāro metabolītu integrācija graugzāļu lignīnos, iegūstot savienojumus ar augstu bioloģisko aktivitāti, pat potenciālus pretvēža līdzekļus.

Lai gan pēdējo gadu laikā publikāciju skaits par biomasas pārstrādes blakusproduktiem pieaug, tomēr to ķīmiskais sastāvs ir nepietiekami izpētīts. Interese par dabīgas izcelsmes bioloģiski aktīviem savienojumiem turpina strauji augt, jo vēl ievērojams floru skaits nav pētīts. Zinātniekiem ir nepieciešamība radīt, izstrādāt, vai pielāgot arvien jaunas metodes un tehnoloģijas, kas būtu piemērotas līdz šim vēl neidentificētu, neizdalītu un neizpētītu savienojumu, tai skaitā polifenolu un to atvasinājumu raksturošanai.

Augu polifenoli, pateicoties veselību veicinošām spējām, piesaista lielu zinātnieku un sabiedrības uzmanību. Polifenolu pētījumi galvenokārt ir vērsti uz individuālu savienojumu

struktūras raksturošanu dažādās augu matricās un jaunu ieguves avotu meklējumiem. Ņemot vērā ekstraktu daudzus komponentus, to ķīmiskās kompozīcijas variācija ir novērojama ne tikai viena produkta vairāku ražotāju ietvaros, bet pat viena ražotāja dažādās produkta sērijās. Pat ja ekstrakts ir ķīmiski standartizēts attiecībā uz dominējošiem savienojumiem, tik un tā saglabājas variācija pārējo savienojumu kompozīcijā. Tāpēc ir svarīgi attīstīt dažādu augu ekstraktu ķīmisko analīzi, lai spētu kontrolēt ekstraktu sastāvu pēc iespējas pilnvērtīgāk, izveidojot ķīmiskā sastāva – bioloģiskās aktivitātes sakarības.

Promocijas darbā veikta alkšņu mizas un kviešu salmu lignocelulozes biomasas polifenola savienojumu un to piemaisījumu kvalitatīvā analīze, pamatojot analītisko metožu izvēli un veicot dominējošo savienojumu kvantificēšanu, raksturojot šo ekstraktu bioloģisko aktivitāti, papildus analītiskam procesam integrēta arī ilgtspējīgas izmantošanas koncepcija.

Promocijas darba mērķis ir novērtēt Latvijā plaši pieejamas neracionāli izmantojamas lignocelulozes izejvielas potenciālu biorafinēšanā kā bioloģiski aktīvu polifenolu avotam, izveidojot analītisko pieeju to ķīmiskā sastāva un komponentu bioloģiskās aktivitātes raksturošanai

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

Darba uzdevumi. Darba mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši darba uzdevumi:

1. Noteikt polifenola savienojumu kopējo saturu un raksturot to ķīmisko grupu piederību (flavonoīdi, tanīni u.c.), identificēt un kvantificēt ekstraktos dominējošos polifenola savienojumus: alkšņu mizās - diarilheptanoīdus, un kviešu salmu ekstraktos - tricīna-lignīna oligomērus.
2. Pielāgot hromatogrāfiskos apstākļus (vispārīga analīze un mērķtiecīga specifisku savienojumu grupu noteikšanai) katram ekstraktam atbilstoši to ķīmiskajam sastāvam un pārbaudīt paraugu sagatavošanas metodes ietekmi uz hromatogrāfisko-masspektrometrisko analīzi.
3. Pielāgot analīzes parametrus individuālu savienojumu identifikācijai un bioloģisko aktivitāti ietekmējošo savienojumu kvantificēšanai.

4. Veikt bioloģisko aktivitāti ietekmējošo savienojumus izdalīšanu no ekstraktiem, to tālākai izmantošanai savienojumu kvantificēšanai un/vai to bioloģiskās aktivitātes novērtēšanai.
5. Izstrādāt eksperimentāli pamatotu analītisko pieeju šo ekstraktu fitoķīmiskā sastāva raksturošanai attiecībā pret bioloģisko aktivitāti ietekmējošiem savienojumiem.
6. Veikt izdalīto individuālo savienojumu un/vai specifisku polifenolu ķīmisko grupu bioloģiskās aktivitātes novērtējumu.

Rezultātu zinātniskā nozīmība, inovācijas potenciāls

- Parādīts, ka korektas informācijas ieguvei par individuāliem polifenoliem un to grupu saturu lignocelulozes biomasā un tās pārstrādes produktos ir nepieciešams izmantot vairāku metožu kombināciju, savstarpēji izvērtējot rezultātus.
- Parādīts, ka mizas polifenolu hromatogrāfiskai rakturošanai ir nepieciešams izmantot šķidrums hromatogrāfijas detektoru kopumu. Pateicoties šai pieejai ir identificēti diarilheptanoīdi, kuriem ir liels potenciāls kā «maza-apjoma, bet lielas-vērtības» bioloģiski aktīviem produktiem.
- Izmantojot modeļvielu pētījumus, šķidrums hromatogrāfijas analīze ir pielāgota lignīna atvasinājumu analīzei, un rezultātā ir iegūta jauna informācija par sekundāro metabolītu-lignīna kompleksu klātbūtni un to struktūrām kviešu salmu biomasas ogļhidrātu ieguves procesa blakusproduktos.
- Kviešu salmu biomasas lignīnu atvasinājumu valorizācijai pirmo reizi ir veikta lignīnu modeļvielu, kas atšķiras pēc sānķēžu uzbūves, ar antioksidatīvo aktivitāti saistīto termodinamisko parametru aprēķini un novērtēts dažādu lignīna atvasinājumu ieguldījums to maisījumu antioksidatīvajā aktivitātē.
- Iegūta jauna informācija par kviešu salmos nesen atklātiem sekundāro metabolītu-lignīna oligomēriem, pirmo reizi parādot tricīna-lignīna oligomēru ieguves iespēju no cukura ražošanas lignīna plūsmām, pierādīts to potenciāls kā dabiskiem antioksidantiem.

Darbā veiktie polifenolu savienojumu ķīmiskā sastāva pētījumi 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. gadā.

Rezultātu praktiskā nozīmība

- Eksperimentāli pamatotu principu izveide lignocelulozes biomasas sekundāro metabolītu polifenolu ķīmiskā sastāva raksturošanai. Dažādu fizikāli-ķīmisko metožu kopuma izmantošana nodrošina iegūto rezultātu ticamību, papildinot esošo zināšanu krājumu par Eiropas lignocelulozes biomasas ķīmisko sastāvu un rada teorētisko pamatu tālāku pētījumu attīstībai (Eiropas un Latvijas projektu pieteikumiem) par polifenola savienojumiem ķīmijas jomā Latvijā un potenciālu jaunu produktu (diarilheptanoīdu un tricīna-lignīna oligomēru) tālākai komercializācijai.
- Uz iegūto rezultātu pamata, jau tiek atlasīti diarilheptanoīdu saturoši ekstrakti to izmantošanai kosmētisko krēmu un uztura bagātinātāja ražošanā Latvijā. Darbā aprakstītās un izmantotās metodes ir daļa no komerciāli pieejama Latvijā ražota produkta kvalitātes un nekaitīguma apliecības alkšņu oregonīna koncentrātam.
- Ekstraktu iekšējās kvalitātes vienotu principu izveide ir devusi iespēju šos ekstraktus piedāvāt tirgū kā dažādu produktu sastāvdaļas, raksturojot šo ekstraktu ķīmisko sastāvu un bioloģisko aktivitāti, izmantojot eksperimentāli pamatotu analītisko pieeju ķīmisko analīžu kompleksa veidā.
- Promocijas darba praktiskā nozīmība ir ieguldītā daļa alkšņu mizu un kviešu salmu biorafinēšanas klastera izveidē un/vai papildināšanā ar uzsvaru uz individuāliem savienojumiem un to bioloģisko aktivitāti. Ir jāņem vērā, ka ekstraktu tālāku izmantošanu nodrošina ne tikai šajā darbā noteiktie ekstraktu raksturlielumi, bet arī lignocelulozes biomasas kā izejvielas izvēle, tās sagatavošanas un ekstrakcijas metodika.

Pētījuma rezultātu aprobācija

Darba izstrādes laikā iegūtie rezultāti prezentēti 11 starptautiskās zinātniskās konferencēs un aprakstīti 8 starptautiski citējamās publikācijās (atrodamas SCOPUS u.c. datubāzēs), iegūti 2 Latvijas patenti.

Iegūtajiem rezultātiem ir svarīgs ieguldījums šādu projektu realizācijā:

1. ERAF Projekts 1.1.1.1/18/A/182. „Inovatīvs zaļās ekstrakcijas process, izveidojot jaunu biorafinēšanas klāsteru, kas orientēts uz fitoķīmiskajām vielām un biomateriālu ražošanu no nepietiekami izmantotas koksnes biomasas” (2019. - 2021.g.) pētniece.

2. H2020 Projekts US4 GREENCHEM “Combined ultrasonic and enzyme treatment of lignocellulosic feedstock as substrate for sugar based biotechnological applications”, (2015. - 2019. g.) pētniece.
3. Valsts pētījumu programma ResProd projekta Nr. 3 “Meža un zemes dzīļu resursu izpēte, ilgtspējīga izmantošana – jauni produkti un tehnoloģijas” (2014. - 2018. g.) pētniece.
4. LZP Fundamentālo un tematisko pētījumu projekts Nr. 564/2012 „Koksnes biomasas frakcionēšana, izmantojot jonu šķidrums un izdalot vērtīgus polifenolu un celulozes produktus” (2013. - 2016. g.) pētniece.
5. 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 ilgzināšanas īpašībām, sadaļa „Funkcionāli produkti un ķīmikālijas ar augstu pievienoto vērtību no koku mizām”, (2010. - 2013. g.). zinātniskā asistente.

Patenti

- 1.Latvijas Republikas patents **LV15311B**: J.Krasiņņikova (LV), G. Teliševa (LV), E. Kistanova (BG), D. Abadjieva (BG), E. Stoyanova (BG), M. Chervenkov(BG), L. Ivanova (LV), U. Berķis (LV), T. Dižbite (LV), **L. Lauberte** (LV). Līdzeklis DNS metiltransferāzes aktivitātes pazemināšanai zīdītāju šūnās, **2018**.
- 2.Latvijas Republikas patents **LV15311B**: J.Krasiņņikova (LV), G. Teliševa (LV), **L. Lauberte** (LV), E. Kistanova (BG), D. Abadjieva (BG), E. Stoyanova (BG), L.Emmanuel (BG), J. Baptiste (BG), A. Monfoulet (BG). Līdzeklis monocītu adhēzijas pazemināšanai pie endotēlija šūnām, **2019**.

Publicitāte

Periodikā ar aprēķinātu citējamību (Hirša indekss 5):

1. **Lauberte, L.**, Fabre, G., Ponomarenko, J., Dizhbite, T., Evtuguin, D.V., Telysheva, G., Trouillas, P. Lignin Modification Supported by DFT-Based Theoretical Study as a Way to Produce Competitive Natural Antioxidants. *Molecules*, **2019**, 9, 24, 1794. <https://doi.org/10.3390/molecules24091794> (Impact Factor: 3,060).

2. **Lauberte, L.**, Telysheva G., Cravotto, G., Andersone, A., Janceva, S., Dizhbite, T., Arshanitsa, A., Jurkjane, V., Vevere, L., Grillo, G., Calcio Gaudino, E., Tabasso, S. Lignin - derived antioxidants as value-added products obtained under cavitation treatments of the wheat straw processing for sugar production, *Journal of Cleaner Production*, **2020**, (Submitted 28.01.2020., status: under revision). (Impact Factor: 6.395).
3. Abadjieva, D.; Yotov, S.; Mladenova, V.; **Lauberte, L.**; Kalvanov, I.; Krasilnikova, J.; Telesheva, G.; Kistanova, E. Positive effect of natural antioxidant oregonin from *Alnus incana* bark on ram semen quality stored at 5 °C for 48 h. *Res. Vet. Sci.* **2020**, 131, 153-158. (Impact Factor: 1.940).
4. Krasilnikova, J., **Lauberte, L.**, Stoyanova, E., Abadjieva, D., Chervenkov, M., Mori, M., De Paolis, E., Mladenova, V., Telysheva, G., Botta, B., Kistanova, E. Oregonin from *Alnus incana* bark affects DNA methyltransferases expression and mitochondrial DNA copies in mouse embryonic fibroblasts. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33, **2018**, 1055-1063. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1476504>. (Impact Factor: 4,027).
5. Lauberts, M., **Lauberte, L.**, Arshanitsa, A., Dizhbite, T., Dobeles, G., Bikovens, O., Telysheva, G. Structural transformations of wood and cereal biomass components induced by microwave assisted torrefaction with emphasis on extractable value chemicals obtaining. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2018**, 134, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.03.025>. (Impact Factor: 3,471).
6. Janceva, S., **Lauberte, L.**, Akishin, J., Arshanitsa, A., Dizhbite, T., Telysheva, G. Optimization of proanthocyanidins extraction from bark of local hardwood. *Key Engineering Materials*, **2018**, 163-168. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.762.163>. (ISSN: 1662-9795).
7. 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: 1,246).

8. Janceva, S., **Lauberte, L.**, Dizhbite, T., Krasilnikova, J., Telysheva, G., Dzenis, M. Protective effects of proanthocyanidins extracts from the bark of deciduous trees in lipid systems. *Holzforschung*, *71*, **2017**, 675–680. <https://doi.org/10.1515/hf-2016-0185>. (Impact Factor: 2,579).

Cita veida periodikā:

1. **L. Lauberte**, G. Telysheva, T. Dizhbite, M. Lauberts, A. Andersone, G. Cravotto, E. C. Gaudino, G. Grillo. Tricin-lignin complex as value added product obtained under ultrasound and hydrodynamic cavitation pre-treatment of the wheat straw processing for sugar production. Proceedings of the 21st Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction, **2018**, 152-157.

2. Janceva, S., **Lauberte, L.**, Arshanitsa, A., Akishin, J., Dizhbite, T., Telysheva, G. Optimization of Proanthocyanidins Extraction from Bark of Local Hardwood Key Engineering Materials, **2018**, 762, 163-168.

3. Teliševa, G., Dižbite, T., **Lauberte, L.**, Aršanica, A., Lauberts, M., Janceva, S., Ponomarenko, J., Krasilņikova, J., Jašina, L., Andersone, A., Bikovens, O., Vēvere, L., Akišins, J. Latvijas lapkoku mizu biorafinēšanas potenciāls. Meža un Zemes Dzīļu Resursu Izpēte, Ilgtspējīga Izmantošana – Jauni Produkti un Tehnoloģijas (ResProd). Valsts pētījumu programma, 2014.-2018. Rakstu krājumi. LV KĶI, Rīga, **2018**. 137.-141. lpp. ISBN 978-9934-8769-0-5.

4. Lauberts, M., **Lauberte, L.**, Dizhbite, T., Volperts, A., Ponomarenko, J., Jurkjane, 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. Ponomarenko, J., Trouillas P., Dizhbite T., Lauberts M., **Roze L.**, Jurkjane 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.

6. Teliševa, G., Dižbite, T., Krasīņņikova, 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. Valorization of plant biomass feedstock by assessing the chemical composition of polyphenols and antioxidant potential of their extracts, Polyphenols 2018, Bonn, Germany, September 25-28, 2018

2. **Lauberte, L.**, Pals, M., Lauberts, M., Janceva, S., Andersone, A., Telysheva, G. Chemical characterization of proanthocyanidins isolated from bark of seven plantation cultivars of Salix spp. CHISA 2018, Prague, August 25-29, 2018, Prague, Czech Republic.

3. Pāls, M., **Lauberte, L.**, Teliševa, G., Viksna, A., & Nakurte, I. Determination of oligomeric proanthocyanidins in willow bark by UPLC-MS/MS. Latvijas Universitātes 76. zinātniskā konference. Ķīmijas sekcija, 2018

4. **Lauberte, L.**, Dizhbite, T., Telysheva, G., Tabasso, S., Calcio Gaudino, E., Cravotto, G. Characterization of lignin derivatives extracted from wheat straw under ultrasound and hydrodynamic cavitation by UHPLC-ESI-MS/MS. Biotechnology of Plant Products: Green for Good IV, Czech Republic, Olomouc, 19.06.2017.-22.06.2017, p 169.

5. **Lauberte, L.**, Telysheva, G., Lauberts, M., Ikkere, L. E., Dizhbite, T., Viksna, A. Polifenolu raksturošana dažāda veida Salix mizā// Characterisation of polyphenols in

different varieties of Salix bark. Latvijas Universitātes 75.starptautiskā konference Ķīmijas sekcija 46.lpp

6. **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.

7. **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 its treatment in the microwave field. Green Extraction of Natural Products (GENP2016), May 30 - June 1, **2016**, Turin, Italy, pp. 45 - 46.

8. Krasīņņikova, 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.

9. 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.

10. 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.

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.

PATEICĪBAS

Promocijas darba autore izsaka īpašu pateicību zinātniskā darba vadītājiem - LV KĶI Lignīna ķīmijas laboratorijas vadītājam *Dr. habil. chem.* prof. Gaļinai Teliševai un *Dr. chem.*, prof. Arturam Vīksnam par nenovērtējamu atbalstu, konsultācijām, padomiem un nenogurdināmu klātesamību darba izstrādes gaitā.

Īpaši sirsnīgi pateicos LV KĶI Lignīna ķīmijas laboratorijas vadītājam *Dr. habil. chem.* prof. Gaļinai Teliševai par sapratni, motivāciju un pētniecei *Dr. chem.* Jevgenijai Ponomarenko par nesavtīgu palīdzību publikāciju gatavošanā un rezultātu interpretācijā.

Liels paldies LV KĶI Lignīna ķīmijas laboratorijas kolektīvam par atbalstu promocijas darba izstrādāšanas laikā, par noderīgajiem padomiem un konsultācijām, īpašs paldies, *Dr. habil. chem.* Tatjanai Dižbitei par palīdzību publikāciju veidošanā, pētniecēm *Dr. sc. ing.* Sarmītei Jancevai un *MSc.* Annai Andersonei par atbalstu pētījumu veikšanas procesā.

Pateicos Aveiro Universitātes *Dr. chem.*, prof. Dmitrijam Evtuginam par praktisku apmācību biomasas paraugu sagatavošanā un analīzē ar NMR, kā arī par nenovērtējamām konsultācijām par lignīnu hromatogrāfisku analizēšanu.

Paldies Turīnas Universitātes *Dr. chem.*, prof. Giancarlo Crovotto par iespēju pielietot izstrādāto analītisko pieeju uz kakao paraugiem, pierādot to piemērotību dažādu biomasu analīzēm (2 kopīgas Scopus publikācijas, nav iekļautas promocijas darbā).

Izsaku pateicību RSU Cilvēku un fizioloģijas katedras *Dr. med.* asoc. prof. Jeļenai Krasilņikovai un Bulgārijas reproduktīvās bioloģijas un imunoloģijas institūta asociētajai profesorei Elenai Kistanovai un Klermontas Overņa-Rona-Alpu zinātniskā centra Cilvēku uztura katedras pētniekam Laurentam-Emmanuelam Monfouletam par sadarbību alkšņu mizas ekstraktu un oregonīna bioloģiskās aktivitātes pētījumos

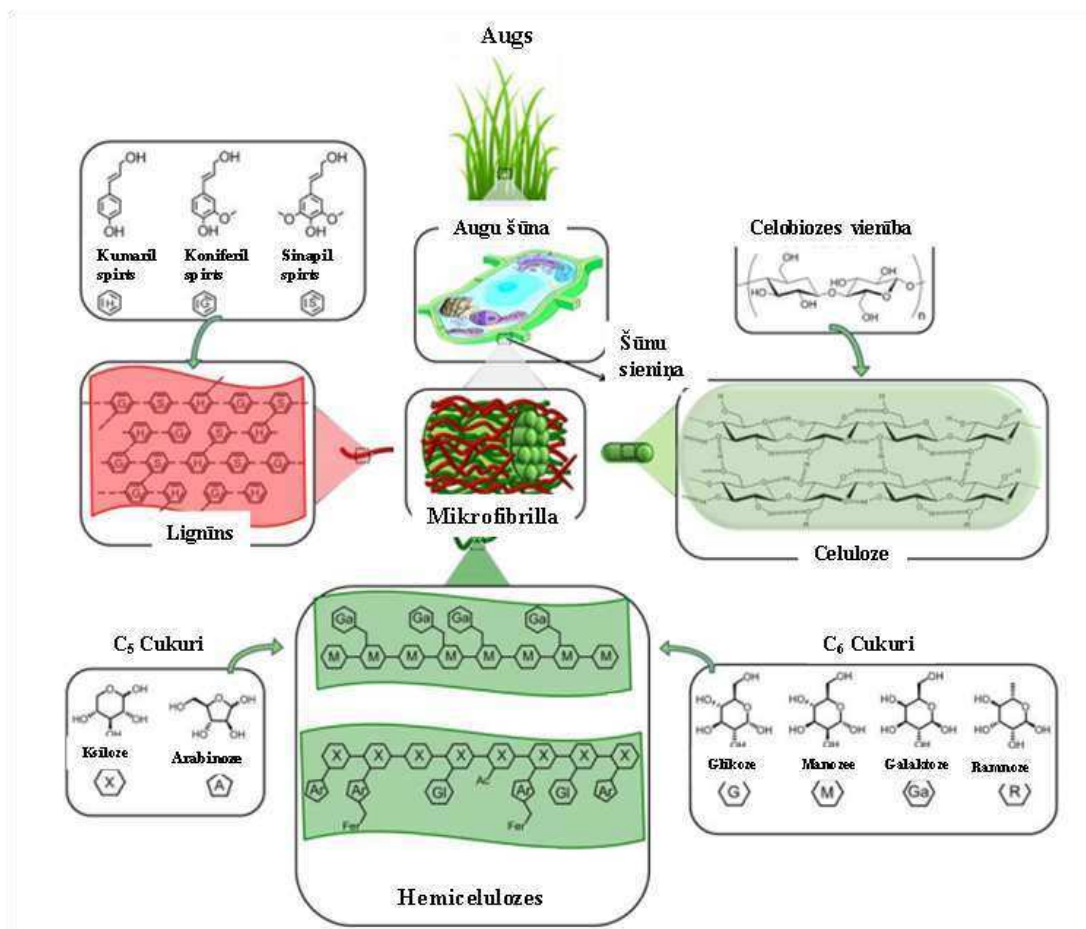
Paldies Biorafinēšanas laboratorijas pētniecei *Dr. chem.* Kristīnei Meilei par jauko atmosfēru KĶI Šķidrums hromatogrāfijas centrā.

Neizsakāmi liels paldies manam dēlam Olafam par to, ko nevar pateikt vārdos, darbu daļēji veltu savam papam Uldim Rozem, kurš ticēja, bet nesagaidīja un mammai ar māsu un vecomāti par neizsīkstošo pacietību, atbalstu un sapratni!

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Lignocelulozes biomasas biorafinēšanas potenciāls

Ir ļoti daudz iemeslu kādēļ daudzas interesantas zinātnes idejas nekad nerasniedz komerciālo praksi, viena no izplatītākajām ir izstrādātā procesa neefektivitāte, radot ekonomisku neizdevīgumu. Efektīvs veids procesa ekonomiskās dzīvotspējas panākšanai ir multi-produktu portfolio, ko var panākt ar biorafinēšanu [1]. Biorafinēšana ir ilgtspējīga biomasas pārstrāde plaša spektra pārdodamos produktos un enerģijā [2]. Lignocelulozes biomasa ir viens no visnozīmīgākajiem ilgtspējīgas attīstības resursiem un biorafinēšanas objektiem, jo tā ir plaši pieejama, atjaunojama, daudzveidīga un videi daudz draudzīgāka salīdzinājumā ar fosilajiem resursiem [3,4]. Lignocelulozes biomasa ir visi augu izcelsmes resursi, kas sastāv no ogļhidrātu polimēriem: celulozes, hemicelulozes un aromātiskā polimēra lignīna [5]. Lignocelulozes struktūras pamatkomponenti attēloti 1.1. attēlā.



1.1. att. Lignocelulozes struktūras pamatkomponenti [3]

Lignocelulozes biomasā bez iepriekš minētajiem pamatkomponentiem satur arī minoros savienojumus kā ekstraktvielas un pelnus. Lignocelulozes biomasas ķīmiskā pārstrāde galvenokārt ir vērsta uz ogļhidrātu savienojumiem [6]. Vispopulārākie produkti (biodeģviela, celuloze / papīrs, biomateriāli un bio / ķīmiskās vielas) parasti tiek ražoti no koksnes šķiedrām. Tomēr miza un citas koku atlikumi, kas veido meža atkritumus, joprojām ir nepietiekami izmantots resurss, no kura varētu iegūt ekstraktvielas un citas fitoķīmiskās vielas tālākai izmantošanai biofarmācijas, pārtikas piedevu un barības vielu, biopesticīdu, kosmētikas nozarēs [7]. Biorafinēšanas koncepcija ir nozīmīga stratēģija biomasas izmantošanas attīstībai un tās pamatā ir produktīvas biomasas plūsmas koncepcija, kas līdzīga petroķīmisko resursu plūsmai. Tā nodrošina inovatīvu ceļu jaunu pievienotās vērtības produktu izstrādei, kuriem ir potenciāls palielināt ieņēmumus, efektīvāk izmantojot esošo augu biomasu, kā arī veicina jaunu, netradicionālu biomasas resursu stādījumus [7,8]. Ņemot vērā, ka promocijas darbs ir vērsts uz polifenola savienojumu izpēti lignocelulozes biomasā no iepriekš minētajiem ķīmiskā sastāva komponentiem detalizētāk tiek apskatītas ekstraktvielas un lignīns.

1.2. Augu biomasas ekstraktvielas

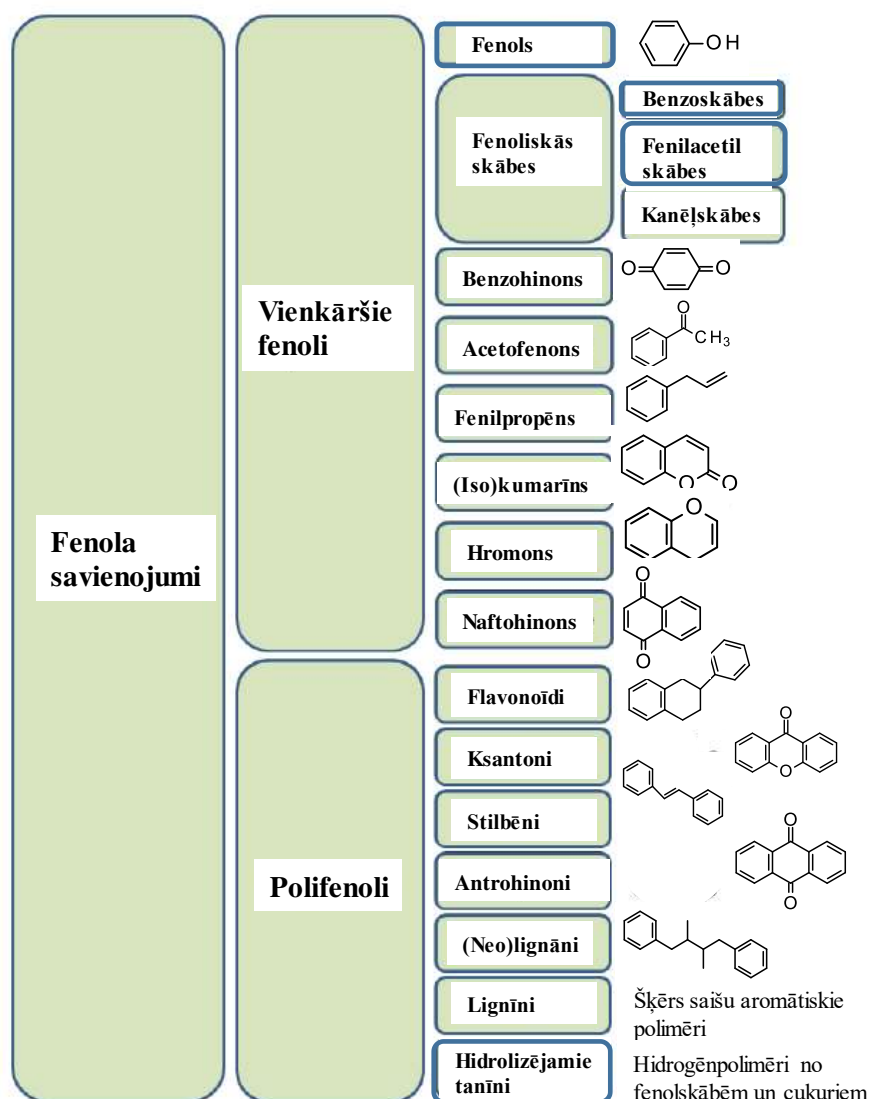
Ekstraktvielas ir organiski savienojumi, kurus iegūst biomasas apstrādē ar šķīdinātājiem (ekstrakciju), dažām no tām ir ļoti liela komerciālā vērtība [9]. Ekstraktvielas sastāv no plaša klāsta individuālu hidrofobu un hidrofilu savienojumu, sākot no terpenoīdiem un steroīdiem, taukiem un vaskiem līdz fenola savienojumiem, ieskaitot stilbēnus, tanīnus un flavonoīdus. Ekstraktvielu saturs fitomasā parasti ir mazāks par 10 %, bet tas var svārstīties no dažām procentdaļām līdz pat 40 % no biomasas [10,11]. Ekstraktvielu daudzums un sastāvs variē dažādās augu sugās un pat vienas sugas ietvaros atkarībā no augšanas vietas, gadalaika, vecuma un īpaši starp audu veidiem [12,13]. Ekstraktvielas piešķir fitomasai krāsu, smaržu vai garšu, veido rezerves barības vielas, darbojas kā augu hormoni vai, saistoties ar metāliem, darbojas kā biosintēzes katalizatori, bet, galvenokārt, tie aizsargā augu pret baktērijām, sēnītēm un kaitīgiem kukaiņiem gan fiziski, gan ķīmiski. Daži komponenti ir viskozi, daži veido ūdens atgrūdošus aizsargslāņus, bet citi ir toksiski vai hormonāli kavē kukaiņu pavairošanos [14]. Ekstraktvielu daudzfaktoru ķīmiskās un bioloģiskās aktivitātes padara tās perspektīvas izmantošanai dažādās jomās: materiālu ražošanā, lauksaimniecībā, pārtikas rūpniecībā,

veselības aprūpē, kosmētikā un farmakoloģijā. Ekstrakcijas ir ne tikai noderīgas un svarīgas, lai izprastu koku taksonomiju un bioķīmiju, bet arī apsverot tehnoloģiskos aspektus augu biomasas izmantošanai rūpniecībā, piemēram, celulozes un papīra ražošanā [15]. Ņemot vērā arī inovatīvu bioloģiski aktīvu molekulu sintezēšanas grūtības un augstās ekonomiskās izmaksas, šāda veida savienojumu ekstrahēšana no dabīgiem avotiem ir vispiemērotākais to ieguves veids [16]. Dabīgi produkti no augu valsts resursiem, gan tīru savienojumu, gan standartizētu ekstraktu veidā, pamatojoties uz to dažādo neatkārtojamo ķīmisko dažādību, sniedzot neierobežotas iespējas veselību veicinošu preparātu vai pat jaunu zāļu ieguvē [17]. Kā liecina Pasaules veselības organizācijas (WHO) dati, vairāk kā 80 % pasaules iedzīvotāju primārajā veselības aprūpē paļaujas uz tradicionālo medicīnu [18]. Terapeitisku līdzekļu arī daudzu mūsdienās lietotu farmaceitisku preparātu pamatā ir dabiski augu biomasas izcelsmes savienojumi un to atvasinājumi [19]. Piemēram, salicilskābe, kura ir asperīna acetilētā forma sākotnēji tika iegūta no *Salix Alba* mizas [20], pretvēža paklitaksels tika atklāts *Taxus baccata L.* mizā, pretmalārijas hinīns *Cinchona officinalis L.* mizā [21]. Liela nozīme bioloģiski aktīvu savienojumu ieguvei no augu izcelsmes izejvielām ir izejvielas pieejamībai un apstrādes izmaksām, tādēļ arvien pieaug interese par rūpniecisko blakusproduktu re-valorizāciju kā bioloģiski aktīvo molekulu avotam [19]. Ilgtspējīgā bioekonomikā atlikumiem un rūpnieciskajām plūsmām ir vēl nozīmīgāka loma kā izejvielām [22,23]. Pašlaik tikai 25 % no visiem nocirstajiem kokiem tiek pārvērsti kokmateriālos, atlikusī daļa ir bagātīgs dažādu veidu ķīmisku savienojumu avots, kurš vēl joprojām netiek pilnvērtīgi izmantots, bet potenciāli varētu dod lielus papildus ienākumus jau pastāvošajam tradicionālajam tirgum [24]. Pasaules pieredze pierāda peļņas iespējas augu ekstraktu nozarē, ieskaitot to iegūšanu no meža atlikumu biomasas. Piemēram, Eiropas līderis dabisko sastāvdaļu ražošanā SIA NATUREX (apgrozījums 2016. gadā 404 miljoni eiro) kopš 2017. gada sortimentā ir iekļāvis ekstraktus, kas iegūti no koku mizas, klasificējot tos kā vienu no ilgtspējīgas un peļņu nesošas nozares virzieniem [25,26].

1.3. Polifenoli kā nozīmīga augu bioloģiski aktīvo savienojumu grupa

Fenoli ir lielākā, visizplatītākā un vissvarīgākā (to unikālo ķīmisko un bioloģisko īpašību dēļ) bioaktīvo ekstraktvielu klase, kas atrodama visa veida augos. Polifenola savienojumi ir augu sekundārie metabolīti, kas atrodas augu šūnās [27]. Tie raksturojas ar

vairāk kā vienu fenola (sešlocekļu aromātisko ogļūdeņražu gredzens, kas ir tieši saistīts ar hidroksilgrupu) vienību molekulā, nereti tiek lietots arī vienkāršots apzīmējums fenola savienojumi un ar vārdu „poli” saprotot lielu skaitu dažādu ķīmisko aizvietotāju fenola molekulas aromātiskajā gredzenā. Brīvā formā polifenola savienojumi augos ir atrodami reti, visbiežāk tie ir esteru vai glikozīdu veidā [28]. Polifenola savienojumu pamatklasifikācija ir parādīta 1.2. attēlā.



1.2.att. Fenolisko savienojumu ķīmisko grupu pamatklasifikācija

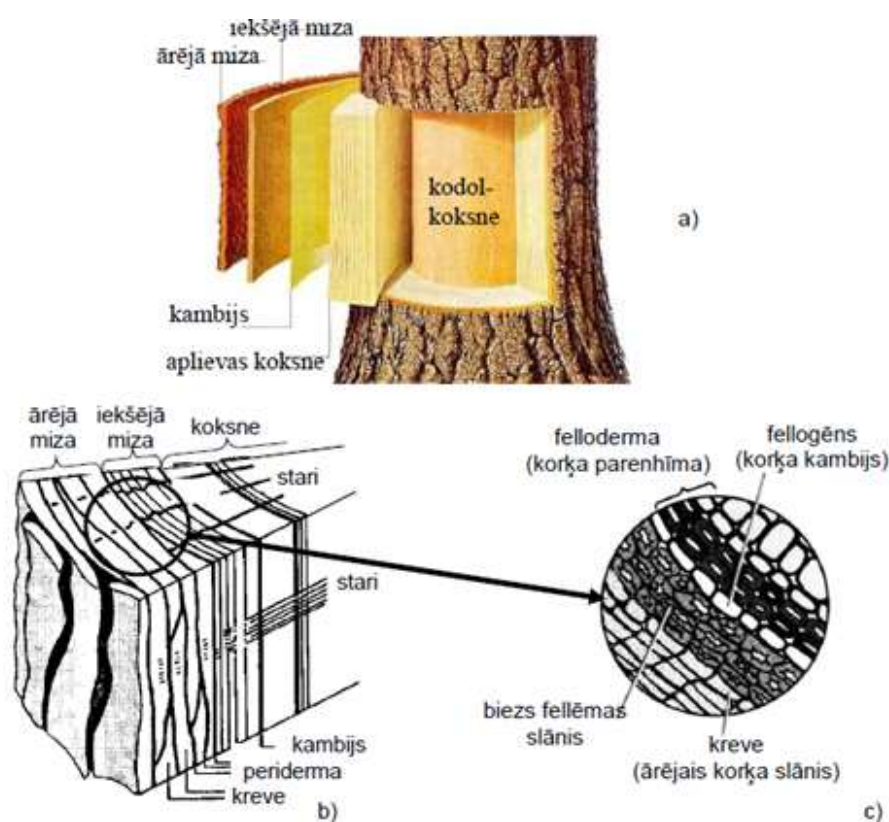
Polifenoli augos veic dažādas svarīgas funkcijas, galvenokārt tās ir saistītas ar auga aizsardzību, tajā skaitā brīvo radikāļu deaktivēšanu, metāla jonu helatēšanu, biocīdās

funkcijas u.c. Lielākā daļa augu nepārtraukti sintezē fenola savienojumus, taču to uzkrāšanās var tikt inducēta ar biotiskajiem un abiotiskajiem stresiem, tādiem kā UV starojums, zemas temperatūras, barības vielu nepietiekamība, vēji, patogēnu uzbrukums [29]. Vairumā gadījumu augi satur sarežģītus polifenolu savienojumu maisījumus. Vislielākā ietekme uz šo savienojumu saturu augos ir apkārtējai videi, piemēram augsnes tipam, saules iedarbībai, temperatūrai un mitrumu līmenim, gadalaikam [30]. Pateicoties mūsdienu analītiskās ķīmijas iespējām dažādos augos ir identificēti vairāk kā 10000 polifenola savienojumu [31]. Augu polifenoli reprezentē vispieprasītākās fitoķīmikālijas un tādējādi tiem ir potenciāls tikt izmantoti polifenolu tirgū. 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. Visbiežāk fenolisko vai polifenola savienojumu izdalīšanai no augu biomasas izmanto organiskos šķīdinātājus un/vai to maisījumus ar ūdeni [32]. Tomēr, līdzās to ekstrakcijai ir nepieciešama arī iegūto tālāk izmantojamo komponentu valorizācija. Vislielākais izaicinājums ir pārvarēt lignocelulozes neviendabīgumu, to var izdarīt izstrādājot efektīvus biomasas destrukcijas procesus, kas pārvērš biomasu dominējošos komponentos [33]. Ņemot vērā, ka promocijas darbā ekstraktvielas ir izdalītas no lapkoku mizas, detalizētāk apskatītas ir lapkoku mizu polifenolu izcelsmes ekstraktvielas.

1.4. Lapkoku mizu polifenolu izcelsmes ekstraktvielas

Pamatojoties uz augstu polifenolu savienojumu saturu un daudzveidību, kā arī to pieejamību un salīdzinoši zemām izmaksām no lignocelulozes izejvielām perspektīvākais polifenolu avots ir mizas [34]. Miza ķīmiski atšķiras no koksnes ar lielāku pelnu un ekstraktvielu saturu [35–37]. Mizu ķīmiskais sastāvs ir atšķirīgs katrai koku sugai. Pateicoties tam, ka polifenolu savienojumi koncentrējas tieši mizā, dažādu augu miza no seniem laikiem tiek izmantota etnomedicīnā kā homeopātiskās zāles [38]. Papildus plaši zināmām vielām, veicot jaunus pētījumus, pašlaik tiek atklāti arvien jauni bioaktīvi produkti dažādās koku mizās [37,39–41]. Tas pierāda, ka mizai, kas ir nozīmīgs mežsaimniecības nozares blakusprodukts, var būt otrā dzīve kā bioloģiski aktīviem

produktiem, kas iegūti ar dažāda veida ekstrakcijas metodēm. Starp koksnes audiem miza ieņem otro vietu pēc nozīmīguma aiz pašas koksnes – mizas saturs kokā variē no 5 % līdz pat 28 % [42,43]. Dzīvā koka miza vada barības vielas, kas izstrādātas lapās, uzkrāj savos audos barības vielu rezerves un aizsargā stumbru no nelabvēlīgas ārējās vides ietekmes [44]. Atkarībā no anatomiskās uzbūves un fizioloģiskās aktivitātes visvienkāršākais mizas sadalījums ir divos pamatslāņos: iekšējā miza (lūksna jeb floēma) un ārējā miza (korķaudi, korķa kārta jeb ritoderma). Koka stumbra griezumus un mizas anatomiskās uzbūves shematisks attēlojums redzams 1.3. attēlā.



1.3.att. Koka stumbra attēlojums: a) šķērsriezums; b) mizas uzbūves shematisks attēlojums un c) mizas palielinājums mikroskopā [44]

Tiek lēsts, ka mizas produkcija gadā ir no 300 līdz 400 miljoniem m³ [38]. Tomēr joprojām mizu izmanto ļoti ierobežoti, galvenokārt kā degmateriālu vai kā substrātu dārzkopībā [19,45]. Eiropas Savienības valstīs ir daudz neizmantotu (mazvērtīgu) atlikumu plūsmu no koksnes biomasas ražošanas un pārstrādes - 169 Mm³ gadā [46]. Latvijā pašlaik

darbojas vairāk nekā 2500 kokzāģētavas, kuros mizas apjoms sastāda apmēram 20 % no kokzāģēšanas blakusproduktiem [47]. Kokapstrādes nozare ražošanas un eksporta apjoma ziņā ir viena no lielākajām pārstrādes rūpniecības nozarēm Latvijas tautsaimniecībā, un tās pievienotās vērtības īpatsvars pārstrādes rūpniecībā 2013. gadā bija 23,1 % [48]. Tomēr meža nozaru ieguldījums valsts ekonomikā atbilstoši Nacionālā attīstības plāna 2020 (NAP 2020, 20.12.2012.) uzdevumiem, var ievērojami palielināt šo ieguldījumu, izstrādājot produktus ar augstu pievienoto vērtību, inovatīvus materiālus un daudzveidīgus nišas produktus. Šādu attīstību var paātrināt, palielinot lapu koku biomasas izmantošanu, ņemot vērā pieejamību Eiropas un Latvijas mežos [49]. Lapkoku resursi Eiropā, ieskaitot Baltijas jūras reģiona valstis, tiek nepietiekami izmantoti [50]. Latvijā ir izveidojies liels baltalkšņu un apšu audžu uzkrājums, kas tiek lēsts 40 – 60 milj.m³ [51]. Pieaug bērza un citu lapu koku sugu mežaudžu īpatsvars, jo lauksaimniecības zemes turpina strauji aizaugt ar lapkokiem, tāpat arī ar lapkoku pioniersugām nereti atjaunojas privāto mežu izcirtumi, kuros iepriekš valdošā koku suga ir bijusi priede vai egle [52].

1.4.1. Latvijas alkšņu mizu raksturīgie bioloģiski aktīvie polifenoli - diarilheptanoīdi

Alkšņiem, kā piemērotai sugai biomasas ātrai ražošanai, ir vairākas priekšrocības: augsta produktivitāte, kas sasniedzama samērā īsā laika periodā, augsta rezistence pret nelabvēlīgiem klimata apstākļiem, slimībām un kaitēkļiem, kā arī vienkārša apsaimniekošana un nepieciešami ievērojami mazāki līdzekļu ieguldījumi šo audžu atjaunošanai un aizsardzībai [53]. Ir izstrādāta alkšņu biorafinēšanas koncepcija, kuras pamatā ir alkšņu koku stādījumi uz deģenerētas augsnes, koncepcija ietver ekonomiskos rādītājus, mazina bažas par fosilā kurināmā pieejamību un nodrošina ilgtermiņa ilgtspējību. Alksnis tiek vērtēts kā biorafinēšanas izejviela, jo tas ir vienīgais Ziemeļeiropas reģionā dabiski ātri augošais lielapjoma koks ar slāpekli fiksējošām un stiprām fosfora simbiozes īpašībām, tāpēc tas ir ierosināts kā līdzeklis noplicinātu augšņu reģenerācijai šajās teritorijās [54]. Simbiozes ceļā ar baktērijām un sēnītēm alkšņu koki pozitīvi ietekmē augsnes kvalitāti.

Alkšņi no bioloģiskā aspekta ir bērzu ģints vasarzaļi, ātraudzīgi koki un krūmi, kas sastāv no vairāk nekā 40 sugām, kuras galvenokārt izplatītas Āzijā, Āfrikā, Eiropā un Ziemeļamerikā [55]. Ziemeļu puslodes mērenajā joslā šajā ģintī ir 30 sugas. Latvijā sastopamas divas – baltalksnis un melnalksnis.

Baltalksnis Latvijā ir otra visvairāk izplatītākā lapkoku suga – atbilstoši Valsts meža dienesta datiem baltalkšņa mežaudzes pēc platības aizņem 7 % no kopējās mežu platības. Baltalkšņa audžu īpatsvars Latvijas mežos ir strauji palielinājies tieši pēdējā gadsimta laikā. Ja 1925. gadā baltalkšņa audzes aizņēma 3,9 tūkst. ha, tad 2003. gadā tās pārsedza 189 tūkst. ha [56,57]. Baltalksnim kā tipiskam tīrumu apmežotājam iezīmējas pieaugoša loma, jo īpaši, realizējot 21. gadsimta pamatnostādni: saudzēsime mežu – audzēsime kokus!

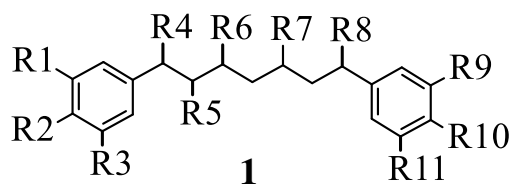
Baltalkšņa (*Alnus incana*) koksnī pašreiz izmanto galvenokārt malkai, kā arī šķeldas, taras kluču un kokogļu ražošanai. Citur pasaulē baltalksnī izmanto sērkociņu, finiera, celulozes, plastificētās koksnes un mēbeļu ražošanā. Baltalkšņa savdabīgā koksne aizvien vairāk rod pielietojumu pat koksnes elitāros izstrādājumos.

Melnalksnis (*Alnus glutinosa*) savkārt ir pieprasīts mēbeļu rūpniecībā gan finieru, gan apdares materiālu un mēbeļu ražošanā. Senāk melnalksnī tā ūdensizturības dēļ izmantoja aku grodiem, pāļiem un notekām. Pirms 100 gadiem laukos katrā virtuvē līdzās māla bļodām bija arī koka bļodas. Melnalkšņa koksne saskarē ar produktiem nerādīja īpašu piegaršu, tāpēc no tās gatavoja piena spainīšus un sviesta bunduļus, greba ikdienā lietojamus traukus.

Līdz šim *Alnus* ģintī ziņots par apmēram 300 dažādiem ķīmiskiem savienojumiem - sekundāriem metabolītiem, galvenokārt ietverot diarilheptanoīdus, flavonoīdus un kondensētos tanīnus, terpenoīdus un steroīdus [55,58,59]. Alkšņa mizas galvenie polifenoli, kas tiek iekļauti alkšņa biorafinēšanas produktu sarakstā, ir diarilheptanoīdi [54]. Diarilheptanoīdu klātbūtne ir raksturīga šīs ģints pazīme [55].

Diarilheptanoīdi pārstāv dabisku produktu klasi, kas veidota no 1,7-difenilheptāna (**1**) pamatstruktūras (skat 1.4. attēlu), ko veido divi aromātiskie gredzeni, kas savā starpā saistīti ar alifātisko ķēdi, kas sastāv no septiņiem oglekļa atomiem, tie var būt lineārā un cikliskā formā [60,61].

Lineāros diarilheptanoīdus var iedalīt divās apakšgrupās: nefenola diarilheptanoīdi un lineārie fenolu diarilheptanoīdi jeb kurkuminoīdi [62,63].



1.4.att. Lineāro diarilheptanoīdu 1,7-diarilheptāna pamatstruktūra, kurā iespējamās aizvietotāju pozīcijas ir apzīmētas ar R1-11 [66]

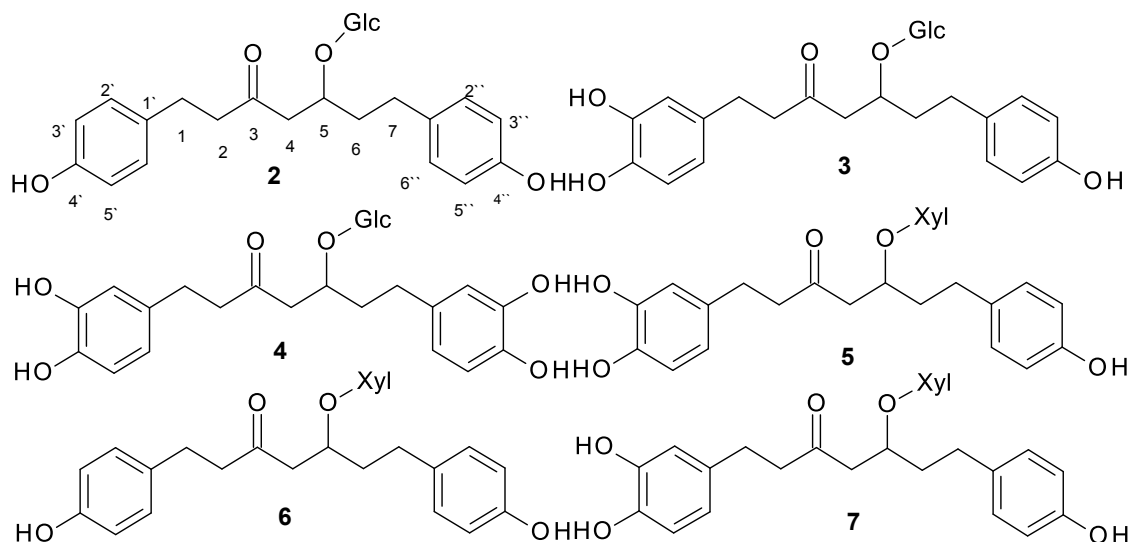
Jāņem vērā, ka aizvietotāju mainīgums dažādās diarilheptanoīdu alkilķēdes un aromātisko gredzenu pozīcijās noved pie daudziem iespējamiem struktūras variantiem, kurus var saistīt ar dažādiem bioloģiskiem efektiem [64,65]. Augos diarilheptanoīdi ir atrodamī ar dažādām oksidācijas pakāpēm, piesātinājumu (aizvietotājumiem), metilēšanos vai acilēšanos un tie galvenokārt tiek izdalīti glikozīdu veidā. Biežāk sastopami lineārie diarilheptanoīdi, bet oksidēšanās procesos var veidoties cikliskie diarilheptanoīdi ar bifēnil- vai difēnilētera veida struktūru. Diarilheptanoīdu savienojumi ir raksturīgi bērzu (*Betulaceae*) dzimtas ģintīm, īpaši *Alnus* sugām [67,68]. Alkšņu mizu sastāvā ir ziņots par 99 dažādiem diarilheptanoīdu savienojumiem [55]. Visvairāk datu ir par diarilheptanoīdu izdalīšanu no Āzijā un Ziemeļamerikā augošo alkšņu mizām [62,63]. Sarkanajā alksnī (*Alnus rubra*), Japānas alksnī (*Alnus japonica*), kā arī *Alnus firma*, *Alnus hirsuta* un *Alnus nepalensis*. Pētījumi par diarilheptanoīdu identificēšanu un izdalīšanu no Eiropas alkšņiem ir ierobežoti. *Alnus glutinosa* ir identificēti 25 diarilheptanoīdi (19 no tiem - mizā) [55,67,69,70]. *Alnus incana* mizā - tikai 7 diarilheptanoīdi [67,71,72].

Alkšņu mizās ir atklāti un izpētīti dažādas struktūras diarilheptanoīdu savienojumi:

- *fenola diarilheptanoīdu glikozīdi*

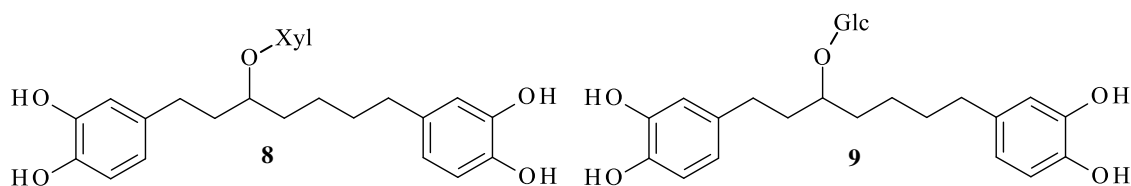
Ir pierādīts, ka vairums fenolu glikozīdi augos veicina aizsargfunkciju. Bojātos augu audos tie pārveidojas par aktīvām aizsargvielām. Sarkanajā alksnī ir atklāti šādi diarilheptanoīdu glikozīdi [73,74]: 1-(4`- hidroksifenil)-7-(4``-hidroksifenil)-5-O-β- D-glikopiranozilheptān-3-ons. **(2)**; 1-(3`,4`-dihidroksifenil)-7-(4``-hidroksifenil)-5-O-β-D-glikopiranozilheptān-3-ons **(3)**; 1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-heptān-3-ons-5-O-β-D-glikopiranozīds **(4)**; 1,7-bis (3,4-dihidroksifenil)-heptān-3-ons-5-O-D-ksilopiranozīds **(5)**; 1-(4`-hidroksifenil)-7-(4``-hidroksifenil)-5-O- β-D-ksilopiranozilheptān-3-ons **(6)**; 1-(3`,4`-

dihidroksifenil)-7-(4''-hidroksifenil)-5-O-β-D-ksilopiranozilheptān-3-ons (7). Šo savienojumu struktūrformulas dotas 1.5. attēlā.



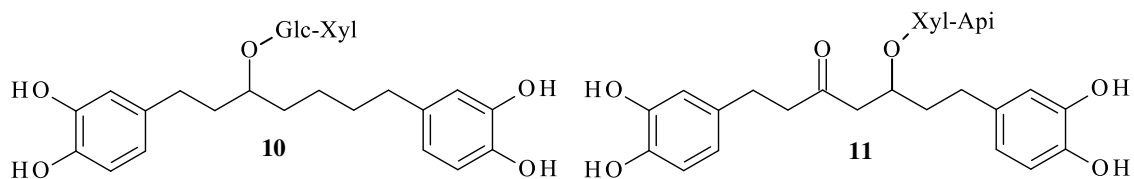
1.5.att. Vienu cukura atlikumu saturošu diarilheptanoīdu glikozīdu struktūrformulas

Iepriekš minētie diarilheptanoīdu glikozīdi bija karbonilgrupu saturoši ar cukura atlikumu pie 5 alifātiskās ķēdes oglekļa atoma, bet alkšņi satur arī glikozīdus ar cukura grupu pie 3 oglekļa atoma, piemēram, sarkanajā alksnī ir 1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-heptān-3-O-β-D-ksilopiranozīds (8), 1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-heptān-3-O-β-D-glikopiranozīds (9) (skat.1.6.attēlu) [75].



1.6.att. Diarilheptanīdi ar cukura grupas atlikumu pie 3 oglekļa atoma

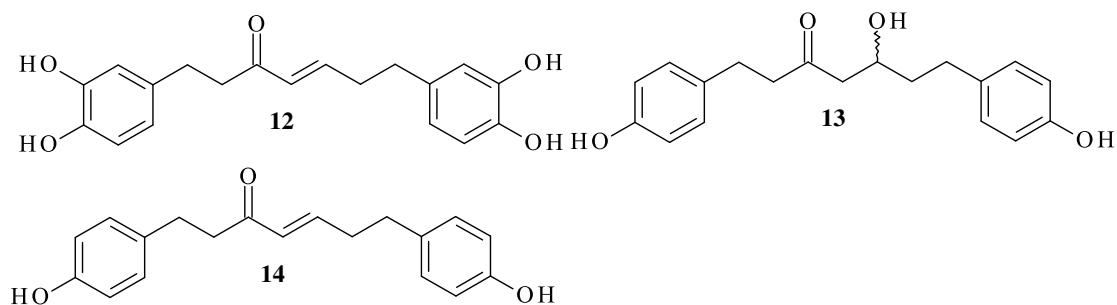
Alnus rubra ir pierādīti arī sarežģītākas struktūras diarilheptanoīdu glikozīdi, kas satur vairākus cukura atlikumus, kā, piemēram, 1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-heptān-3-O-(β-D-apiofuranozīds-(1→6)-β-D-glikopiranozīds (10); 1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-heptān-3-O-(β-D-glikopiranozīds-(1→3)-β-D-ksilopiranozīds (11) (skat. 1.7 attēlu) [76,77].



1.7.att. Divu cukura atlikumu saturoši diarilheptanoīdi

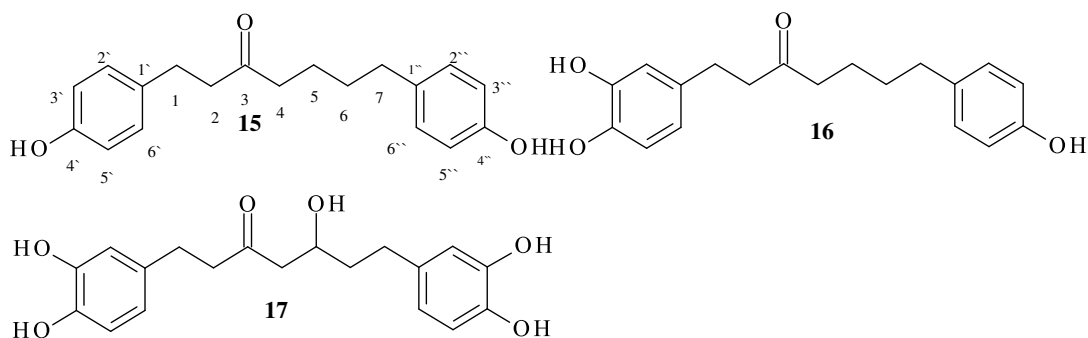
- Karbonilgrupu saturoši fenola diarilheptanoīdu aglikoni

Karbonilgrupu saturoši diarilheptanoīdi: hirsutenons (**12**), hannokinīns (**13**) un tā dehidratācijas produkts enons (**14**) (skat. 1.8. att.) ir pierādīti dažādās alksņu sugās *A.japonica*, *A.hirsuta*, *A.firma* [78,79].



1.8.att. Alksņiem raksturīgāko karbonilgrupu saturošo diarilheptanoīdu struktūrformulas

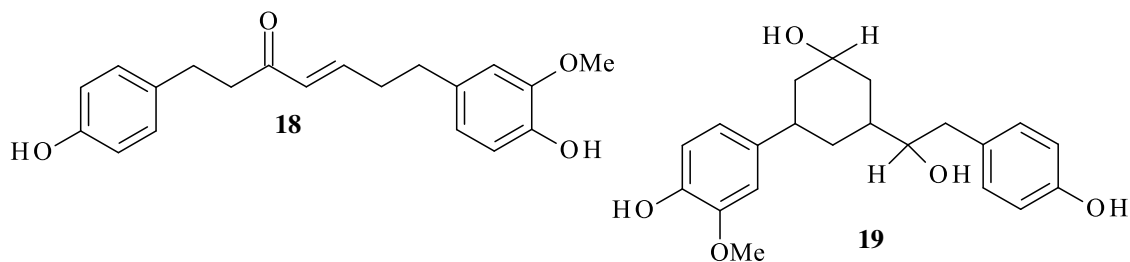
Alnus rubra jeb sarkanais alksnis satur arī karbonilgrupu saturošus diarilheptanoīdus: 1-(4'-hidroksifenil)-7-(4''-hidroksifenil)-4-heptēn-3-ons (**15**), 1-(3',4'-dihidroksifenil)-7-(4''-hidroksifenil)-4-heptēn-3-ons (**16**), 1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-5-hidroksiheptān-3-ons (**17**) (skat. 1.9. attēlu) [75,76].



1.9.att. Karbonilgrupu saturoši fenola diarilheptanoīdi sarkanajā alksnī (*Alnus rubra*)

- *Metilētie fenola diarilheptanoīdi*

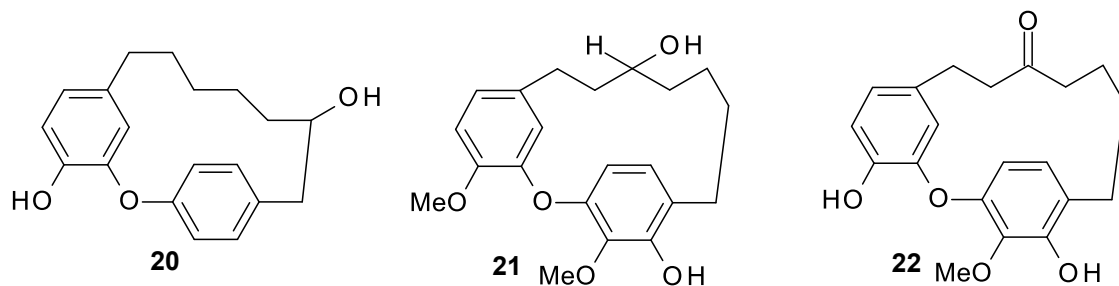
Alnus hirsuta ir identificēti šādi metoksilgrupu saturoši lineārie diarilheptanoīdi: 1-(4-hidroksifenil)-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-4-heptēn-3-ons (**18**), rhoiptelols (**19**) (skat. 1.10. attēlu) [80,81].



1.10.att. Metoksil fenola diarilheptanoīdi *Alnus hirsuta* biomasā

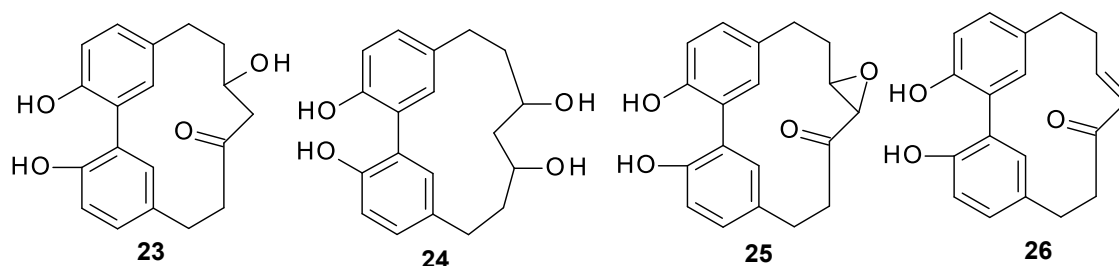
- *Cikliskie diarilheptanoīdi*

No *Alnus rubra* ir izdalīts cikliskais diarilheptanoīds acerogenins A (acerogenin A) (**20**), kas ir meta-para difenilētera veida cikliskais diarilheptanoīds. Tāda paša tipa struktūras diarilheptanoīdi ir identificēti arī *Alnus hirsuta*: 2-oksatricikloeikozan-3,5,7(20),15,17,18-heksēn-10-16-diols (**21**) un 2-oksatriciklo-eikozan-3,5,7(20),15,17,18-heksēn-10-ons (**22**) (skat. 1.11 attēlu) [82].



1.11.att. Bifenila tipa cikliskie diarilheptanoīdi *Alnus rubra* un *Alnus hirsuta* biomasā

Alkšņos ir identificēti arī meta-meta bifenila tipa cikliskie diarilheptanoīdi. Piemēram, *Alnus rubra*, *A.japonica* un *A.hirsuta* mizas sastāvā ir alnusonols (**23**) [62,83,84]. *A.japonica* un *A.hirsuta* ir arī alnusdiols (**24**) un alnusoksīds (**25**), kā arī alnusons (**26**) (skat. 1.12. attēlu) [55].



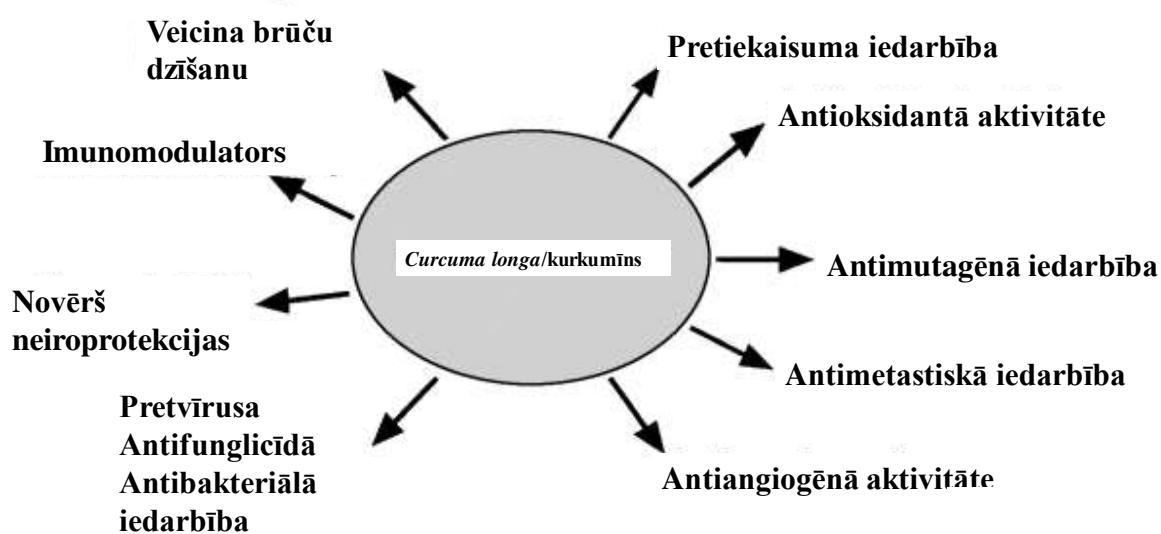
1.12.att. Alkšņos identificēto meta- bifenila diarilheptanoīdu struktūrformulas

Pētījumi par jauniem dabīgiem diarilheptanoīdu avotiem mūsdienās joprojām rada lielu interesi, jo šīs molekulas tiek uzskatītas par potenciāliem terapeitiskiem līdzekļiem dažādu labvēlīgo fizioloģisko efektu dēļ [85,86].

Attiecībā uz diarilheptanoīdu bioloģisko aktivitāti, nav šaubu, ka daudzsoļīgākās un izpētītās šāda veida molekulas ir kurkumīns un tā analogi [87].

Latvijā augošo alkšņu raksturīgais savienojums - oregonīns [88] arī ir klasificēts kā dabā sastopams kurkumīna analogs [89], tādejādi kurkumīns reprezentē gandrīz visus efektus, kas tiek saistīti ar diarilheptanoīdu savienojumiem.

Ir pierādīts, ka kurkumīnam piemīt plašs farmakoloģisko aktivitāšu spektrs, ieskaitot pretiekaisuma, pretvēža, antioksidantu, brūču dzīšanas un pretmikrobu iedarbību, nozīmīgākās kurkumīna bioloģiskās aktivitātes shematiski attēlotas 1.13. attēlā [90,91].



1.13. att. Kurkuma / kurkumīna galvenās bioloģiskās aktivitātes [90]

1.5. Alkšņu polifenola savienojumu bioloģiskās aktivitātes

Gandrīz visas *Alnus* ģintī ietilpstošās sugas tradicionāli tiek izmantotas Ājurvēdā, Unani un ķīniešu tautas medicīnā; tradicionālā korejiešu medicīna tos izmantoja asiņojošām vai apdegumu traumām, drudzim, caurejai un alkoholismam. Mūsdienu vietējie dziednieki arī plaši izmanto *Alnus* sugu mizas dažādu ārstniecisko tēju pagatavošanai. *Alnus* sugām ir pierādīta vērā ņemama pretvēža aktivitāte, kas ir visievērojamākā un svarīgākā farmakoloģiskā aktivitāte [92,93]. Papildus tam alkšņiem piemīt arī antioksidantā, pretiekaisuma, pretmikrobiale, pretvīrusu un starojumu aizsardzības aktivitātes [94–98]. Diarilheptanoīdi ir galvenie nozīmīgie komponenti *Alnus* ģints kokos, kas nodrošina šīs ievērojamās bioloģiskās aktivitātes. Citi fenola savienojumi, tai skaitā flavonoīdi, kas *Alnus* augos ir plaši atrodami kā sekundārie metabolīti, ir ziņoti kā svarīgi to spējai darboties kā antioksidantiem [82].

• *Pretvēža aktivitāte*

Daudzi pētījumi ir pieejami par hirsutenona, kas izdalīts no *A. japonica*, *A. hirsuta* and *A. pendula* biomasas farmakoloģisko iedarbību. Tam ir līdzīga ķīmiskā struktūra un pretvēža īpašības kā kurkumīnam, kuru ASV Nacionālais vēža institūts klasificē kā trešās paaudzes ķīmikāliju audzēju novēršanai [55]. Diarilheptanoīdiem no *A. glutinosa* mizas ir pierādīta spēcīga pretvēža aktivitāte salīdzinot ar citiem tās pašas sugas diarilheptanoīdiem un tā tika noteikta kā ievērojami augstāka nekā kurkumīnam, kas tika izmantots kā pozitīva kontrole. Struktūras -aktivitātes analīze ir atklājusi lielu citotoksiskās iedarbības atkarību no karbonilgrupas klātbūtnes pie C-3, heptāna ķēdes aizvietotājiem pie C-5 un hidroksilgrupu skaita aromātiskajos gredzenos. Turklāt ir konstatēts, ka ketoenola grupa un hidroksilgrupas aromātiskajā gredzenā, dod visspēcīgāko citotoksisko aktivitāti [55]. *A. incana* un *A. viridis* lapu, mizu un čiekuriņu ekstraktiem ir ziņots spēcīgs citotoksiskās iedarbības kavējošs efekts uz HeLa šūnām ar IC_{50} vērtībām no 26,0 līdz 68,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

• *Antioksidantā aktivitāte*

Brīvo radikāļu kaitējums ir saistīts ar daudzu deģeneratīvu slimību, tai skaitā vēža rašanos, sirds un asinsvadu slimībām, kataraktu un novecošanos. Antioksidanti var mazināt šo kaitīgo iedarbību, tādēļ tie ir izraisa lielu interesi ne tikai veselības aprūpes un kosmētikas jomās, bet arī pārtikas rūpniecībā. Polifenoli ir dabiski antioksidanti [99]. *A. incana* ekstrakti un *A. viridis* lapas, miza un čiekuri ir atzīti par spēcīgiem DPPH brīvo radikāļu inhibītoriem ar IC_{50} vērtībām no 3,3 līdz 18,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tomēr tās korelācija ar

kopējo fenola un tanīna saturu netika novērota. Rezultāti parādīja, ka antioksidanta iedarbību var saistīt, piemēram, diarilheptanoīdu un triterpenoīdu saturu [98]. Ir pierādīts, ka brīvi radikāļu inhibēšanas spēja ir cieši saistīta ar diarilheptanoīdu fenoliskajām hidroksilgrupām, to saturošiem diarilheptanoīdiem ir būtiska augstāka antioksidatīvā aktivitāte [100]. Nesen veiktie apvienotie teorētiskie un eksperimentālie pētījumi, pierādīja, ka katehola daļa kā H-atoma donors ir ļoti svarīga brīvo radikāļu inhibēšanai [94].

• **Pretiekaisuma aktivitāte**

No *A. japonica*, *A. hirsuta*, *A. firma*, *A. formosana*, *A. nitida*, *A. nepalensis* un *A. acuminata* iegūti diaryheptanoīdi un to glikozīdi, ir parādījuši ievērojamu pretiekaisuma iedarbību [55]. Struktūras un aktivitātes attiecības analīze liecināja par keto-enola grupas klātbūtni heptāna daļā vai kofenilgrupas grupu aromātiskajā gredzenā kā svarīgu pretiekaisuma aktivitātes faktoru [55,101].

• **Antimikrobiālā un pretvīrusu aktivitāte**

Ir ziņots, ka *A. pendula* mizas ekstraktiem ir ievērojama antibakteriālā aktivitāte pret meticilīnrezistentu *Staphylococcus aureus*, ir pat pierādīts, ka aktivitāte ir salīdzināma ar antibiotiku pielietošanu. Oregonīns un hirsutenons inhibēja MRSA celmus ar minimālo inhibējošo koncentrāciju (MIC) no 31,3 līdz 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [55]. *A. incana* un *A. viridis* čiekuru, lapu un mizas ekstrakti ir uzrādījuši pretmikrobu iedarbību pret 15 mikroorganismiem ar MIC vērtībām no 0,12 līdz 0,29 mg mL^{-1} [98].

• **Hepatoprotektīvā aktivitāte**

A. firmas mizas ekstraktiem ir ziņota ievērojama antifibrotiskā aktivitāte, proti, spēcīga inhibējoša iedarbība uz asinsrades cilmes šūnām (HSC). Autori noteica, ka C-3 un C-5 alifātiskajā ķēdē varētu būt atbildīgs par diarilheptanoīdu kavējošo darbību HSC proliferācijā [102]. Korejā *A. japonica* tiek izmantots hepatīta ārstēšanā, pēc struktūras īpašībām autori uzskata, ka efekts ir cieši saistīts ar katehola daļu molekulā, citi pētījumi arī apstiprina, ka hepatoprotektīvā iedarbība ir cieši saistīta ar antioksidanto aktivitāti [55].

• **Aizsardzība pret DNS bojājumiem**

Daudzi no *A. glutinosa* un *A. viridis* izdalītiem diarilheptanoīdiem uzrada izteiktu cilvēka limfocītu DNS bojājumu samazināšanās efektu un šis efekts ir pat spēcīgāka par zināmo sintētisko proteīnu amifostīnu [69]. Alkšņu mizas diarilheptanoīdi ir parādījuši

pret ķīmijterapiju aizsargājošu efektu iekšsūnu līmenī, un tādejādi tos varētu uzskatīt par aizsardzības līdzekļiem ne-vēža šūnām ķīmijterapijas laikā [55].

- **Insekticīdā aktivitāte**

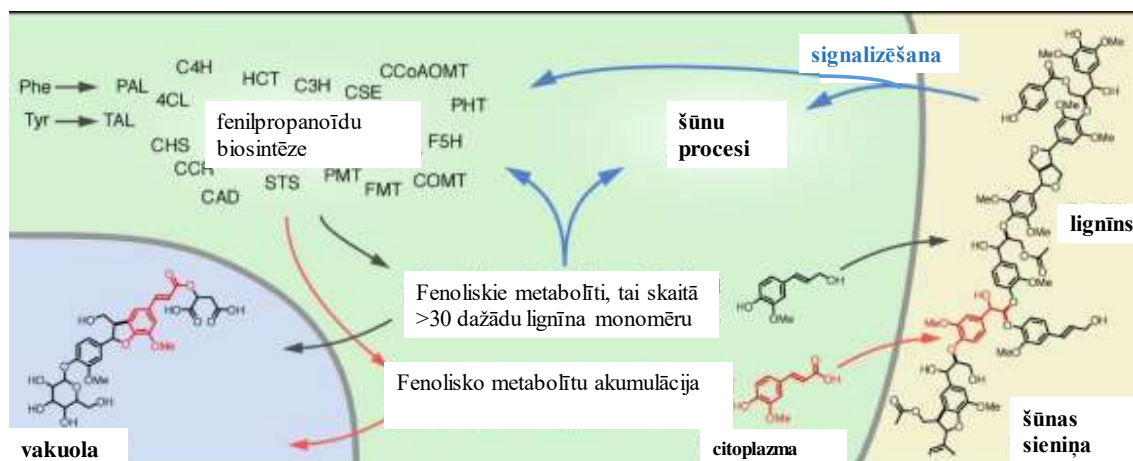
Ir ziņots, ka *A. japonica* mizas ekstrakts uzrāda kavējošu ietekmi uz *Trypanosoma brucei* augšanu. No tā izdalītie diarilheptanoīdi oregonīns un hirsutenons parādīja acīmredzamu inhibējošu efektu pret *T. brucei* augšanu asinsritē ar IC_{50} vērtībām 1,14 un 1,78 μ M. To struktūras un aktivitātes attiecību analīze atklāja, ka 3-okso funkcija heptāna ķēdē diarilheptanoīdu molekulā ir nozīmīga šī efekta nodrošināšanā [103].

1.6. Bioloģiski aktīvi lignīna atvasinājumi

Lignīns ir makromolekula, kas sastāv no fenilpropanoīdu vienībām, tas ir otrs izplatītākais dabas polimērs biosfērā, un ir viens no pamatkomponentiem, kas tiek iegūts biomasas ķīmiskajā pārstrādē. Ekstraktvielas savukārt ir zemmolekulāri savienojumi, kurus iegūst biomasas ekstrakcijā ar dažāda veida šķīdinātājiem, dažām no tām ir ļoti liela komerciālā vērtība [104]. Inovatīvs atklājums mūsdienās ir šo abu vērtīgo dabas polifenolu savienojumu multisinerģiskas bioloģiskās aktivitātes konstatējot to ķīmisko mijiedarbību, dabiskos dabasvielu kompleksos.

Lignīna, kas ir viena no galvenajām augu biomasas sastāvdaļām, valorizēšana kā bioķīmisko vielu avots ir ārkārtīgi svarīga ilgtspējīgu resursu izmantošanā [4]. Skujkoksne satur no 24 līdz 33 % lignīna, bet lapkoksne - no 19 līdz 28 %. Lignīns ietilpst arī viengadīgo augu sastāvā, lauksaimniecības kultūru sastāvā. Bambusniedru, cukurniedru un labības augu stiebrs tā saturs svārstās no 15 līdz 25 % [105,106]. Lignīns ir trīs dimensionāls polimērs, kas sastāv no metoksilētām fenilpropāna (C_6-C_3) vienībām, saistītām ar dažāda tipa ēteriskām un C-C saitēm. Dabiskos apstākļos tas eksistē interpolimērajā kompleksā ar ogļūdeņražiem, pirmā kārtām hemicelulozēm [107]. Lignīnu parasti raksturo kā sastāvošu no p-hidroksifenil- (H), gvajacil- (G) un siringil- (S) vienībām, kuras rodas attiecīgi hidroksicinnamilspirtu, p-kumarilgrupas, koniferilgrupas un sinapilspirta polimerizācijas rezultātā. Tomēr lignīnu iegūst arī no dažādiem citiem aromātiskiem monomēriem. Līdz šim metabolīti no vairāk nekā 10 dažādām ķīmiskām klasēm ir identificēti kā lignīna veidojošie bloki, kopā 35 dažādi monomēri. Neskatoties uz šo lignīna struktūras elastīgumu, pastāv ierobežojumi lignīna sastāva izmaiņām. Lignīna biosintēzes ceļš tiek regulēts vairākos līmeņos. Sintēzes starpprodukti uzkrājas un

tiek pārveidoti par plašu atvasinājumu klāstu. Starpprodukti un to atvasinājumi ir vai nu iestrādāti lignīna polimērā, vai arī paliek šķīstoši, potenciāli ietekmējot fizioloģiskos procesus [108] (skatīt 1.14. attēlu).

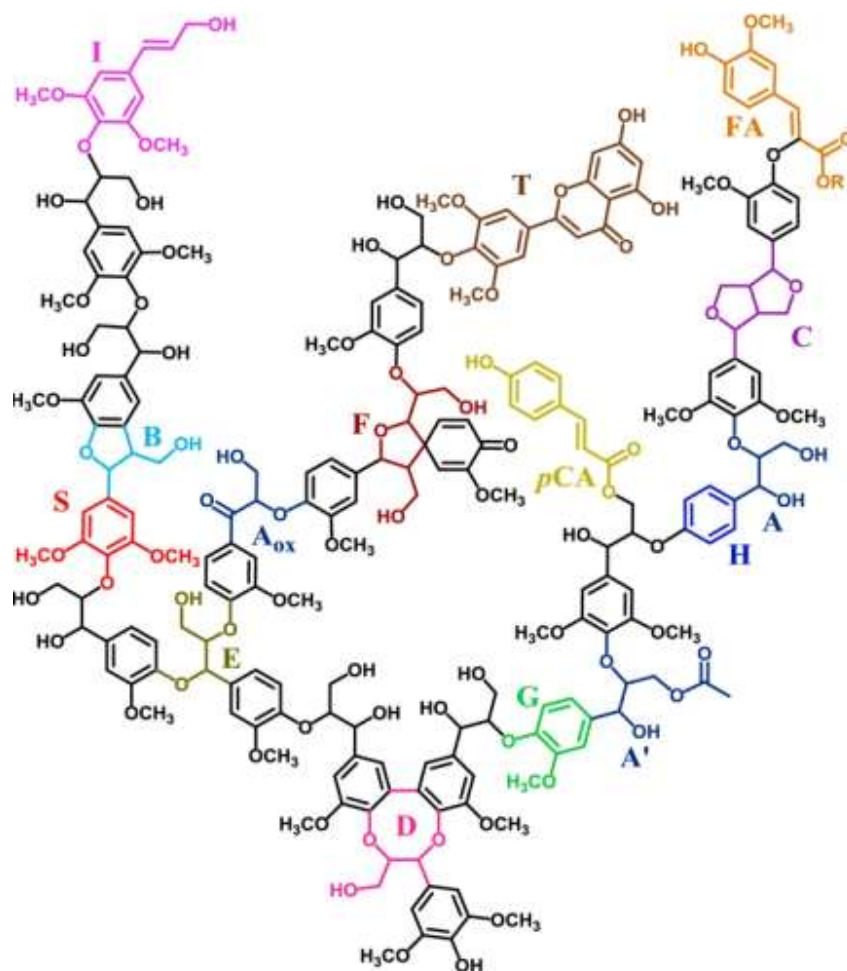


1.14. att. Lignīna biosintēze un tā integrācija metabolismā [108]

Nemot vērā, ka promocijas darbā ir veikta kviešu salmu lignīna saturošu polifenola savienojumu analīze, detalizētāk apskatīts tiek kviešu salmu lignīns.

Kviešu salmi satur 35–45 % celulozes, 20–30 % hemicelulozes un aptuveni 15 % lignīna, kas to padara par pievilcīgu izejvielu etanola ieguvei un citiem pievienotās vērtības produktiem [109]. Lignocelulozes biomasas pārvēršana bioetanolā ietver ogļhidrātu saharifikāciju līdz reducētiem cukuriem hidrolīzes ceļā un sekojošu brīvo cukuru fermentāciju etanolā. Tomēr lignīna klātbūtne, spēlē galveno strukturālo lomu augu biomasā ierobežojot fermentu piekļuvi celulozei, tādējādi samazinot hidrolīzes efektivitāti. Lai uzlabotu ogļhidrātu hidrolīzi ir nepieciešams veikt efektivitātu pirmsapstrādes metožu izstrādi lignīna modificēšanai un/vai izdalīšanai [109].

Lignīns ir heterogēns fenola polimērs, kas stiebrzālēs sastāv no p-hidroksifenil- (H), gvajacil- (G) un syringil- (S) subvienībām, kuras savā starpā ir saistītas ar dažādām oglekļa-oglekļa un arilētera saitēm, visbiežāk ar β -O-4 ētersaiti kā visizplatītāko (~ 80 %) [110]. Graudāju tipa lignīna strukturālo sarežģītību vēl vairāk palielina p-kumarīnskābes, ferulskābes un tricīna inkorporācija makromolekulā. Kviešu salmu lignīna shematiska struktūra ir parādīta 1.15. attēlā.



1.15. att. Kviešu salmu lignīna modelis, parādot visizplatītākas apakšstruktūras: H: p-hidroksifenilvienība; G: gvajacilvienība; S: siringilvienība; A: β -O-4'alkil-aril ēteris; A': β -O-4'alkil-arilēteris γ -acilēts; Aox: β -O-4'alkil-arilēteris, α -oksidēts; B: fenilkumarāns; C: resinols; D: dibenzodioksocīns; E: α , β -arilēteris; F: spirodienons; I: cinamilspirts (vai aldehīds); T: tricīns; pCA: p-kumarāts; FA: ferulskābe (R = H vai arabinoze)

Vairāki jauni monomēri un dažādu iekšējo saišu specifiskas detaļas lignīna polimēros ir atklātas pavisam nesen [111,112]. Piemēram, flavons tricīns (5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)-4H-hromen-4-ons), kas iegūts no šikimāta un acetāta / malonāta atvasinājumu kombinācijas [113,114]. Tikai nesen tika atklāts, ka tas ir sastopams kviešu salmu lignīna polimēra molekulā [115]. Saskaņā ar jaunākajiem pētījumiem tricīnam ir raksturīgas svarīgas bioloģiskās īpašības, ieskaitot antioksidanto,

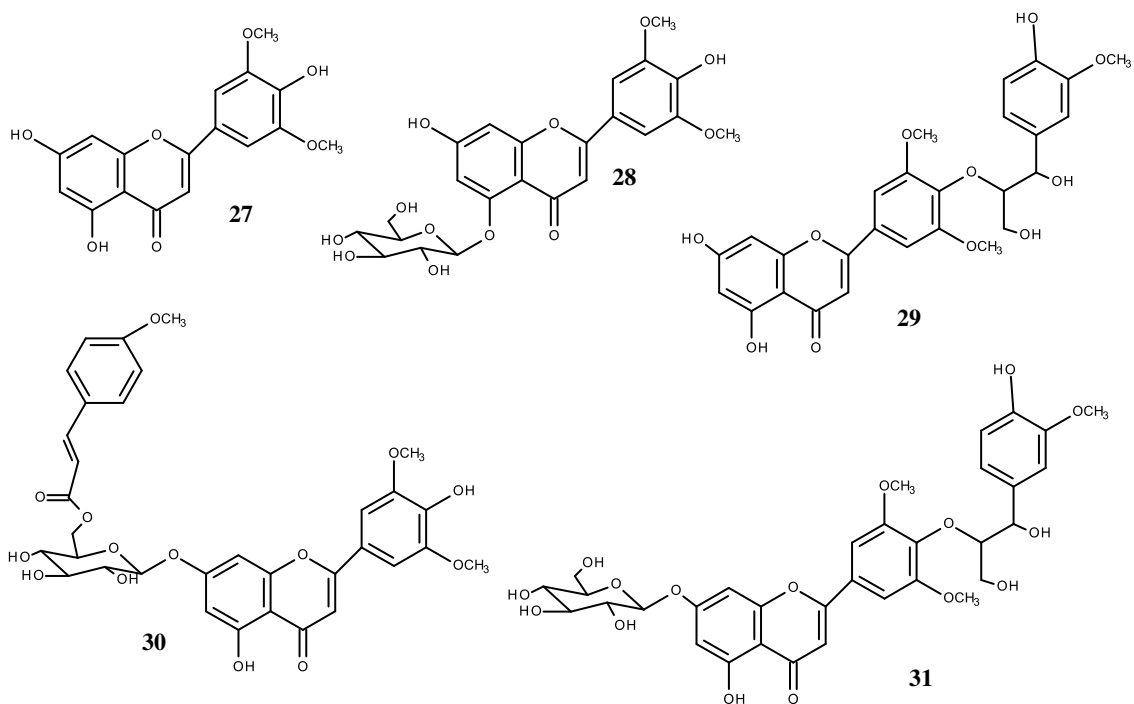
anti-novecošanās, pretvēža un kardioprotektīvo darbību, un tas ir vērtīgs savienojums cilvēku veselībai un daudzfunkcionāls barības līdzeklis. Mazs tricīna saturs augu audos un efektīvas, lētas tā ieguves metodes trūkums kavē tā praktisku izmantošanu. Pēdējo divu gadu laikā ir ievērojami palielinājies to publikāciju skaits, kurās aprakstīts tricīna potenciāls. Ir parādīts, ka augu audos integrētā lignīna tricīna saturs visos gadījumos ir daudz lielāks par ekstrahējamo tricīna līmeni. Tika ierosināts, ka lignīnu saturošas plūsmas no biomasas pārstrādes varētu kalpot kā alternatīvs šī vērtīgā flavona ieguves avots.

1.7. Kviešu salmu tricīna – lignīna savienojumi un to bioloģiskā aktivitāte

Tricīns tika atklāts 2012. gadā kviešu salmu (*Triticum aestivum*) lignīna struktūrā, pēc tam arī citos graudaugu lignīnos. Tricīns ir pirmais monomērs, kas atrodas ārpus līdz šim zināmā monolignola biosintēzes ceļa, bet ir iesaistīts lignīna veidošanā. Tricīnu un tā atvasinājumus var ekstrahēt no graudaugu bimasas, piemēram, kviešiem (*Triticum aestivum*), auzu klijām (*Avena sativa*), bambusa (*Leleba oldhami*), cukurniedrēm (*Saccharum officinarum*) un kukurūzas (*Zea mays*). Ekstrahētie savienojumi var būt pats tricīns (27) neizmainītā veidā, tricīna-5-O-glikopiranozes (28), tricīna-4-O-guijajacilglicerilētera (29), tricīna-7-O-(6''-metoksikanēļskābes)-glikozīda (30), tricīna vai flavonolignāna formā, kurā tricīns ir 4'-O-ēterificēts ar koniferilspirtu (31), iepriekš minētas visbiežāk sastopamās struktūras ir parādītas 1.16. attēlā [116,117].

Biomimētisko radikāļu reakcijas apstiprināja tricīna struktūras esamību polimeriālajā lignīnā un to kā iespējamu nukleācijas vietu ligifikācijai [118]. To apstiprina arī tas, ka graudaugu lignīnā gandrīz pilnībā nav siringilrezinola vienību (dimērs, kas parasti sāk lignīna ķēdi S-G lignīnos), ir pierādīts, ka tajos lignīna ķēdes sākas vai nu ar tricīnu, vai ar acilēto monolignolu dimerizāciju [116].

No bioloģiskās aktivitātes viedokļa ir ziņots, ka tricīna savienojumi aizsargā augus no patogēniem kaut arī tricīna fizioloģiskā funkcija augos joprojām ir slikti izprotama. Tricīna bioloģiskās aktivitātes, par kurām nesen ziņots, ietver to antioksidāto, anti-novecošanās, pretvēža un kardioprotektīvo potenciālu [117].



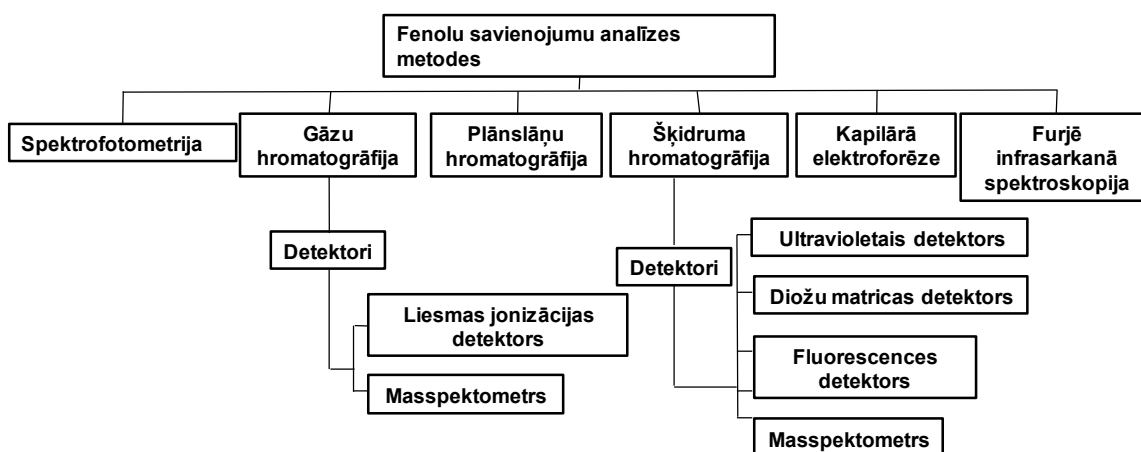
1.16. att. Visbiežāk graudaugos sastopamās tricīna savienojumu struktūras [117]

Tricīna molekulu izplatība kviešu salmu lignīnā norāda, ka tricīna vienībām ir svarīga loma lignīna polimēra veidošanā. Sākotnējie tricīna koncentrācijas novērtējumi, parādīja, kas tas veido apmēram 15 % no salmu lignīna [119]. Brīvā tricīna saturs kviešu, kukurūzas, auzu salmos ir ziņots 376, 91, 601 un 64 mg kg⁻¹. Tomēr ar lignīnu saistīta tricīna saturs bija attiecīgi 4841, 1304, 5250 un 980 mg kg⁻¹ kviešu, kukurūzas, auzu un rīsu salmos, kas ir ievērojami vairāk nekā brīvs tricīns [113].

Tā kā tricīns lignīna polimērā pievienojas tikai caur tricīna-4-O-β-ēterveidā, vairākas lignīna raksturojuma metodes (acidolīze, tioacidolīze un DFRC), kas paredz β-β ētera saites šķelšanu ir izmantojamas tricīna atbrīvošanai no lignīna matricas tā tālakai kvantitatīvai noteikšanai. Tricīnu savienojumu noteikšanas pētījumi, izmantojot GC-MS, ir bijuši neveiksmīgi. Lai gan savienojuma gaistamību var uzlabot ar trimetilsililēšanu, trimetilsililtricīns (ar TMS 5, 7 un 4 pozīciju hidroksilgrupās) nebija stabils GC apstākļos un daļēji sadalījās di- un mono-TMS tricīnā. Tāpēc tricīna kvantitatīvai noteikšanai, izmantojot MRM režīmu, tiek piedāvāta LC sistēma, kas aprīkota ar masspektrometru. Šai pieejai ir piemērota selektivitāte un jutība un nav nepieciešama nekāda molekulu modificēšana [117,120,121].

1.8. Augu polifenolu un to saturošo ekstraktu analīzes metodes

Lielu daļu augu fenolu analīzes apgrūstina šo savienojumu daudzveidīgā ķīmiskā struktūra un tikpat kompleksa bioloģiskā matrica. Polifenolu kvantitatīvā noteikšana ir atkarīga no dažādiem parametriem, piemēram, savienojumu ķīmiskā rakstura, izmantotās ekstrakcijas metodes, daļiņu lieluma, standarta izvēles un traucējošajām vielām un piemaisījumiem. Vēl viens izaicinājums un vienlaikus problēma ir piemērotu ar augstu tīrības pakāpi standartu pieejamība. Tāpēc polifenolu analīzei izmanto dažādas metodes atkarībā no mērķsavienojumiem un biomasas matricas, analīzes metožu shēma [122] ir parādīta 1.17. attēlā.



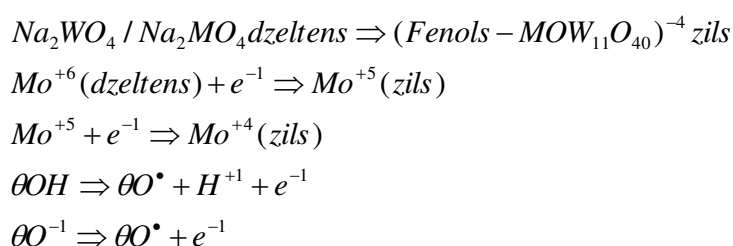
1.17. att. Fenolu savienojumu analīzes metožu shēma [122]

1.8.1. Augu polifenolu savienojumu spektrofotometriska raksturošana

Visplašāk tiek izmantotas UV/VIS molekulārās absorbcijas spektrometriskās metodes, kuru pamatā ir krāsu reakcijas, jo tās ir viegli veicamas, ātras, tām ir zemas izmaksas un līdz ar to piemērotas laboratorijā ikdienas lietošanā. Lielākais šo metožu trūkums ir reducēšanas reakcijas nespecifiskums, jo var reaģēt ne tikai fenolsikās hidroksilgrupas, bet arī paraugā esošie nefenoliskie reducējošie savienojumi, tādējādi iegūstot paaugstinātu rezultātu [123]. Visbiežākās blakusvielas, kas paaugstina rezultātu ir aromātiskie amīni, askrobīnskābe un endiols. Cukuri sārmainā vidē sadalās veidojot endioli (molekulu ar dubultlādiņu un divām blakusstāvošām hidroksilgrupām), kas viegli oksidējas [124].

• **Folina – Čikolto metode**

Vairumā gadījumu kopējo polifenolu noteikšanai izmanto Folina – Čikolto metodi, jo tā ir salīdzināma ar citām metodēm [125]. Folina–Čikolto metode ir UV/VIS spektrofotometriskā metode, kurā tiek mērīta krāsas maiņa, kas notiek molibdēna- tungstāda reaģenta reducēšanas procesā, ko izraisa paraugā esošie polifenola savienojumi [126]. Reakcijā (skatīt 1.18. attēlu) veidojas zila hromofora, kuras maksimālā absorbcija ir atkarīga no šķīduma sārmainības un fenolisko savienojumu koncentrācijas .



1.18. att. Folina-Čikolto reaģenta reakcija ar polifenoliem [127]

Ir jāņem vērā, ka šis reaģents sārmainos šķīdumos ātri sadalās, tas rada nepieciešamību to izmantot lielā pārākumā, lai panāktu pilnīgu reakciju, tomēr pārlietu liels pārākums rezultējas nogulsnēs un duļķainībā, šīs duļķainības novēršanai izmanto litija sāļus. Arī šajā metodē visbiežāk kā traucējošās vielas ticamu rezultātu ieguvei ir aromātiskie amīni, augsts cukuru saturs vai askrobīnskābes klātbūtne, arī sulfīti un sēra dioksīds reaģē ar Folina – Čikolto reaģentu, tā ir problēma vīnu rūpniecībā [128]. Zilā krāsa, kas radusies istabas temperatūrā tiek izteikta kā molārā absorbcija, kas ir attiecināma uz reaģējošiem savienojumiem, tabulā ir parādīts molāro absorbciju salīdzinājums tipiskiem polifenola savienojumiem un to noteikšanas traucējošiem savienojumiem kā amīniem un cukuriem [129] (skatīt 1.1.tabulu).

Metodē svarīga ir references vielas izvēle, jo šī metode nosaka kopējo fenolisko hidroksilgrupu koncentrāciju augu ekstraktā. Visbiežāk kā standartvielas izmanto galusskābi, katehīnu vai tanīnskābi. Viplašāk tiek izmantota tieši galusskābe kā standartviela un rezultāti tiek izteikti galusskābes ekvivalentos (GSE), tomēr standartvielas izvēle ir neierobežoti plaša un references standartu var izvēlēties atkarībā no parauga ķīmiskā sastāva vai mērķsavienojumiem.

Molārā absorbcija visbiežāk izplatītajiem fenola savienojumiem un to traucējošiem komponentiem Folina – Čikolto metodē [129]

Savienojums	Molārā absorbcija (:1000)	Brīvās fenola hidroksilgrupas molekulā	Grupas molekulā, kas piedalās reakcijā	Molārā absorbcija uz reakcijas grupām
Fenols	12,7	1	1	12,7
<i>p</i> - kumarīnskābe	15,6	1	1	15,6
Tirozīns	15,7	1	1	15,7
Katehols	22,5	2	2	11,2
Hlorogēnskābe	28,9	2	2	14,4
DOPA	24,6	2	2	12,3
Ferulskābe	19,2	1	1	19,2
Vanilīns	14,9	1	1	14,9
Pirogallols	24,8	3	2	12,4
Gallusskābe	25,0	3	2	12,5
Sinapīnskābe	33,3	1	2	16,6
Floroglucinols	13,3	3	1	13,3
<i>p</i> - hidrohinons	12,8	2	1	12,8
Rezorcinols	19,8	2	1	19,8
(+)- katehīns	34,3	4	3	11,5
Kampferols	29,6	3	2	14,8
Kvercētīns	48,3	4	3	16,1
Kvercitrīns	44,8	4	3	14,9
4-metilskuletīns	31,1	2	2	15,6
<i>o</i> -aminofenols	21,8	1	2	10,9
<i>p</i> -aminofenols	12,5	1	1	12,5
<i>p</i> - metilanilīns	11,6	0	1	11,6
<i>o</i> - diaminobenzēns	21,4	0	2	10,7
Flavons	0,1	0	0	0,1
Flavanons	1,9	0	0	1,9
3-hidroksiflavons	3,5	0	0	3,5
4-hidroksikumarīns	0,1	0	0	0,1
Acetilsalicilskābe	0,2	0	0	0,2
D-fruktoze	0,0	0	0	0
Askorbīnskābe	17,5	0	1	17,5
Dzelzs sulfāts	3,4	0	1	3,4

Tomēr jāatceras, ka metode nosaka potenciāli oksidējamās fenoliskās grupas un tās var ievērojami atšķirties gan fenolisko savienojumu grupas ietvaros gan starp grupām. Šī metode dod ļoti noderīgu informāciju par fenolisko vielu saturu paraugā, taču ne vienmēr korelē ar patieso fenolu daudzumu, tomēr ļoti daudzi pētījumi ir pierādījuši, ka noteiktais kopējais fenolu savienojumu daudzums korelē ar antioksidanto aktivitāti [130,131]. Galvenās metodes priekšrocības ir metodes vienkāršība, laba atkārtojamība, pati metode jau

ir diezgan standartizēta un gala produkta absorbcija tiek mērīta pie liela viļņa garuma, kas samazina iespēju parauga matricas ietekmei [132].

1.8.2. Augu polifenolu gāzes hromatogrāfijas analīze

Daudzi gaistošie savienojumi ir bez iepriekšējas sagatavošanas analizējami ar gāzu hromatogrāfiju, kas ir nepārspējama analīzes metode individuālu savienojumu atdalīšanai, identifikācijai un kvantificēšanai. Jo īpaši, ja to apvieno ar masas spektrometriju tā piedāvā augstu jutību un selektivitāti. Tomēr ir jāņem vērā, ka kaut vai viena OH grupa fenola savienojumos, tā var veidot ūdeņraža saites, kas palielina savienojumu kušanas temperatūru. Līdz ar to tas rada nopietnas bažas par šo paņēmieni piemērotību fenola savienojumu analīzei to sliktās gaistamības dēļ. Neskatoties uz to gāzu hromatogrāfija ir būtiska analīzes metode augu izcelmes paraugu analīzē, īpaši tādiem fenola savienojumiem kā fenolskābes, flavonoīdi un kondensētie tanīni [32,133]. Polifenola savienojumi gāzes hromatogrāfijas analīzēm parasti metilējot tiek pārveidoti par gaistošākiem atvasinājumiem vai pārvērsti par trimetilsililatvasinājumiem [134]. Gāzu hromatogrāfija piedāvā labākas savienojumu identificēšanas iespējas nekā citas hromatografiskās metodes, tomēr, analizējot fenola savienojumus, joprojām ir daudz izaicinājumu, jo savienojumiem ir zema gaistamība, to analīzei ir nepieciešama pārveide gaistošos atvasinājumos, tomēr ekstrakti ir sarežģītu daudzkomponentu maisījumu, kur katrs savienojums var reaģēt atšķirīgi [135].

Augstmolekulāra polifenola lignīna analīzei pirms gāzu hromatogrāfijas analīzes veic makromolekulu degradāciju, izmantojot pirolīzi. Pirolīzes un gāzes hromatogrāfijas tandēmu sauc par analītisko pirolīzi. 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 maspektrometriju. Pirolīzē molekula ar siltumu tiek sašķelta specifiskās vietās ar zemām saišu enerģijām. Analītiskās pirolīzes apstākļos notiek ēteru 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 polimērās molekulas 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 destrukciju. Pirolītiskas dehidrogenācijas 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 siringilatvasinājumu relatīvā satura pamata iespējams paraugus klasificēt kā gvajacil-tipa vai gvajacil/siringila tipa lignīnus [136–138].

1.8.3. Šķidrums hromatogrāfija kā augu polifenolu analīzes metode

Šķidrums hromatogrāfija ir visizplatītākā metode polifenolu savienojumu atdalīšanai un kvalitatīvai, kvantitatīvai noteikšanai [139]. Daži faktori, kas būtiski ietekmē polifenolu LC analīzi ir, piemēram, paraugu šķīdība, kolonnu tips, detektoru izvēle, mobilā fāze un analizējamo savienojumu īpašības. Pārsvārā polifenolu noteikšanai izmanto UV absorbciju [32]. Acetonitrils un metanols vai to ūdens formas ir dominējošās mobilās fāzes, ko izmanto fenolu kvantitatīvai noteikšanai. Dažos gadījumos tiek izmantots arī etanols, tetrahidrofurāns un propanols. Mobilās fāzes pH līmeni, ieteicams uzturēt diapazonā no pH 2–4, lai identifikācijas laikā izvairītos no fenolu jonizācijas. Tāpēc izmanto pārsvārā ūdens paskābinātas mobilās fāzes, visbiežāk ar etiķskābi vai skudrskābi, dažreiz arī fosforskābi. Ja individuālu polifenolu kvantificēšanai visbiežāk izmanto ultravioleto vai fluorescences detektorus, tad dažādu fenola klašu struktūras raksturošanai un apstiprināšanai pārsvārā pielieto masspektometriju [32]. Pēdējos gados masspektometrija parasti tiek izmantota polifenolu analīzē tās augstās jutības un selektivitātes dēļ, turklāt tā sniedz strukturālu informāciju par nezināmiem savienojumiem [122]. Šīs analīzes paņēmiens var šķīst selektīvs un vienkāršs, bet patiesībā tas ir ļoti sarežģīts. Mērlielums ir izvēlēto molekulu fragmentu summa, un kamēr nerodas dažādi traucējumi, analīze ir ātra. Pamatā šo metodi izmanto savienojumu identifikācijai citu savienojumu klātbūtnē jeb citiem vārdiem sarežģītā matricā. Ķīmiskajā analīzē matrica reaģē savādāk nekā analīts, ja tā nav tad tai var būt liela ietekme uz rezultātu kvalitāti un patiesumu. Matricas efektu LC-MS analīzē var definēt kā izmaiņas signālā, ko izraisa līdzeluētie matricas savienojumi, salīdzinājumā ar tīru standartu. Matricas ietekmi pārbaude pievienojot mazu daudzumu nosakāmā savienojuma standartšķīdumu un tad analīzē vēlreiz, analīta koncentrācijai un attiecīgi signāla intensitātei būtu jāpieaug. Visbiežākā matricas ietekme ir līdzeluēto savienojumu

spēja samazināt vai palielināt interesējošā analīta jonizāciju, kas būtiski izmaina metodes parametrus kā detektēšanas robežu (LOD), kvantificēšanas robežu (LOQ), linearitāti, pareizību un precizitāti, nereti tiek novērots arī liels fons. Viennozīmīgi, ka matricas ietekmes noteikšanai ir jābūt neatņemamai sastāvdaļai LC-MS metodes izveidē un validācijā. Matricas efekti ir ļoti mainīgi, tie ir grūti prognozējami un kontrolējami, turklāt tie ir specifiski katram analītam. Matricas ietekmi var mazināt, palielinot trokšņa/signāla attiecību, ko panāk izmantojot izvēlēta jona (SIR) vai multireakciju (MRM) monitoringu vai uzlabojot hromatogrāfisko atdalīšanu. Ir pierādīts, ka elektrosmidzināšanas jonizācijā ir lielāka matricas ietekme nekā ķīmiskā jonizācija atmosfēras spiedienā [140].

1.9. Augu ekstraktu kvalitātes kontrole un standartizācija

Augu ekstraktu saturošu preparātu nekaitīgums un efektivitāte, tāpat kā kvalitātes kontrole, ir kļuvuši par nozīmīgiem tematiem gan veselības speciālistiem, gan patērētājiem [141,142]. Augiem, kuru ķīmiskais sastāvs ir absolūtu neskaidrs, vienīgā kontrole ir ekstraktu ieguvei atlasīts augu materiāls, ar relatīvi līdzīgām pazīmēm un nemainīgs ieguves process, citādi pat ekstraktu krāsa un smarža var būt mainīga, nemaz nerunājot par to ķīmisko kvalitātes kontroli. Augu izcelsmes produktu/preparātu standartizācija ir krietni sarežģītāka par sintētisko, jo augu ekstrakti satur virkni sarežģītas ķīmiskās struktūras savienojumu turklāt to ķīmiskā kompozīcija nav konstanta katrā izdalīšanas reizē [143]. Lielu daļu gadījumos to bioloģiskā aktivitāte nav atkarīga tikai no dominējošajiem savienojumiem, bet gan sinerģiskā efekta, ko dod visi ekstrakta ķīmiskās sastāvdaļas. Ir pierādīts, ka pat daudzi bioloģiski inertī savienojumi ietekmē aktīvo sastāvdaļu farmakinetiku un stabilitāti [144]. Lai nodrošinātu terapeitisko efektivitāti un preparātu/ekstrakta nekaitīgumu, kā arī tā atzīšanu internacionālos tirgos, augu ekstraktu vai tā produktu kvalitātes kontrolei ir jābūt specifiskai, izmantojot starptautiski atzītus standartus, īpaši kvantitatīvajās analīzēs, bet arī kvalitatīvajās jābūt raksturotam specifiskumam, jānosaka pesticīdu, smago metālu, antimikrobiālām vielām maksimālā satura robežas [17]. PVO uzsver kvalitatīvo un kvantitatīvo metožu nozīmi paraugu raksturošanā, bioloģisko marķieru vai ķīmisko marķieru un “pirkstu nospiedumu” profila noteikšanā [145]. Ja ir zināms aktīvais komponents, visloģiskāk ir šo daudzumu kvantitatīvi noteikt. Ja ir zināmas aktīvās sastāvdaļas, kas veicina terapeitisko efektivitāti, botāniskajiem preparātiem jābūt standartizētiem attiecībā pret šiem savienojumiem; ja

aktīvās sastāvdaļas vēl nav zināmas, analītiskiem nolūkiem izvēlas marķiervielu [146].

Fitoķīmiskais novērtējums augu maisījumu standartizācijai ietver:

1. Dažādu ķīmisko grupu klātbūtnes skrīnings
2. Ķīmisku specifisku grupu kvantitatīva noteikšana
(piemēram, kopējie alkaloidi, kopējie fenoli, kopējās triterpēnskābes, kopējie tanīni).
"pirkstu nospiedumu" profilu veidošana
3. Vairāki marķieru savienojumiem raksturojumi, iegūti ar dažādām metodēm
4. Nozīmīgu, bioloģiski aktīvo ķīmisko vielu kvantitatīvā noteikšanu [147].

Shematisks augu izcelmes produktu standartizācijas un kvalitātes novērtēšanas attēlojums dots 1.19. attēlā.



1.19. att. Shematisks augu izcelmes produktu standartizācijas un kvalitātes novērtēšanas attēlojums [147]

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

Bioraīnēšanas galvenais uzdevums ir ražošana bez atlikumiem, prasības 100% izejvielu izmantošanai. Tāpēc, izmantojot visas tehnoloģiskās iespējas produktu iegūšanai no augu biomasas, galvenais uzdevums ir noteikt piemaisījumu sastāvu attiecībā pret mērķsavienojumiem vai mērķproduktiem, biomasas un iegūto frakciju kopējā ķīmiskā sastāva kvalitatīvās un kvantitatīvās īpašības, vienlaikus orientējoties uz specifisku savienojumu izdalīšanu. Promocijas darba pamatā ir analītiskās pieejas izveide, kas ir jāsaprot kā analītisko metožu kopuma izmantošanu, nosakot pēc iespējas vispusīgāk biomasas ķīmisko sastāvu, analizējot to pa sastāvdaļām, pēc tam veicot eksperimentāli pamatotu piemērotāko metožu atlasīšanu, pamatojot to ar mērķproduktu izvēli un tālāku izmantošanas jomu. Pašlaik ķīmiskā sastāva noteikšanas tūlītējs risinājums, ieskaitot ražošanas kontroli, kļūst iespējams, pateicoties analītiskās ķīmijas, jo īpaši hromatogrāfijas pētījumu metožu izstrādei, kas ļauj iegūt ļoti precīzu analizējamā paraugā pat nanodaudzumos esošo molekulu raksturojumu. Darbā izmantotās analītiskās analīzes metodes ietver kopējo polifenolu savienojumu un to specifisku ķīmisko grupu (diarilheptanoīdu un lignīna oligomēru) noteikšanu ar spektrofotometriskajām metodēm un individuālu savienojumu identifikāciju un kvantitatīvo raksturošanu ar atšķirīgām hromatogrāfiskām sistēmām un metodēm (kvantitatīvām un puskvantitatīvām). Ņemot vērā, ka analizējamie objekti ir sarežģīti vielu maisījumi, kuri satur vairākus simtus dažādus savienojumus, eksperimentāli pamatota analītiskās pieejas izveide bija primāri nepieciešama.

2.1. Pētāmie objekti

Promocijas darbā kā izpētes objekti izmantoti no dažādas augu biomasas ar polāriem un vidēji polāriem šķīdinātājiem iegūti polifenolu savienojumus saturoši maisījumi. Kā izejvielas šo maisījumu ieguvei izvēlētas lignocelulozes biomasas pārstrādes atlikumi – kviešu salmi, baltalkšņa un melnalkšņa mizas. Šīs lignocelulozes biomasas vieno nepieciešamība paaugstināt to izmantošanas potenciālu kā vērtīgu, bioloģiski aktīvu savienojumu avotam. 2.1. tabulā parādīts pētāmo objektu apraksts, iekļaujot biomasas izcelsmi, sagatavošanu un ieguves procesus. Zināms, ka ūdens saturs

biomasā no 6 līdz 14% netraucē ķīmiskām analīzēm [148]. Analizēto biomasu mitrums bija līdz 10% un tas iekļaujas minētajā intervālā.

2.1. tabula

Pētāmo objektu apraksts

Paraugu apzīmējumi	Biomasa	Ieguves apraksts
BA miza EtOAc	Baltalkšņa (<i>Alnus incana</i>) mizas (< 2 mm) ievāktas no 30-40 gadus veciem kokiem, Ogres novadā, Mazozolu pagastā.	ASE, 90°C, 3x5 min, ekstrakts iegūts pēc ekstrakcijas ar heksānu. Liofilizēts.
MA miza EtOAc	Melnalkšņa (<i>Alnus glutinosa</i>) mizas (< 2 mm) ievāktas no 60 - 70 gadus veciem kokiem, Ogres novadā, Mazozolu pagastā.	ASE, 90°C, 3x5 min, ekstrakts iegūts pēc ekstrakcijas ar heksānu. Liofilizēts.
WS	Kviešu salmi sasmalcināti līdz 0,2 mm, salmi iegūti no Latvijas laukiem.	ASE, 90°C, 3x5 min, ekstrakts iegūts pēc ekstrakcijas ar heksānu.
WUSP	Kviešu salmu pulveris (<0,2 mm) iegūts no Environmental System firmas (Vācija)	Fracijas iegūtas izmantojot hidrodinamisko kavitāciju un/vai apstādi ultraskaņā dažādos režīmos ar NaOH ūdens šķīdumu.
Melnalkšņa koksnes sārma lignīns	Ar sārma izdalīts laboratorijas lignīns	Iegūts saskaņā ar TAPPI standartu T280 pm-9.

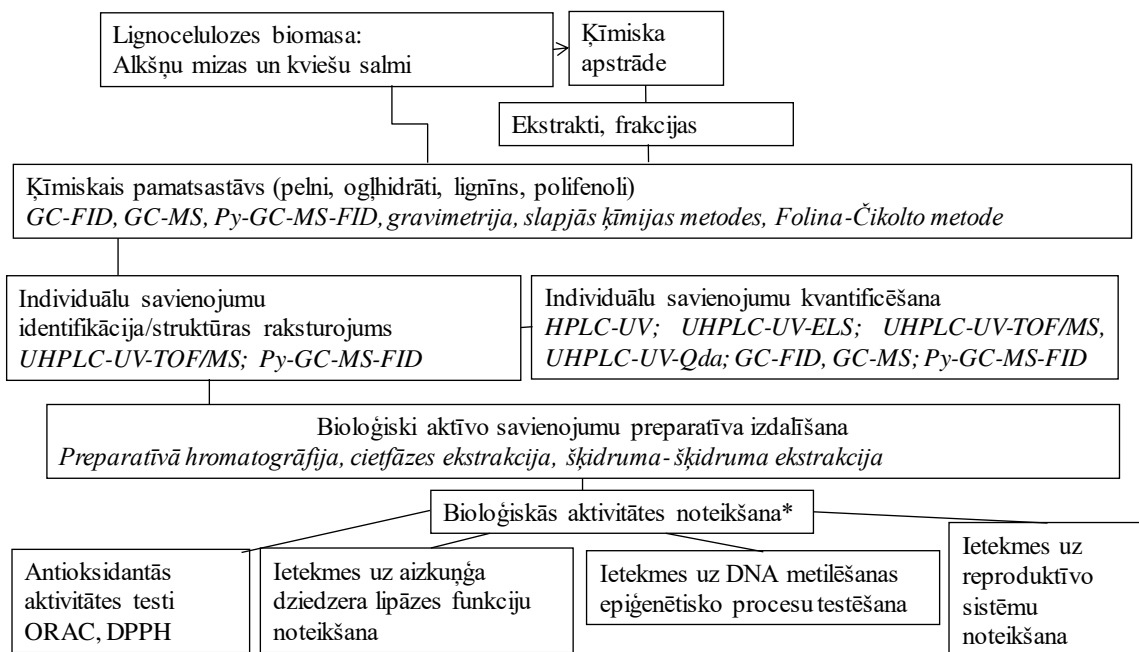
Promocijas darbā analizēto kviešu salmu paraugu ieguves režīmi parādīti 2.2. tabulā.

2.2.tabula

Kviešu salmu paraugu ieguves apraksts un iegūto frakciju apzīmējumi

Paraugu apzīmējums	Apraksts
Kviešu salmi (WUSP un WS)	Neapstrādāts kviešu salmu pulveris (<0,2 mm)
HC	Hidrodinamiskā kavitācija, cietvielas: šķidrums attiecība = 1:50, 50°C, 30 min, NaOH _{ūd.} pievienots 10% no sausas kviešu salmu masas
US 1	US (25 kHz), cietvielas: šķidrums attiecība = 1:20, 26°C, 30 min, H ₂ O
US 2	US (25+80 kHz), cietvielas: šķidrums attiecība = 1:20, 34 °C, 60 min, H ₂ O
US 3	US (25 kHz), cietvielas: šķidrums attiecība = 1:20, 25°C, 30 min, NaOH _{ūd.} Pievienots 10% no sausas kviešu salmu masas
US 4	US (25+80 kHz), cietvielas: šķidrums attiecība = 1:20, 32°C, 60 min, NaOH _{ūd.} pievienots 10% no sausas kviešu salmu masas
US 5	US (25+80+25 kHz), cietvielas: šķidrums attiecība = 1:20, 29°C, 90 min, NaOH _{ūd.} pievienots 10% no sausas kviešu salmu masas
US 6	US (25+80+25+80 kHz), cietvielas: šķidrums attiecība = 1:20, 35°C, 120 min, NaOH _{ūd.} pievienots 10% no sausas kviešu salmu masas

Promocijas darbā veikto eksperimentālo pētījumu strukturālo shēmu skatīt 2.1. attēlā.



2.1.att. Promocijas darbā veikto eksperimentālo pētījumu shēma

2.2. Aparatūra

- Analītiskie svāri - KERN ALJ 220 - 4, ($m_{\max} = 220 \pm 0,0001$ g);
- 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 μ m);
- Paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas iekārta ASE 350 Dionex coop. ($p_{\max} = 110 \pm 1$ atm, $t_{\max} = 200 \pm 2$ °C);
- Šķidrums hromatogrāfs masspektrometrs (UPLC/Synapt Q-TOF MS, Waters,) ar elektronizmidzināšanas (ESI) jonizācijas avotu;
- Liofilizācijas aparāts Heto PowerDry PL3000 ($t_{\min} = -54$ °C, $p_{\min} =$ līdz 1 mbar);
- Žāvēšanas skapis FN 400 (± 1 °C);
- Sterilas vienreizlietojamās šļirces ar adatu Medilink (2 mL)
- Neilona membrānas filtri Kinesis (25 mm; 0,2 μ m)

- Rotācijas ietvaicētājs Heidolph Instruments (1000 - 0 mbar, $\pm 1^\circ\text{C}$);
- Ultra skaņas vanna Cole Parmer 8891, (100 W, 42 KHz $\pm 6\%$);
- UV/VIS spektrometrs PerkinElmer Lambda 25 ($\pm 0,0001\text{A}$);
- Preparatīvais hromatogrāfs Biotage ($\pm 1\text{CV}$);
- Augstefektīvais šķidrums hromatogrāfs Agilent 1100 ar diodes matricas un fluorescences detektoriem ($\pm 0,0001\text{ Rel.v.}$) ar kolonnu Zorbax Eclipse XDB-C18, (5 μm , 4,6 x 150 mm);
- Filtrs Agilent 100 EXO301-1(poru izmērs 0,45 μm , diametrs 47mm);
- Ultra augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfijas sistēma Acquity Waters, ar UV/VIS un gaismas izkliedes detektoru (ELS) ar UHPLC kolonnu Waters Acquity BEH C18 (2,1x50mm, 1,7 μm);
- Paraugu pudelītes hromatogrāfijai ar skrūvējamu vāciņu Agilent Technologies (2 mL);
- Masspektrometrs Waters Acquity kvadrupols (masas ass precizitāte 0,2 Da).

2.3. Reaģenti

- Heksāns (C_6H_{14}) Sigma Aldrich 99,9 % ;
- Etilacetāts ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) Sigma Aldrich 99,5 % ;
- Etilspirts ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) Sigma Aldrich 99,9 % ;
- Metilspirts Sigma Aldrich 99,5 % , ;
- Ledus etiķskābe Sigma Aldrich 99,5 % , ;
- Metilspirts (HPLC gradient grade) 99,9 % , ;
- Acetonitrils, LC-MS LiChrosolv (EMD MILLIPORE);
- Dejonizēts ūdens, Ultrapure (Type 1);
- Skudrskābe, Sigma Aldrich $\geq 99,0\%$ (LC-MS grade);
- Folina – Čikolto reaģents *Sigma Aldrich*, CAS No:26-45-36/37/39;
- Oregonīns, $\geq 95\%$ (LC/MS-ELSD) *Sigma Aldrich*;
- Tricīns, $\geq 95\%$ (HPLC) *Biosynth Carboynth*;
- Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksiskābe) $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4 > 98\%$ (HPLC); *Fluka*, CAS: 53188-07-1;
- Nātrija hidroksīds, *Sigma Aldrich*, $\geq 98,0\%$;
- Leicīna enkafalīna standarts MS masas korekcijai (Waters, cat. No. 186006013).

2.4. Kopējo polifenolu savienojumu saturs noteikšana ekstraktos

Kopējo fenola savienojumu noteikšanas pamatā bija kalorimetrijas metode, kurā veikta Folina-Čikolto reaģenta ķīmiska reducēšana. Metodika ietvēra Folina-Čikolto reaģenta pievienošanu un atstāšanu tumšā vietā divu stundu garumā. Fenola savienojumi reducēja Folina-Čikolto reaģentu saturošos metālu oksīdus, kas absorbē gaismu pie 765 nm. Iegūtajā spektrā gaismas absorbcija bija tieši proporcionāla fenolu savienojumu koncentrācijai. Katrai fenolu savienojumu noteikšanas reizei tika izstrādāta sava kalibrēšanas taisne, kuru ieguva uz vienas ass atliekot fenolu standarta koncentrāciju (darbā izmantota galusskābe), bet uz otras ass attiecīgo absorbcijas intensitāti. Kopējā fenolu savienojumu koncentrācija paraugā aprēķināta galluskābes ekvivalentos (GSE). Galusskābe izmantota kā references savienojums, jo tā ir augstas tīrības, komerciāli pieejama, lēta un bieži nelielos daudzumos atrodama augu izejvielās. Turklāt galusskābe ir ķīmiski stabila, ir pierādīts, ka tās standartsķīdums divi nedēļu laikā zaudē tikai apmēram 5% kapacitātes.

Nosvēra 20 mg ekstrakta un to izšķīdināja 250 mL etanola. 120 mg galluskābes izšķīdināja 1 L ūdens un no tās pagatavoja standartšķīdumus 0,0075; 0,015; 0,030; 0,060; 0,090 mg mL⁻¹. 1 mL galluskābes standartšķīduma un 1 mL ekstrakta pievienoja 5 ml 10 % Folina-Čikolto šķīduma un 4 mL 7,5 % nātrija karbonāta šķīduma. Salīdzināšanas šķīduma pagatavošanai galluskābes vietā ņēma dejonizētu ūdeni. Absorbciju mērīja pēc 30 min pie $\lambda=765$ nm.

Aprēķins:

$$C = a \cdot \gamma \cdot \frac{V}{m} \quad (2.1)$$

Kur: C- kopējais fenola savienojumu saturs ekstraktos, GSE g g_{ekstrakta}⁻¹, a – ekstrakta atšķaidījums, reizes, γ – kopējā fenola savienojumu masas koncentrācija pēc kalibrēšanas grafika, mg mL⁻¹, V- etanola tilpums, mL, m- ekstrakta masa, g.

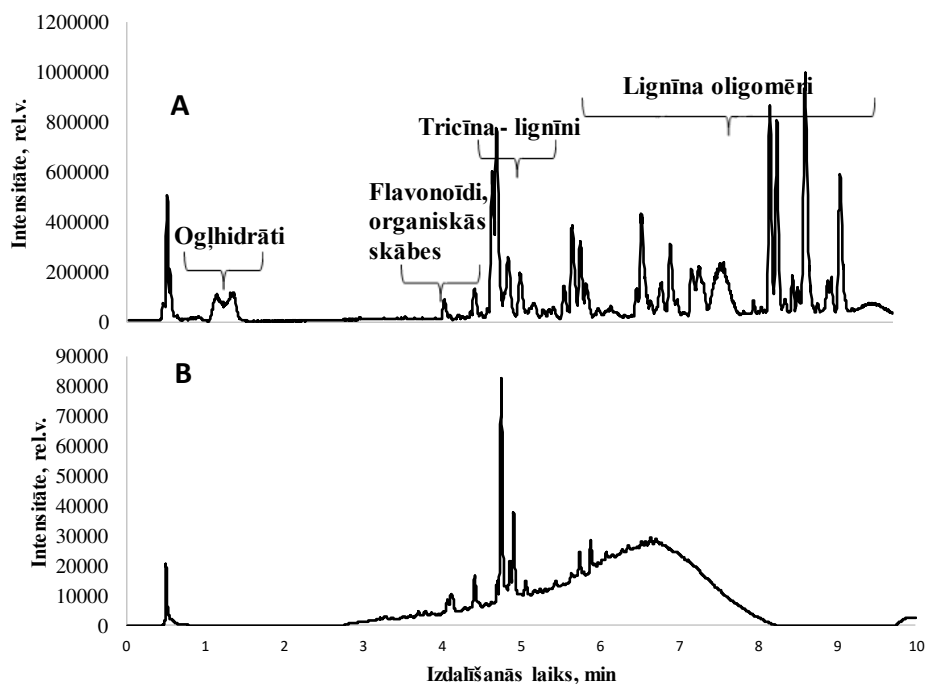
Katrai analīzei veica 3 paralēlus mērījumus, paraugiem izmantotās metodes nozīmīgākie parametri doti 2.3. tabulā.

Galusskābes kalibrēšanas taisnes vienādojumu statistiskie dati

Biomasa paraugu ekstrakti	Regresijas analīze	
	Regresijas vienādojums	Regresijas koeficients (R^2)
Baltalkšņa mizas	Y=9,0961+0,082x	0,995
Melnalkšņa mizas		
Kviešu salmi un tā frakcijas	Y=10,36x+0,0041	0,993
Lignīna oligomēri		

2.5.Kviešu salmu frakciju šķidrums hromatogrāfijas-masas spektrometrijas analīze

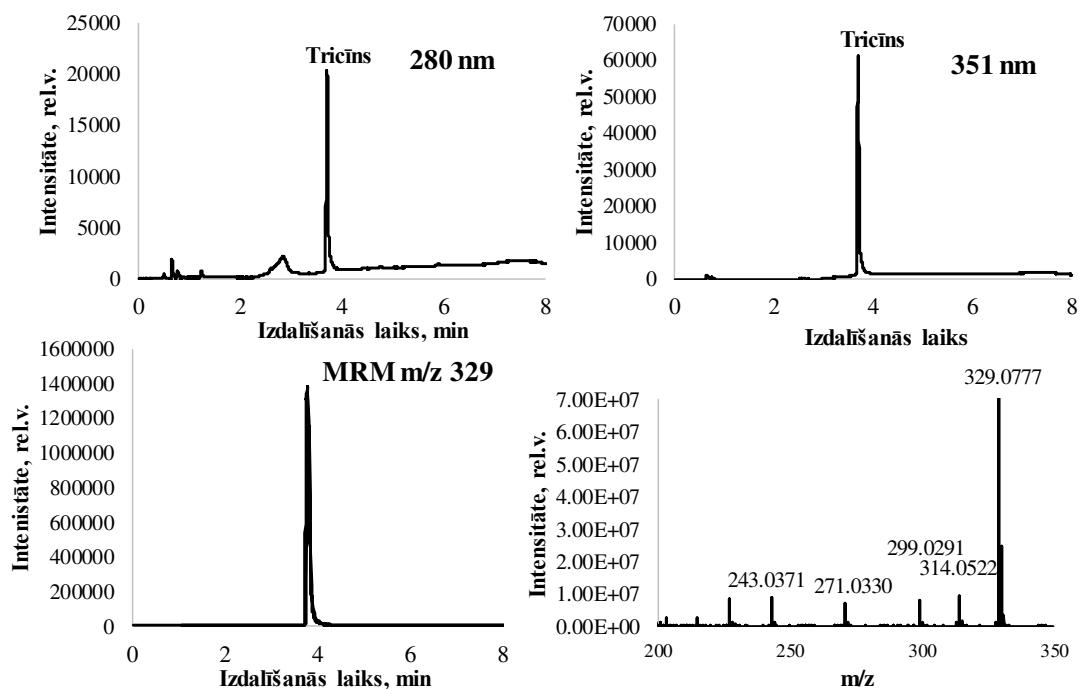
Analīze bija orientēta uz lignīna oligomēru, flavonoīdu, flavonoīdu-lignīnu kompleksu analīzi. Liofilizētas lignīnu saturošas frakcijas izšķīdināja 50 % acetonitrila ūdens šķīdumā (3 mg mL⁻¹). Pēc tam filtrēja (neilona filtrs, poru izmērs 0,45 μm) un izmantoja tālākām hromatogrāfijas analīzēm ar LC-UV- TOF/MS sistēmu. Atdalīšanu veica ar UHPLC kolonnu (2,1 mm x 50 mm , 1,7 μm, BEH C18), plūsmas ātrumu 0,35 ml min⁻¹. Eluenti bija 0,1% skudrskābe ūdenī (A) un acetonitrils (B). Izmantoja gradienta šķīdinātāju sistēma: 0–7 minūtes, 5-95 % (B); 7-8 minūtes, 95 %-95 % (B); 8-9 minūtes, 95 %-5 % (B), injekcijas tilpums bija 3μL. Q-TOF MS darbības parametri bija: kapilārais spriegums, 2,2 kV (-); konusa spriegums, 40 V; konusa gāzes plūsma, 100 L h⁻¹; kolīzijas enerģija, 6 eV; avota temperatūra, 120 °C; desolvatācijas temperatūra, 450 °C; kolīzijas gāze - argons; desolvatācijas gāze - slāpekļis; plūsmas ātrums, 800 L h⁻¹; datu iegūšanas diapazons: m/z 50–1200 Da; jonizācijas režīms, negatīvs. Iegūto hromatogrammu piemērs parādīts 2.2.attēlā, savienojumu grupu relatīva klasifikācija veikta pēc savienojumiem raksturīgākās masspektrometriskās fragmentācijas un UV absorbciju maksimumiem.



2.2.att. Kviešu salmu US1 parauga kopējais masspektrs (A) un hromatogramma 280 nm (B)

2.6. Tricīna un tricīna - lignīnu kvalitatīvā un kvantitatīvā analīze kviešu salmu paraugos

Pagatavoja tricīna standartšķīdumu izšķīdinot 6,1 mg tricīna 10 ml 50 % acetoniitrila ūdens šķīdumā. Pagatavoja dažādas koncentrācijas tricīna standartšķīdumus: 48; 35; 24; 12; 6; 3 mg·L⁻¹. Tricīnu kvantificēja MRM režīmā (m/z 329, 314, 299), vienlaicīgi monitorējot pie 280 nm (polifenolu savienojumiem raksturīga absorbcija) un 351 nm (tricīna absorbcijas maksimums). Iegūtās tricīna hromatogrammas un masspektri parādīti 2.3. attēlā.



2.3. att. Tricina masspektri un hromatogrammas pie dažādiem viļņa garumiem

2.7. Kviešu salmu analītiskā pirolīze

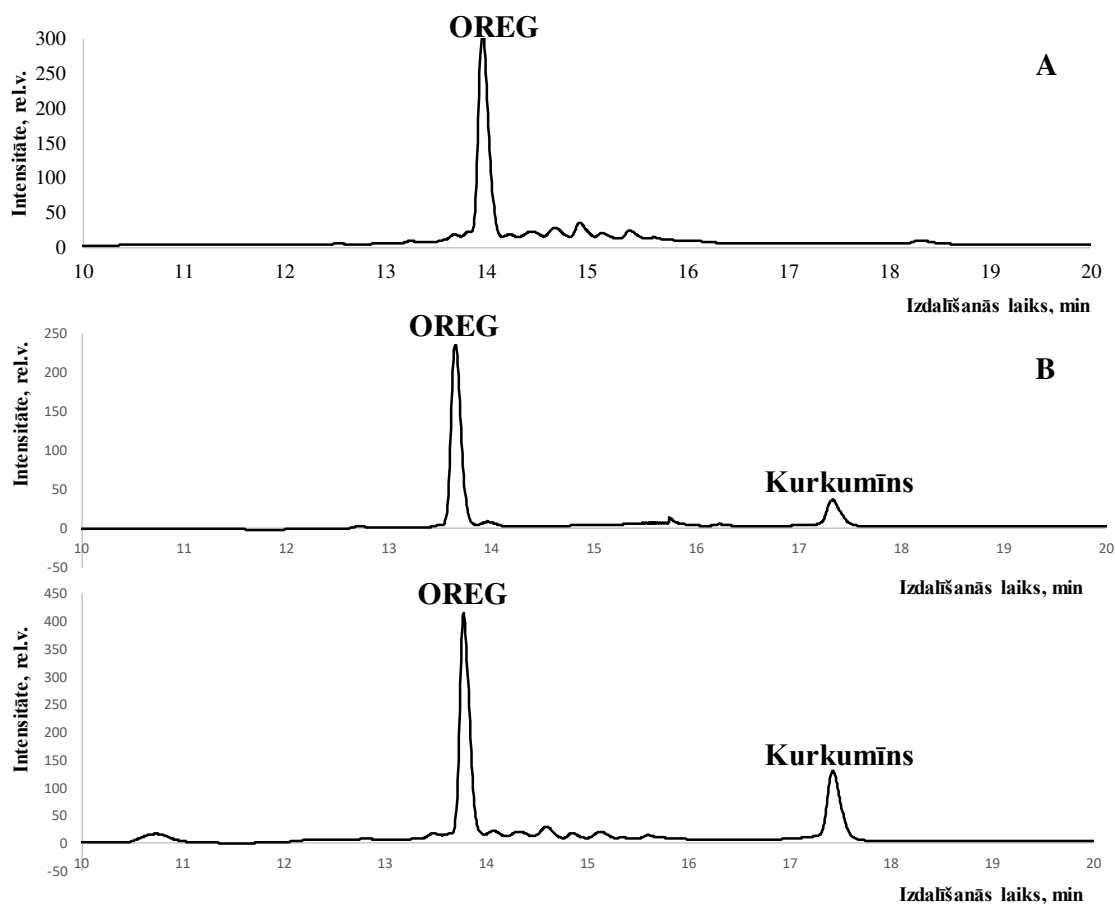
Uz analītiskiem svāriem nosvēra ~ 2,0 mg iepriekš izžāvēta parauga un to pārnesa tērauda tīģelī un ievietoja pirolīzes sistēmas automātiskajā paraugu ievadišanas ierīcē. Pēc pirolīzes, caur gāzes hromatogrāfa injektoru, gāzveida sadalīšanās produkti nonāca kapilāra tipa kolonnā. Iekārta ir modificēta 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. Injektora temperatūra bija $250,0 \pm 0,5$ °C, avota $250,0 \pm 0,5$ °C. Sildīšanas programma bija: 1 minūte izotermiska sildīšana $60,0$ °C $\pm 0,5$ °C temperatūrā, pēc tam - dinamiska sildīšana ar ātrumu $6,0$ °C $\pm 0,5$ °C min⁻¹ līdz $270,0$ °C $\pm 0,5$ °C, kuru uzturēja 10 minūtes. Masas spektru uzņemšanai izmantoja elektrona trieciena 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.

2.8. Augstefektīvā šķidrums hromatogrāfija ar UV detektoru alkšņu mizas ekstraktiem

Kompozīcijas un individuālu savienojuma saturu noteikšanai izmantoja Agilent 1100 series hromatogrāfu ar UV diodes matricas detektoru. Oregonīna noteikšanai uzņēma kalibrēšanas grafiku izmantojot ārējo standartu metodi. Pagatavoja standartšķīdumu 2,5 mg oregonīna izšķīdinot 25 mL 40 % metanolā. Ieguva šķīdumu ar standarta koncentrācija 100 mg L⁻¹. No tā atšķaidot pagatavoja pārējos standartšķīdumus ar koncentrācijām 80 mg L⁻¹, 60 mg L⁻¹, 40 mg/L un 20 mg L⁻¹. Eluenti bija 0,1% skudrskābe ūdenī (A) un metanols (B). Tika izmantota izokrātiska programma oregonīna kalibrēšanai ar tālāku gradienta šķīdinātāju sistēmu pārējo savienojumu atdalīšanai: 0–20 minūtes, 75–75 % (B); 21–25 minūtes, 75 % –100 % (B); 26–28 minūtes, 100 % –100 % (B), injekcijas tilpums bija 20 µL. Katram šķīdumam uzņēma 3 paralēlos paraugus.

Oregonīna un kopējo diarilheptanoīda satura noteikšanai izmantoja iekšējā standarta metode un iepriekš minēto aprīkojumu, kā standartu izmantojot kurkumīnu. Atdalīšana tika veikta ar Zorbax Eclipse XDB-C18 HPLC kolonnu (4,6 mm x 250 mm id, 5,0 µm, (Agilent), plūsmas ātrumu 1,0 mL min⁻¹, temperatūra 40 °C. Eluenti bija 0,1% skudrskābe ūdenī (A) un metanols (B). Izmantoja gradienta šķīdinātāju sistēmu: 0–5,0 minūtes, 10 % (B); 5,0–10 minūtes, 10 % –35 % (B); 10–12 minūtes, 35 % - 40 % (B), 12–15 min, 40 % - 70 % (B), 15–26 min, 70 % - 100 % (B), 26–27 min, 100 % - 100 % (B), 27 –28 minūtes, 100 % –10 % (B), 28–30 minūtes, 10 % (B) un injekcijas tilpums bija 20 µL. Detektēšana pie 280 nm un 425 nm. Kalibrēšanas standartšķīdumus pagatavoja, izmantojot oregonīnu, koncentrācijās 260, 350, 700, 140, 2800 µg mL⁻¹. Visiem analizētajiem paraugiem tika pievienots kurkumīns (C- 0,5 mg mL⁻¹). Kurkumīnam ir ievērojami augstāka absorbcija pie 425 nm, salīdzinot ar 280 nm, tāpēc tas tika novērots abos viļņu garumos.

Iegūtās hromatogrammas melnalkšņa mizas ekstraktam (A), melnalkšņa mizas ekstraktam kopā ar kurkumīnu (C) un oregonīna standartšķīdumam ar pievienotu kurkumīnu (B) dotas 2.4. attēlā.

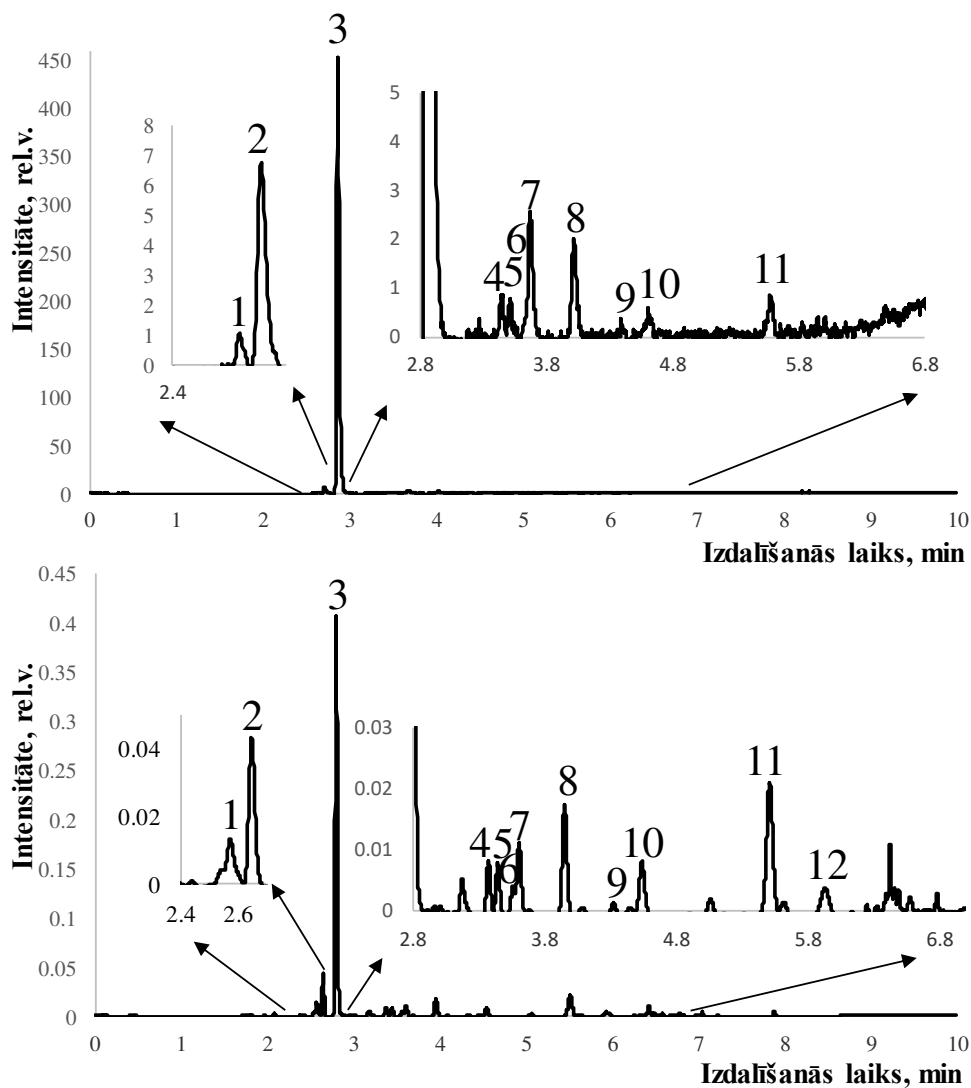


2.4. att. Melnalkšņa mizas ekstrakta (A) oregonīna ar kurkumīnu (B) un melnalkšņa mizas ekstrakta ar kurkumīnu HPLC hromatogrammas, 280 nm

2.9. Alkšņu mizas ekstraktu ultra efektīvās augstspiediena šķidrums hromatogrāfijas analīze ar UV un gaismas izkliedes detektoru

Alkšņu mizas ekstraktus analizēja, izmantojot Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm , 2,1 x 50mm, Waters) kolonnu. Eluents A: skudrskābe ūdenī (0,1%, v/v), eluents B: acetonitrils. Ekstraktu pētījumiem, izmantoja dažādus gradientus un plūsmas ātrumus, kā optimālākā tika noteikta plūsma 0,350 mL min⁻¹, kolonnas temperatūra 30 °C, injekcijas tilpums 2 μL , dažādu komponentu identifikācijai, izmantotas divas dažādas ekstraktu koncentrācijas 2,5 mg mL⁻¹ un 0,1 mg mL⁻¹, izšķīdināti 50 % (v/v) acetonitrila ūdens maisījumā. Acquity UPLC BEH C18 kolonnas gradients: 0 -7,0 min 95:5 → 5:95 (A:B), 7,0-10,0 min 5:95 → 95:5 (A:B). Kvantificēšana veica ar ELS detektoru un pie 280 nm, uzņēma arī kopējos UV spektrus 200 – 600 nm apgabalā. ELS detektora parametri bija:

pastiprinājuma koeficients 100, slāpekļa spiediens 30 psi (2,0 atm), iztvaicēšanas temperatūra 40 °C, izsmidzināšana dzesēšanas režīmā. Iegūtās baltalkšņa mizas ELS hromatogrammas un UV hromatogramma pie 280 nm parādītas 2.5. attēlā.

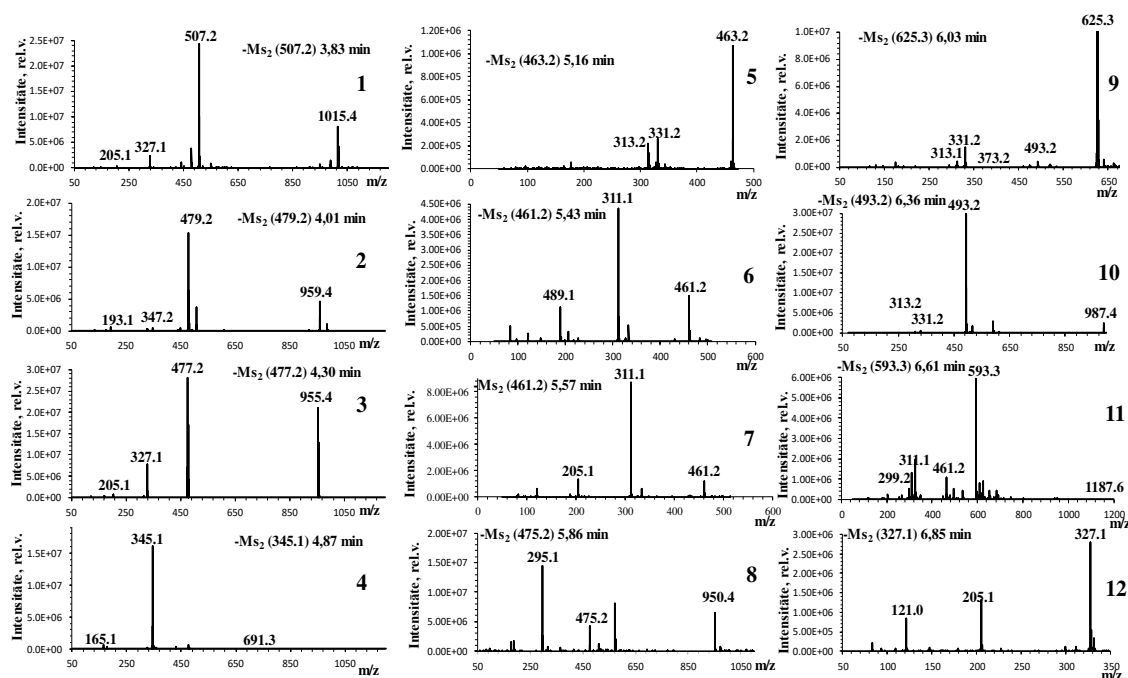


2.5. att. Baltalkšņa mizas ekstrakta ELS (A) un pie 280 nm (B) uzņemtās UHPLC hromatogrammas

2.10. Alkšņu mizas UHPLC-ESI-TOF/MS kvalitatīvā analīze

Hromatogrāfiskai sadalīšanai izmantoja iepriekš aprakstītā Acquity UHPLC BEH C18 kolonnu, tādos pašos apstākļos (skat. nodaļu Alkšņu mizas ekstraktu UHPLC analīze). Masspektrometrijas apstākļi: jonizācijas režīms: negatīvs vai pozitīvs, temperatūra: 650 °C,

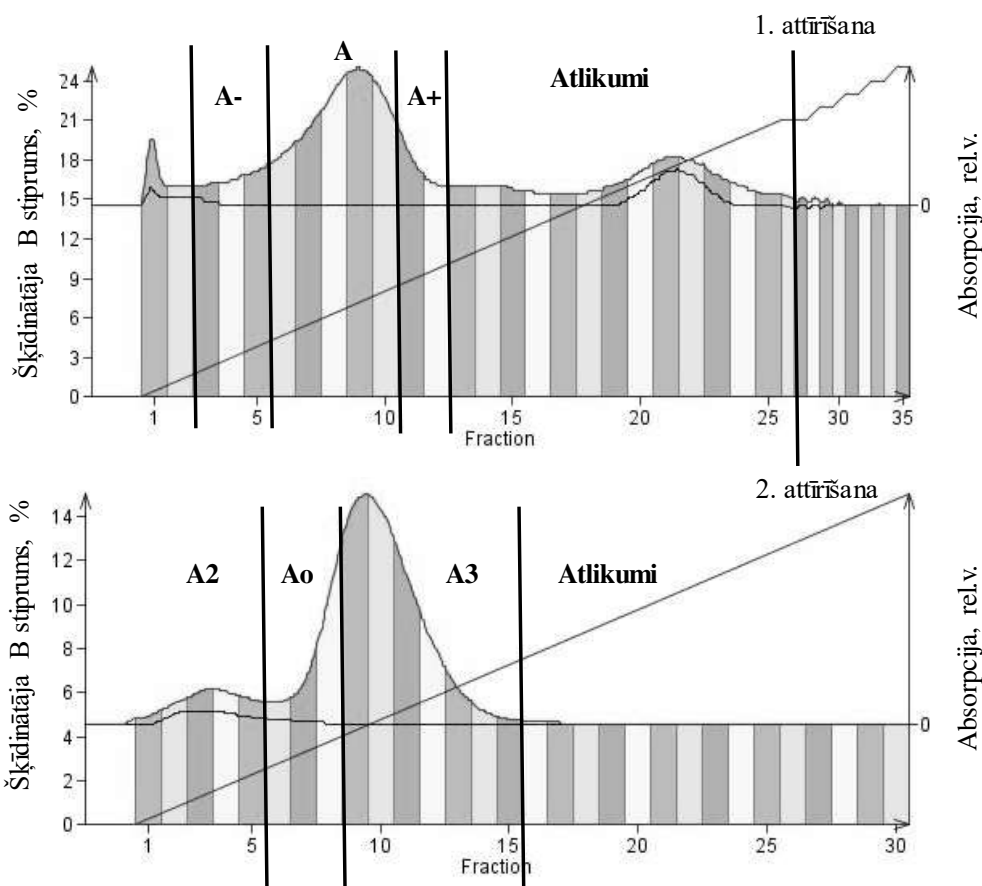
izsmidzinātāja gāzes spiediens: 65 psi (N₂), gāzes plūsma: 9 L min⁻¹ (N₂), konusa spriegums: 40 V, kapilāra spriegums: 2,2 kV, skenēšanas diapazons: m/z 50–2000 daltoni ar skenēšanas ātrumu 0,1 scan s⁻¹, kolīzijas enerģija tika mainīta robežās 8-45 eV, atkarībā no molekulu struktūras. Identificēto diarilheptanoīdu (skatīt 3.7. tabulu) masspektri doti 2.6. attēlā.



2.6. att. Baltalkšņa mizās identificēto diarilheptanoīdu hromatogrāfisko smaiļu (1-12, skat. 3.7. tabulu) negatīvās jonizācijas masspektri

2.11. Preparatīvā hromatogrāfija alkšņa mizas etilacetāta ekstraktam

Pagatavoja 2-2,5 % etilacetāta ekstrakta šķīdumu, kā šķīdinātāju izmantoja 40 % etanola šķīdumu. Pagatavotajam alkšņa mizas etilacetāta ekstrakta šķīdumam veica preparatīvo hromatogrāfiju, izmantojot gradientu 0-25 % B. Absorbciiju mērīja pie 280 un 315 nm. Kā eluentu A preparatīvajai hromatogrāfijai izmantoja 20 % EtOH + 1 % CH₃COOH šķīdumu, eluents B bija 96 % EtOH. Izmantojot preparatīvo hromatogrāfiju etilacetāta ekstraktu sadalīja frakcijās. 2.7. attēlā dotas melnalkšņa etilacetāta ekstrakta preparatīvās hromatogrāfijas hromatogrammas ar sadalījumu frakcijās.



2.7.att. Melnalkšņa mizas etilacetāta ekstrakta preparatīvās hromatogrammas un sadalījums frakcijās

2.12. Oregonīna kvantitatīva noteikšana ar ultraefektīvo augstspiediena šķīduma hromatogrāfu alkšņu mizas ekstraktos

Oregonīna saturu noteica alkšņu mizas visos hidrofilajos ekstraktos. Kalibrēšanas grafika iegūšanai kā standartvielu izmantoja oregonīnu, ko iepriekš (2.11. nodaļa) izdalīja no melnalkšņa mizas, oregonīna pierādīšana un ķīmiskais raksturojums aprakstīts promocijas darba autores bakalaura darbā [75]. Kalibrēšanas grafika uzņemšanai izmantoja UHPLC-PDA-QDA un UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS aprīkojumu. Nosvēra ~ 2,5 mg oregonīnu un izšķīdināja 25 mL 50 % acetonitrila ūdens maisījumā. Pagatavoja dažādas koncentrācijas oregonīna standartšķīdumus no 0,2 mg mL⁻¹ līdz 0,02 mg mL⁻¹. Standartšķīdumiem ņēma 3 paralēlos paraugus un analizēja ar UHPLC un MS sistēmu, injekcijas tilpums visās analīzēs bija 2 μL, kolonnas temperatūra 30 °C. Analīzes veica gradienta režīma apstākļos, kuri parādīti 2.4. tabulā.

2.4. tabula

Oregonīna kvantitatīvās noteikšanas apstākļi ar UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS un UHPLC-PDA-QDA

Laiks, min	Plūsmas ātrums, mL min ⁻¹	Eluents A, %	Eluents B, %
UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS			
0	0,350	95	5
7,0	0,350	5	95
UHPLC-PDA-QDA			
0	0,250	90	10
5	0,250	65	35

Oregonīna noteikšana ar UV/VIS detektoru veikta pie 280 nm, bet masspektrometriskā kvantificēšana pie [M-H]⁺ m/z 477 ar kvadarapola (QDA) veida masspektrometru SIR un MRM režīmos.

MRM apstākļi: 0-7 min, negatīvā jonizācija, skenēšanas laiks 0,1 s, kapilārais spriegums 2,2 kV, konusa spriegums 40 V, jonu avota temperatūra 100 °C, desolvatācijas temperatūra 250 °C, desolvatācijas gāzes plūsma 650 L h⁻¹. SIR apstākļi: 15 V, m/z 477, kapilārais spriegums 0,8 kV, kalibrēšanas grafiks dati parādīti 2.5. tabulā.

2.5. tabula

Oregonīna kalibrēšanas grafika dati

Biomases paraugi	Regresijas analīze	
	Regresijas vienādojums	Regresijas koeficients (R ²)
PDA detektors, 280nm	Y=5000000x+11762	0,996
MRM, m/z 477→327	Y=874703x+32042	0,988
SIR, m/z 477	Y=7000000x+196035	0,985

Oregonīna satura noteikšanai alkšņa paraugos: ~ 2,5 mg ekstrakta izšķīdināja 25 mL 50 % acetonitrila ūdens šķīdumā un nofiltrēja. Pagatavotajiem alkšņa mizas ekstraktiem veica analīzi tādos pašos apstākļos kā tika uzņemts oregonīna kalibrēšanas grafiks. Alkšņa ekstraktu vidējie joslu laukumi un oregonīna saturs parādīts 2.6. tabulā.

Alkšņu ekstraktu joslu laukumi un oregonīna saturs

Ekstrakts	Vidējais joslas augstums, Rel.v.			Oregonīna saturs ekstraktos, %		
	MRM	280nm	SIR	MRM	280nm	SIR
Etilacetāta ekstrakts						
BA	74665	7466502	531389	46	43	46
MA	83267	83267	625923	60	64	63
Etilspirta ūdens ekstrakts						
BA	68716	1909	381112	21	20	18
MA	77815	2325	455773	29	31	30

2.13. Tricīna – lignīnu attīrīšana no kviešu salmu ekstraktiem

Izzāvētus kviešu salmus (mitrums- 3,3 %) vispirms attīrīja no lipofīlajām vielām tos ekstrahējot paātrinātā šķīdinātāja ekstraktorā (ASE) ar heksānu (četri cikli) 90 °C temperatūrā. Tad kviešu salmus ekstrahēja ASE ar 80 % metanolu (četri cikli) 90 °C temperatūrā. Pēc tam metanolu atdestilēja vakuumā, lai sakoncentrētu ekstraktu. Ūdens ekstraktu sadalīja, trīs reizes ekstrahējot to ar šķīdumu - šķīduma ekstrakciju izmantojot 10 mL heksāna. Ūdens slānis tika centrifugēts, lai iegūtu gaiši dzeltenīgas nogulsnes, kuras pēc tam mazgāja ar ūdeni un žāvēja gaissausi. Heksānu atdestilēja vakuumā. Iegūto atlikumu sadalīja ar šķīduma - šķīduma ekstrakciju izmantojot ūdeni un etilacetātu. Etilacetāta slāni atdestilēja vakuumā. Tricīnamolekulu saturošu savienojumu attīrīšana pēc iepriekš dotā aprakst veikta arī ekstraktiem, kas iegūti ar ultraskaņu apstrādājot kviešu salmus.

2.14. Iegūto savienojumu antioksidantās aktivitātes noteikšana ar (ORAC) metodi

Skābekļa aktīvās formas ieguva, termiski sadalot AAPH (2,-2'-azobis(2-amidino-propān) dihidrohlorīdu), tas samazināja fluoresceīna fluorescenci. Kad šajā sistēmā pievienoja antioksidantus, kas spējīgi atdot protonu, tad to 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

fluorescēna šķīduma, izmantojot automātisko paraugu ievadīšanas 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 ieguva kinētiskās līknes.

2.15. Oregonīna bioloģiskās aktivitātes pētījumi

Promocijas darbā attīrītā oregonīna bioloģiskās aktivitātes pētījumus veica RSU Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedrā, Bulgārijas reproduktīvās bioloģijas un imunoloģijas institūtā, kā arī Francijas valsts agronomijas institūta (INRA) Klermontas Overņa-Rona-Alpu zinātniskā centra Cilvēku uztura katedrā.

Oregonīna ietekmi uz aizkuņģa dziedzera lipāzes funkciju pētīja RSU Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedrā. Lipāzes funkcijas modificēšana ļauj kontrolēt uztura tauku pārstrādi organismos. Pārbaudi veica *in vitro* testos pēc iespējas tuvāk enzīmu funkcionējošajai videi. Galveno uzmanību pievērsa lipāzes funkcijai, kuru testēja analizējot fermentatīvo reakciju produktus un to ietekmi uz pH.

Oregonīna ietekmes pētījumus uz DNA metilēšanas epigēnētiskā procesa galvenajiem dalībniekiem, proti DNMT transkriptoriem un mtDNA veica Bulgārijas reproduktīvās bioloģijas un imunoloģijas institūtā un Francijas INRA Cilvēku uztura katedrā. Dzīvnieki, kurus izmantoja peļu embriju šūnu iegūšanai, audzēja un apstrādāja IBIR-BAS vivārijā saskaņā ar Bulgārijas veterināro likumu (25/01/2011) par dzīves apstākļiem un eksperimentiem izmantoto dzīvnieku labturību, likums adoptēts no Eiropas Savienības regulas 86/609 un Direktīvas 2010/63/ES. Eksperimentālos protokolus apstiprināja Nacionālā dzīvnieku ētikas komisija ("Atļauja izmantot dzīvniekus eksperimentos ", N84 / 04.10.2013., derīguma termiņš 04.10.2018.). Par dzīvnieku labturību atbildīgā persona, kas praktiski darbojās ar dzīvniekiem, kurus izmantoja pētījumā, Bulgārijas veterinārie dienesti ir licencējuši eksperimentu veikšanai ar dzīvniekiem. Dzīvnieki tika anestēti. Tika darīts viss iespējamais, lai mazinātu ciešanas. MEFs tika iegūti no 13 līdz 14 dienu veciem peļu embrijiem. Pēc sarkano orgānu sadalīšanas audus samala un apstrādāja ar 0,25 % tripsīna / EDTA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA, ASV). Izdalītās šūnas audzēja vienā slānī 37 °C temperatūrā mitrinātā atmosfērā ar 5 % CO₂ un 95 % gaisa, izmantojot Dulbecco's Modificētu barotni (DMEM) ar 1,0 g / l glikozes (PANBiotech, Aidenbach, Vācija) šķīdumu. DMEM bija papildināts ar

10 % liellopu serumu (Sigma-Aldrich, SaintLuī, MA, ASV) un penicilīna, streptomicīna, amfotericīna B maisījumu (PAN-Biotech, Aidenbaha, Vācija). Peles embrija fibroblastu šūnu līnija NIH / 3T3 tika iegūta no Amerikas tipa kultūras Kolekcijas (Manassas, VA, ASV). Šūnas kultivēja apstākļos, ko izmanto MEF. Šūnu dzīvotspēja tika novērtēta ar 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīdu testu (Sigma-Aldrich, Saint Luisa, MA, ASV), kuras pamatā ir tetrazolija sāls šķelšanās reakcija ar mitohondriju dehidrogenāzēm dzīvotspējīgās šūnās. NIH / 3T3 šūnas un MEF tika iesēti sterilās 96 iedobēs plāksnēs pie blīvuma aptuveni 2×10^4 šūnas vienā iedobē. Pēc tam šūnas tika pakļautas 50 °C temperatūrai un barotnē 24 un 48 stundu laikā tika ievadīts 100 μL oregonīna šķīdums. Neapstrādātas šūnas un tukšas iedobes (bez šūnām) saņēma 100 μL barotni. Pēc inkubācijas ar oregonīnu, kultūru barotni noņēma un pievienoja 100 μL MTT koncentrācijā 500 μg mL⁻¹. Šūnas tika inkubētas mitrinātā CO₂ inkubatorā vēl 3 stundas. Pēc tam MTT šķīdumu izņēma un pievienoja 100 μL dimetilsulfoksīda (DMSO, Merck, Darmštate, Vācija), lai izšķīdinātu formazāna kristālus. Lai iegūtu dzīvotspējīgo šūnu skaitu attiecību pret kontrolpopulāciju mērīja absorbciju pie 544 nm ar plašu lasītāju (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Vācija). Datus izteica kā vidējās vērtības ± SD, kas iegūtas no trim dažādiem eksperimentiem ar katru šūnu tipu. Ekstrahēto RNS izmantoja pirmās cDNS sintēzei, izmantojot cDNS sintēzes komplektu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, CA, ASV).

Ekstrahētās DNS tīrība un koncentrācija tika noteikta, izmantojot Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA ASV). Atsevišķa mitohondrija līmeņu ratiometriskai pārbaudei gēna citohromam B (Cytb) pret vienas kopijas kodolģēnu (b-aktīns) izmantoja, lai novērtētu mtDNA /uz vienu šūnu. Šī tehnika ļāva aprēķināt vidējo mtDNA kopiju numuru šūnā bez nepieciešamības noteikt šūnu skaitu. Izmantotā tehnika, metodikas un rezultāti apkopoti kopējā publikācijā [88].

Oregonīna ietekmes pētījumi uz aunu spermas kvalitāti. Auna spermatozoīdu augstas vitalitātes un kustīguma uzturēšanai, tos uzglabāja zemā temperatūrā, jo tam ir izšķiroša loma veiksmīgā apaugļošanā. Šis pētījums novērtēja dabiskā antioksidanta oregonīna ietekmi uz aunu spermas kvalitāti, to uzglabājot 48 stundas 5 °C temperatūrā. Kopā izmantoja astoņpadsmit ejakulātus (trīs atkārtojumi 6 ejakulātiem) no trīs veselīgiem Bulgārijas šķirņu auniem, kas savākti ar mākslīgās maksts metodi. Donori bija 4–6 gadus veci, ķermenis svārs 60-70 kg. Visi ejakulāti tika nogādāti laboratorijā, ievietoti ūdens

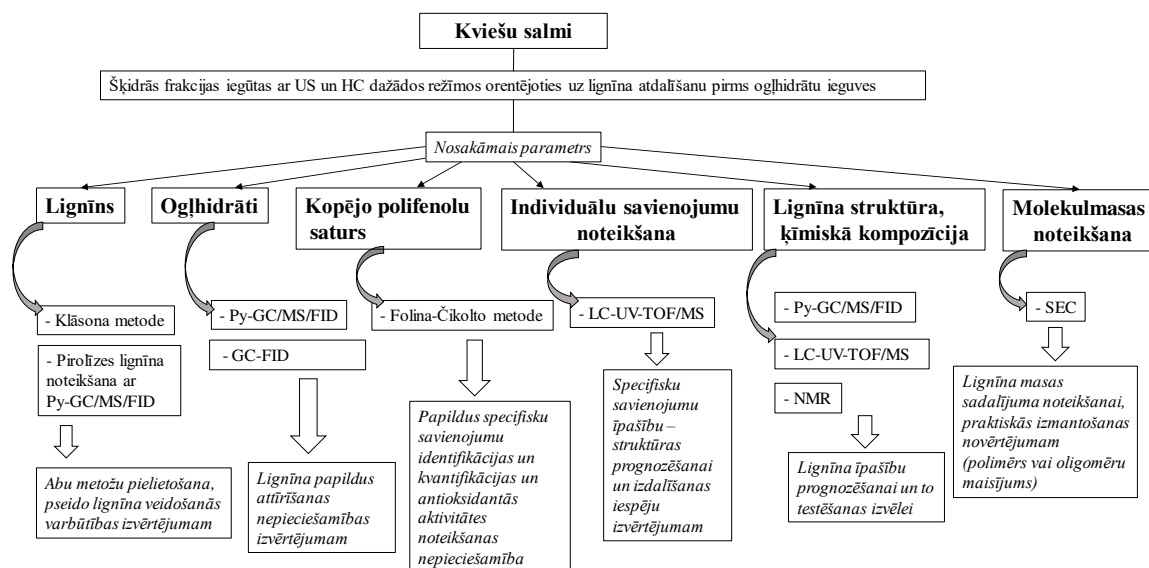
vannā 37 °C temperatūrā un sākotnēji novērtēti to makroskopiskie parametri - spermas koncentrācija un masas kustīgums. Ejakulātus atšķaidīja ar tam speciāli paredzētu šķīdumu (TGGY, Sigma Aldrich). Pēc tam tos sadalīja divās vienādās daļās - A daļa (bez oregonīna; kontrole) un B daļa (papildināta ar 100µM oregonīna; eksperimentāla). Katru ejakulāta paraugu atšķaidīja ar kontroli vai eksperimentālo pagarinātāju, līdz spermas koncentrāciju noregulēja līdz 200×10^6 šūnām/mL. Ievietoja vienādas kontroles un eksperimentālo paraugu alikvotas glāzē ar ūdeni 37 °C temperatūrā un ledusskapī 5 °C temperatūrā uzglabāšanai 48 stundas. Spermas kvalitātes novērtējumu veica pēc galveniem kinemātiskiem un morfoloģiskiem parametriem, spermatozoīdu mitohondriju stāvokļa noteikšanas un in vivo auglības pārbaudes. Izmantoto eksperimentu parametri un rezultāti apkopoti kopīgā publikācijā [148].

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Promocijas darbs iekļauj samērā jaunu, desmitgadē atklātu pētīšanas virzienu par flavonoīdu integrācija graudaugu lignīnā. Ir zināmas visbiežāk sastopamā lignīnā integrētā flavona tricīna nozīmīgākās bioloģiskās aktivitātes (labvēlīga ietekme uz augu augšanu, antioksidants, anti-novecošanās, pretvēža un kardioprotektīvais potenciāls). To izmantošanai nepieciešama ieguves avotu apzināšana un analīzes metožu pilnveidošana. To ķīmiskais raksturojums kviešu salmu biomasā kā ogļhidrātu ieguves procesa blakusproduktos nav atrodams, tie ir raksturoti pārsvarā specifiski šim mērķim tos sintezējot vai izdalot lignīnu pēc iespējas neizmainot tā struktūru. Darbs ietver lignīna-flavona tricīna kompleksa raksturošanu kā blakusproduktam ogļhidrātu ražošanā. Šī promocijas darba daļa ir veltīta tricīna-lignīna kompleksu saturošu frakciju analītiskai izpētei, tai skaitā individuālu savienojumu identifikācijai un to kvantitatīvai noteikšanai maisījumos, kas iegūti, apstrādājot kviešu salmus ar ultraskaņu un/vai hidrodinamisko kavitāciju mērķētu uz lignocelulozes matricas sadalīšanu. Pētījuma mērķis ir daudzpusīga ķīmiskā profila raksturošana un bioloģiskās aktivitātes noteikšana, pielietojot dažādas analīzes metodes, lai iegūtu informāciju par lignīna saturošo frakciju izmantošanas potenciālu.

3.1. Analītiskās pieejas izveide kviešu salmu lignīna saturošo frakciju ķīmiskam raksturojumam

Analītisko pieeju promocijas darba kontekstā ir jāsaprot kā dažādu analīžu metožu kopumu, nosakot maisījumu ķīmisko sastāvu to sakotnēji analizējot pa sastāvdaļām, ja nepieciešams iekļaujot individuālu savienojumu vai ķīmisko grupu izdalīšanu, pēc tam veicot iegūto rezultātu apkopojumu un izvērtējot izmantoto metožu piemērotību konkrētajam pētījuma objektam. Ņemot vērā, ka pēc literatūras datiem celuloze, hemiceluloze un lignīns veido apmēram 60 % - 90 % no sausas kviešu salmu biomasas, atlikusī daļa satur ekstraktvielas, proteīnus un pektīnus [149] un analizējamās frakcijas ir cukuru ieguves blakusprodukts, tādēļ analīzes metodes izvēlētas galvenokārt orientējoties uz lignīna un ekstraktvielu savienojumu grupām. 3.1. attēlā redzama pašizveidota shēma kviešu salmu promocijas darbā pētāmo šķidro frakciju analīzēm, kas nodrošina pamatraksturojumu un norāda tālāku virzību uz specifisku (konkrētu savienojumu vai savienojumu grupu) analīžu nepieciešamību.



3.1.att. Pašizveidota analītiskās pieejas shēma kviešu salmu ķīmiskam pamatraksturojumam

3.2. Kviešu salmu lignīna saturošo frakciju ķīmiskais pamatraksturojums

Pamatraksturojums veikts, izmantojot 3.1. attēlā redzamo analītiskās pieejas shēmu. Pētījumā izmantotās lignīna saturošās frakcijas tika iegūtas apstrādājot kviešu salmus ar ultraskaņu variējot ar šādiem parametriem: iedarbības laiku (30, 60, 90 vai 120 min) un temperatūru (25°C-35 °C), izmantota gan viena frekvence (25 un 80 kHz), gan dažādu frekvenču kompozīcijas (25 + 80), (25 + 80 + 25) and (25 + 80 + 25 + 80) kHz. Kā šķīdinātājs tika izmantots ūdens (paraugi US1 un US2) vai nātrija hidroksīda ūdens šķīdums (pievienots 10 % no sausas kviešu salmu biomasas, paraugi US3-US6). Pirmām kārtām tika veiktas neapstrādātas un apstrādātas kviešu salmu biomasas ķīmiskās pamatkompozīcijas analīzes, nosakot pelnu, ogļhidrātu, Klāsona lignīna un ekstraktvielu saturu.

Iegūtie dati (3.1. tabula) pierāda, ka kviešu salmu priekšapstrāde NaOH klātbūtnē gan ar HC (HC paraugs), gan apstrādājot ar ultraskaņu (US 3 - US 6 paraugi) ievērojami samazina lignīna saturu (Klason lignīna izteiksmē) atlikušajā kviešu salmu biomasā. Lignīna saturs kviešu salmu biomasā pēc apstrādes ar ultraskaņu (paraugi US 3 - US 6) un HC sārmainā vidē (HC paraugs) bija attiecīgi par 30–40 % un 25 % zemāki, salīdzinot ar neapstrādātu kviešu salmu biomasu (3.1. tabula).

Kviešu salmu biomasas ķīmiskā kompozīcija pirms un pēc apstrādes US vai ar HC, masas % uz sausu biomasu

Paraugs	Pelni ¹	Ogļhidrāti ²			Klāsona lignīns ³	Ekstraktvielas ⁴
		Pentozes	Heksozes	Kopā		
Kviešu salmi	7,5±0,3	24,0±0,3	49,4±0,5	73,4±0,7	21,2±0,2	5,0±0,3
HC	3,0±0,1	28,2±0,3	59,3±0,6	87,5±0,6	16,1±0,2	0,7±0,1
US 1	6,2±0,3	29,5±0,5	41,3±0,5	70,8±0,5	22,4±0,2	2,5±0,3
US 2	6,1±0,1	27,6±0,3	40,4±0,5	68,0±0,6	23,5±0,3	2,2±0,2
US 3	3,5±0,05	31,4±0,5	47,1±0,6	78,5±0,5	14,6±0,1	1,1±0,1
US 4	2,7±0,05	29,1±0,4	45,3±0,5	74,3±0,6	14,0±0,5	1,0±0,1
US 5	3,3±0,05	31,0±0,5	47,7±0,6	78,8±0,7	13,6±0,1	1,0±0,1
US 6	2,6±0,05	30,6±0,5	45,6±0,4	76,4±0,8	12,7±0,1	0,9±0,1

¹Rezultāti doti uz sausu kviešu salmu biomasu

²Rezultāti izteikti uz sausu bezpelnu kviešu salmu biomasu monomēru cukuru saturu veidā

³Rezultāti koriģēti attiecībā uz proteīnu un pelnu saturu, izteikti uz sausu bezpelnu kviešu salmu biomasu

⁴Rezultāti izteikti uz sausu bezpelnu kviešu salmu biomasu

⁵10 masas % no sausas kviešu salmu biomasas

Pamatojoties uz iegūtajiem rezultātiem (3.1. tabula) US priekšapstrāde, ir efektīvāks kviešu salmu delignifikācijas līdzeklis nekā HC. Palielinoties US frekvencei rindā US 3 →US 6, un it īpaši palielinoties procesa laikam samazinās lignīna saturs atlikušajā kviešu salmu cietajā biomasā atbilstoši tam, ka sonifikācijas laikam ir nozīmīga ietekme uz biomasas delignifikāciju [150,151].

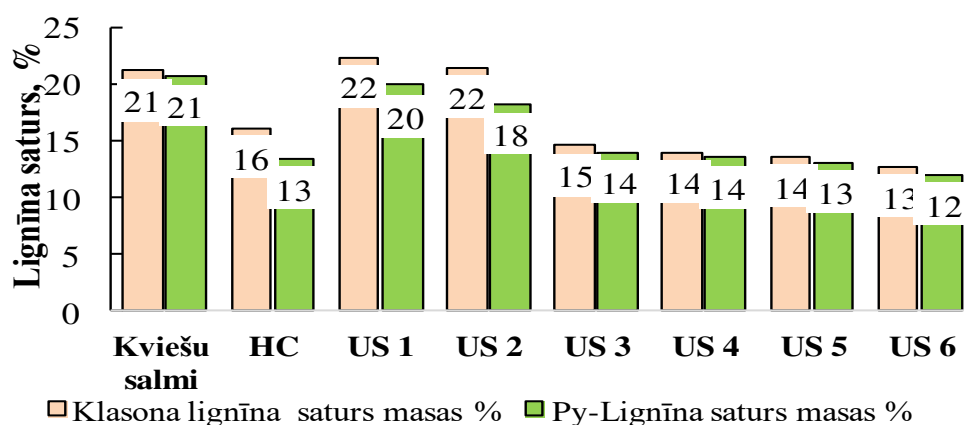
Lignīna satura noteikšana ar ierasti izmantoto Klasona slapjās ķīmijas procedūru var dod palielinātas vērtības iepriekš apstrādātā biomasā tā sauktā pseido-lignīna veidošanās dēļ, jo var notikt lignīna saistīšanās / kondensācijas reakcijas ar lignīna sadalīšanās produktiem un tas var būt arī saistīts ar citu polimēru savienojumu klātbūtni biomasā [152]. Pseido-lignīna veidošanās iespēja US biomasas pirmapstrādes laikā var rasties, izmantojot sonikācijas ķīmisko ietekmi, kas rodas no kavitācijas; mikro burbuļu netiešā sabrukšana rada aktīvos brīvos radikāļus, kas sāk degradēt lignocelulozes biomasas polimēru komponentus [153,154].

Py-GC/MS/FID metode, ko plaši izmanto lignocelulozes materiālu ķīmiskā sastāva raksturošanai [155–157], tika izmantota, lai iegūtu informāciju par kviešu salmu ķīmiskā sastāva izmaiņām, apstrādājot tos ar HC un US, šo metožu ietekmes izvērtēšanai. Pirolīzes hromatogrammas smaiļu laukumi, kas iegūti no Py-GC/MS/FID datiem un reprezentē

gaistošās vielas, kas veidojas no lignīna, ogļhidrātiem, olbaltumvielām un ekstraktiem, tika normalizēti līdz 100 % un izmantoti lignīna satura noteikšanai (Py-lignīns), aprēķinot to kā smaiļu laukumu summas attiecību, dalot lignīna atvasinājumu savienojumu summu ar visu detektēto smaiļu laukumu summu, kas reizināta ar 100 %. Aprēķinos netika izmantots CO₂ apgabals, kas pārklājas ar ogļhidrātu, lignīna un maznozīmīgu produktu smaiļu maksimumiem.

Lignīna satura salīdzinājums, izmantojot Py-GC/MS/FID un Klasona metodi (3.2. att.), parādīja, ka ar šīm divām metodēm iegūtie dati labi korelē, ja tos izmanto, lignīna satura novērtēšanai neapstrādātos kviešu salmos un US sārmainā vidē apstrādātu kviešu salmu frakcijās (paraugi US 3, US 4, US 5, US 6).

Iegūtie lignīna satura rezultāti, liecina, ka pseudo-lignīns ir izveidojies tikai kviešu salmu cietajam atlikumam, kas iegūts ar kviešu salmu apstrādi US kā šķīdinātāju izmantojot ūdeni (US 1 un US 2) un pēc HC (HC).



3.2.att. Lignīna saturs kviešu salmu cietajā atlikumā pēc HC un apstrādes US

Lignīna struktūra šajos maisījumos tika kvantitatīvi raksturota ar Py-GC/MS/FID metodi, sagrupējot individuālu fenolu smaiļu laukumus (aprēķināti kā relatīvie procenti no visu lignīna izcelsmes pirolīzes produktu smaiļu laukumiem, kuri normalizēti līdz 100 %) pēc specifiskām struktūras pazīmēm, siringil- (S), gvajacil- (G) un p-hidroksifenil- (H) atvasinājumi, kas atbilst atšķirīgi metoksilētām monomērām vienībām lignīna makromolekulā (3.2. tabula).

3.2.tabula

Py-GC/MS/FID rezultātu apkopojums. p-hidroksifenola (H), gvajakola (G) un siringola (S) atvasinājumu relatīvais saturs (%) ar lignīnu saistītajos gaistošajos produktos kviešu salmos

Paraugs	Dažādu savienojumu relatīvais saturs (%) ar standartnovirzēm lignīna atvasinājumos				
	H-atvasinājumi	G-atvasinājumi	S-atvasinājumi	S/G attiecība	(S+G) atvasinājumi ar garām propanoīda sānu ķēdēm
Kviešu salmi	14,1±0,2	55,0±0,6	31,0±0,3	0,56	15,1±0,2
HC	10,3±0,1	57,6±0,6	32,1±0,6	0,56	20,3±0,3
US 1	6,0±0,1	54,7±0,5	39,3±0,5	0,65	26,8±0,5
US 2	6,7±0,1	56,4±0,6	36,9±0,4	0,65	26,2±0,4
US 3	10,3±0,1	49,7±0,5	40,0±0,4	0,75	24,3±0,3
US 4	9,7±0,1	50,3±0,5	40,0±0,4	0,77	24,9±0,3
US 5	10,1±0,1	49,8±0,5	40,1±0,5	0,77	24,1±0,2
US 6	10,7±0,1	48,3±0,5	41,0±0,4	0,80	24,9±0,3

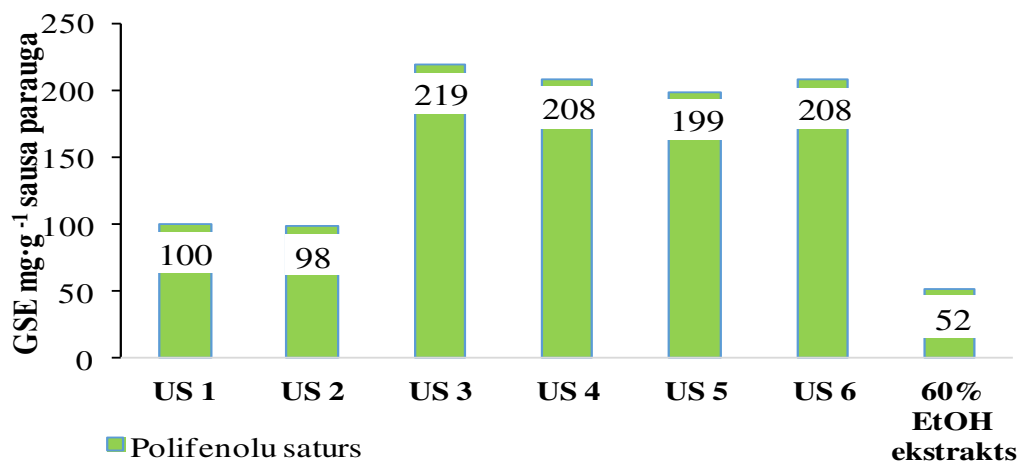
Kviešu salmu cieto atlikumu lignīni, kas iegūti ar dažādiem apstrādes veidiem, attiecībā uz gvajacila (G), siringil (S) un p-hidroksifenpropāna (H) vienību daudzumiem, joprojām atbilst GSH-lignīnu klasifikācijai (3.2. tabula), pie kuriem arī pieder visi neapstrādātu kviešu salmu lignīni [158].

Tā kā liela daļa gvajakola vinila atvasinājumu, kas veidojas analītiskajā pirolīzē, neveidojas no lignīna makromolekulām, bet no p-hidroksicinnamātiem, kas plaši izplatīti kviešu salmu biomasā [109], lai novērtētu lignīna S/G attiecību kviešu salmos un to cietajos atlikumos pēc apstrādes, 4- vinila gvajakola un 4-vinilsiringols saturs netika izmantots [159].

Neapstrādātu kviešu salmu lignīnam konstatētā S/G vērtība 0,56 (3.2. tabula) ir tuvu vērtībām, kas norādītas literatūrā [109]. Iegūtie Py-GC/MS/FID dati (3.2. tabula) parāda, ka HC apstrāde neizraisīja izmaiņas aromātiskā lignīna struktūrā (3.2. tabula, HC paraugs). Turpretī US apstrāde mainīja lignīna S/G attiecību atlikušajā kviešu salmu cietajā atlikumā. Šī vērtība palielinās, salīdzinot gan ar neapstrādātiem kviešu salmiem, gan atlikumiem pēc HC apstrādes, kas norāda, ka gvajacil-lignīna vienību saturs ir samazinājies lignīna makromolekulā. Turklāt siringilfenilpropanoīda vienību daļas palielināšanās kviešu salmu cietā atlikuma lignīnā, kas iegūts sārmainā vidē, tā ir ievērojami lielāka nekā atlikumos pēc iepriekšējās apstrādes US ar ūdeni (paraugi US 3, US4, US 5, US 6 un US 1, US 2, attiecīgi).

Visos kviešu salmu apstrādātajos paraugos tika novērots siringil- un gvajacilgrupas atvasinājumu ar garām propanoīdu sānu ķēdēm palielinājums, salīdzinot ar neapstrādātiem kviešu salmiem (3.2. tabula). Tas norāda, ka lignīna sadalīšanās produkti, kas rodas apstrādes laikā, nonāk šķidrās frakcijās un palielina kviešu salmu cietā atliekumā esošo lignīna makromolekulu [156].

Nemot vērā, ka promocijas darba mērķī ietilpst bioloģiskās aktivitātes raksturošana, kur antioskdiantā aktivitāte ir nozīmīgs parametrs un šo aktivitāti veicina paraugā esošās hidroskilgrupas, tad kopējais polifenolu sastāvs ir ļoti laba skrīninga metode, lai sagrupētu paraugus pēc paredzamās antioksidantās aktivitātes. Visi pētītie ekstrakti raksturojas ar polifenola savienojumu saturu no 52-219 mg GSE uz gramu sausa, bezpelnu paraugu (skatīt 3.3.attēlu). Literatūrā ir atrodami dati, ka, piemēram, no rīsu salmiem iegūtais lignīns satur polifenola savienojums no 25 līdz 29 mg GSE g⁻¹ lignīna parauga [160], bet kukurūzas salmiem 246.13 mg GSE g⁻¹ [161], norādot, ka darbā analizēto kviešu salmu lignīnu paraugos polifenola saturs ir vidējs, liecinot par potenciālu šo paraugu antioksidanto aktivitāti.



3.3.att. Polifenolu savienojumu saturs kviešu salmu paraugos

Polifenola savienojumu saturs, norāda uz lignīna makromolekulas depolimerizāciju delignifikācijas laikā, veidojoties jaunām fenoliskām hidroksilgrupām, tas norāda uz zemas molekulārās masas savienojumu klātbūtni, kuras iespējams analizēt ar šķidrums

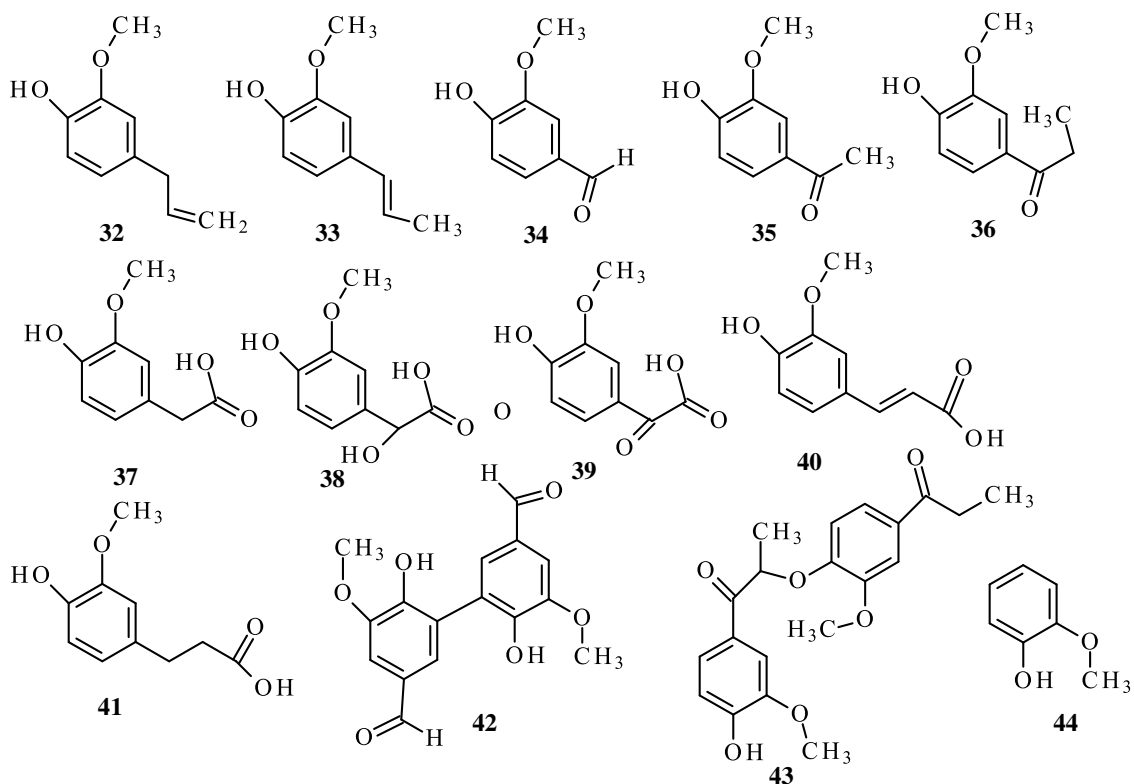
hromatogrāfiju – masspektometriju bez modificēšanas, kas ir nozīmīga alternatīva vai papildinājums līdz šim lignīna saturošu paraugu analīzei lietotajai gāzu hromatogrāfiju.

Tomēr, šāda analīzes metode ir izaicinoša, jo lignīna struktūra ir ļoti sarežģīta un atšķiras atkarībā no biomasas un izdalīšanas metodes, turklāt lignīna maisījumi satur daudz līdzīgas ķīmiskās struktūras polifenola savienojumus. Tādēļ ir nepieciešams veidot lignīna modeļvielu datu bāzi, kas pavērtu iespēju praktiski izmantot šķidrums hromatogrāfiju – masspektometriju kā lignīna paraugu analīzes metodi – bez iepriekšējas lignīnu modificēšanas, orientējoties uz lignīna oligomēru savienojumu identificēšanu un kvantitatīvu noteikšanu.

3.3. Lignīna modeļvielu šķidrums hromatografijas – tandēma masspektometrijas datu bāzes veidošana

Nav publisku pieejamas lignīna oligomēru masspektometriskās datu bāzes, viens no iemesliem ir lignīna modeļvielu trūkums un plašā ķīmisko struktūru daudzveidība, otrkārt līdz šim kad izplatītākas bija lignīna lielmolekulārās frakcijas, šo savienojumu analīze ar šķidrums hromatogrāfiju nebija aktuāla. Mūsdienās straujo attīstoties lignīna ieguves metodēm, piemēram, ar fermentiem, tiek speciāli iegūtas lignīna monomēru un oligomēru frakcijas, ar augstu bioloģisko aktivitāti un plašu praktiskās izmantošanas potenciālu. Problemātika slēpjas, ka nav pielāgotas un attīstītas metodes šo savienojumu analīzei atsevišķi nevis kā lignocelulozes kompleksa sastāvdaļai. Lai varētu attīstīt šo lignīna zemmolekulāro un oligomēro kompleksu analīzi, kur hromatogrāfiskā analīze būtu ievērojami piemērotāka kvalitātes kontrolei nekā zinātniskajos pētījumos izmantotā NMR analīze, gan izmaksu, gan pieejamības dēļ. Šajā darbā ir uzsākta lignīna modeļvielu šķidrums hromatografijas-masspektometriskās datu bāzes veidošana analizējot 20 dažādas lignīna modeļvielas atšķirīgos režīmos, atlasīti piemērotākie apstākļi. Izvēlētie 20 savienojumi modelē lignīna struktūras pamatvienības eigenolu (**32**), izoeigenolu (**33**), vanilīnu (**34**), acetovanilonu (**35**), propiovanilonu (**36**), homovanilīnskābi (**37**), vanilīnmandeļskābi (**38**), vanilīnglikolskābi (**39**), ferulskābi (**40**), dihidroferulīnskābi (**41**), divanilīnu (**42**), dipropiovanilonu (**43**), gvajakolu (**44**), metilgvajakolu (**45**), etilgvajakolu (**46**), propilgvajakolu (**47**) (savienojumu ķīmiskās struktūrformulas parādītas 3.4. attēlā).

Lai saprastu šo modeļvielu fragmentācijas mehānismus, tika salīdzināti pieejamie literatūras dati ar iegūtajiem eksperimentālajiem rezultātiem. Modeļsavienojumam (**32**) molekulārais jons ir m/z 163, kam kā raksturīgākā fragmentācija ir ziņota metilgrupas atšķelšana spektrā josla ar m/z 148 $[M-H-CH_3]$ [162], papildus šiem joniem eksperimentāli redzama tendence molekulārajam jonam veidot dimēru pie m/z 325. Lai novērtētu modeļvielu struktūras īpatnību ietekmi uz to fragmentāciju masspektometrijas analīzē, kā otra modeļviela tika izvēlēts izoeiganols (**33**), tas atšķiras no eiganola ar dubultsaites atrašanās vietu molekulā, tas var veidoties arī no eiganola paaugstinātā temperatūrā. Molekulārais jons izoeiganolam ir vienāds ar eiganolu m/z 163, ir novērojama arī tipiska iepriekš aprakstītā fragmentācija tāpat kā eiganolam tomēr ir acīmredzami papildus fragmentācijas joni kā m/z 136 un m/z 343. Jons m/z 136 varētu būt skaidrojams ar molekulāra jona etilēn grupas atšķelšanu, bet m/z 343 $[2M+H_2O]^+$ ar ūdens molekulas piesaisti jonizācijas procesā izveidotajam dimēram. Vanilīna (**34**) masspektrā novērojama pilnīga sakritība ar literatūrā atrodamiem fragmentācijas joniem m/z 151 (molekulārais jons), m/z 136 (-15 Da metilgrupas (-CH₃) zaudēšana), m/z 108 (turpmāka viena oglekļa un skābekļa atšķelšana no jona m/z 136), m/z 92 (sekojoša skābekļa atšķelšana no jona m/z 108) [163]. Acetovanilons (**35**) parāda molekulāro jonu m/z 165 un dimēra veidošanos pie m/z 329, jons m/z 150 tiek asociēts ar metilgrupas (-15Da) zaudējumu, bet m/z 122 ar tam sekojošu oglekļa un skābekļa atšķelšanu. Propiovanilonam (**36**) molekulārais jons ir redzams pie m/z 179, kas fragmentējoties atšķel metilgrupu tāpat kā vanilīns veidojot m/z 164. Homovanilīnskābes (**37**) molekulārais jons ir pie m/z 181 un fragments m/z 137 (karbosiļgrupas atšķelšana).



3.4.att. Lignīna modeļvielu, kas izmantotas LC-UV-TOF/MS datu bāzes veidošanai, struktūrformulas

Vanilīnmandeļskābes (**38**) molekulārais jons ir pie m/z 197 un raksturīgais fragmentjons m/z 137, kas atspoguļo CHO_3 grupas zudumu no karboksilāta daļas un papildu skābekļa zaudēšanu [164]. Vanilīnglikolskābe (**39**) ar molekulāro jonu m/z 195, parādīja fragmentāciju par 72 Da, kas atbilst karboksilgrupas un vēl viena skābekļa zudumam. Ferulskābe (**40**) ar molekulāro jonu m/z 193, deva tipisku literatūrā atrodamu fragmentāciju m/z 134 un m/z 178 [165]. Dihidroferulīnskābes (**41**) masspektrs raksturojas ar molekulāro jonu m/z 195 un fragmentu m/z 136, kas atbilst literatūras datiem [166]. Lignīna modeļvielu molekulārie joni un raksturīgājie fragmenti ir doti 3.3. tabulā.

Lignīna modeļvielu molekulmasas, molekulārie joni un raksturīgā fragmentācija

Savienojums (Molekulmasa, g·mol ⁻¹)	ESI (-) (m/z)		
	[M-H] ⁻	[2M-H] ⁻	Fragmentācija
32 (164,200)	163,075	325,145	148,052 [M-H-CH ₃] ⁻
33 (164,204)	163,075	325,144	148,052 [M-H-CH ₃] ⁻ ; 136,015 [M-H-C ₂ H ₃] ⁻ ; 343,154[2M+H ₂ O] ⁻
34 (152,149)	151,040	301,072	136,017 [M-H-CH ₃] ⁻ ; 108,021 [M-H-CO] ⁻ ; 92,026 [M-H-COO] ⁻
35 (166,170)	165,055	329,103	150,032 [M-H-CH ₃] ⁻ ;122,037 [M-H-CO] ⁻
36 (180,201)	179,164	-	164,055[M-H-CH ₃] ⁻ ; 112,985
37 (182,173)	181,050	-	137,024 [M-H-COO] ⁻ ; 122,037
38 (198,173)	197,807	-	137,023[M-H-CHO ₃] ⁻ ;112,872; 92,927
39 (196,160)	195,029	-	123,044[M-H-C ₂ O ₃] ⁻ ;
40 (194,180)	193,052	-	178,027 [M-H-CH ₃] ⁻ ;134,067 [M-H-CO ₂ -CH ₃] ⁻
41 (196,074)	195,068	-	136,052;
42 (302,279)	301,073	-	286,047; 215,034
43 (358,385)	357,139	-	164,047; 179,071; 233,091; 317,103
44 (124,140)	123,044		109,039

3.4. Individuālu savienojumu identifikācija un kvantifikācija kviešu salmu lignīna paraugos ar UHPLC-TOF/MS

Šķidrums hromatogrāfija apvienojumā ar augstas izšķirtspējas masas spektrometriju apvienojumā ar iepriekš izveidotu datu bāzi tika izmantota, lai ekstraktos provizoriski identificētu atsevišķus polāros monomēros, oligomēros savienojumus un raksturotu polimēros bez to iepriekšējās modifikācijas.

Savienojumu identifikācija ar masspektometriju dota 3.4. tabulā. Pirmo hromatogrammas smaile šajos paraugos var saistīt ar ogļhidrātu atvasinājumiem, piemēram, hromatogrāfiskai smaile **1** nav absorbcijas UV diapazonā, un abos jonizācijas režīmos regulāri tiek zaudēti 114 Da, ierasti 114 Da zudumi tiek novēroti ESI-MS ogļhidrātu atvasinājumu spektros, kas rodas, zaudējot pentozei ūdens molekulu (Pent-H₂O), tāpat ir ziņots, ka joni m/z 131 un m/z 115, arī m/z 159, ir tipiski heksožu un pentožu monosaharīdu atvasinājumu fragmentjoni, tas pats attiecas arī uz smaili **2** un smaili **10** [167–169]. Tālāka savienojumu identifikācija pēc masspektriem liecina par flavonoīdu atvasinājumu klātbūtni, smaile **5** tiek identificēta kā apingenīna-6-C-heksozīda-C-pentozīds (m/z 563 [M-H]⁻; m/z 473, m/z 443, m/z 383, m/z 353), pēc literatūras datiem tas jau ir identificēts kviešu salmu ekstraktos [170,171], tīri teorētiski tas varētu būt arī luteolīna-C-

heksozīds-O-deoksiheksozīds, kas arī ir identificēts kviešu salmos. Tomēr iegūtajos masspektros fragmenta jona m/z 473 signāls ir ar zemu intensitāti un salīdzinot pēc relatīvām intensitātēm m/z 383 jona signāla intensitāte ir lielāka nekā m/z 473 jonam liecinot par apengenīna aglikonu [172]. Tāpat pamatjona m/z 473 [(M-H)-90] un fragments m/z 53 [(M-H)-60] liecina par 6-C petozil vienības klātbūtni, arī fragmentjoni m/z 353 (aglikons+83) un m/z 383 (aglikons+113) liecina par apingenīna (M_w -270 g mol⁻¹) aglikonu. Organisko skābju (savienojumi 6, 11 un 12) klātbūtne ir konstatēta pamatojoties uz ChemSpider masspektrometrisko datu bāzi un literatūras datiem. Piemēram, organisko skābju spektros ir redzams jons m/z 187, kas fragmentējas par m/z 125, šī fragmentācija liecina par ūdens un CO₂ molekulas atšķelšanu, kas atbilst tipiskai karboskilskābju struktūras fragmentācijai. Savienojumi no 4,5 min līdz 5,5 min tiek asociēti ar tricīna atvasinājumiem. Šie savienojumi ir salīdzinoši nesen tikai atklāti un ir pierādīta to iesaistīšanās lignīna struktūrā.

Tricīns tika identificēts gan pēc literatūras datiem, gan izmantojot komerciāli pieejamu standartvielu (m/z 329, m/z 299, m/z 314, m/z 271). Tricīna atvasinājumi identificēti pierādot tajos tricīna klātbūtni un izmantojot fragmentāciju raksturota iespējamā ķīmiskā struktūra tādejādi klasificējot savienojumus kā flavonoīdu atvasinājumus un tricīna – lignīnus. Tricīna lignīnu savienojumi kviešu salmos pārsvarā tika raksturoti identificējot tipiskus zināmus salmu lignīnu oligomēru fragmentjonus kā, piemēram, m/z 329 [C₁₈H₁₇O₆]⁻, m/z 507 [C₂₈H₂₇O₉]⁻ un m/z 311 joni, tie ir raksturīgi lielākai daļai no saišu veidiem starp fenilpropanoīdu vienībām [173,174].

Detektēts arī jons m/z 183 [C₉H₁₁O₄]⁻, kas raksturo homolītisku lignīna C-8-C-9 kovalentās saites šķelšanos. Visu kviešu salmu lignīna saturošo paraugu masspektros ir aizdomas, ka ir polifenola lignīna saturoši savienojumi, kuri visticamāk ir ar lielāku masu par 1200 Da, jo salīdzinot pirmējo fragmentāciju ar otrējo ir redzams, ka otrējā masspektrā rodas papildus fragmentu ar lielāku masas lādiņa attiecību un tie neatbilst esošu fragmentu summām, kas varētu raskties savienojoties fragmentjoniem jonizēta stāvoklī.

Galvenās ķīmisko savienojumu klases, kas tika identificētas visos paraugos, bija lignīna atvasinājumi, proti, oligomēri un mazmolekulāri polifenoli (<1200 Da), fenolskābes (p-kumarīnskābe, ferulskābe), flavonoīdi (apigenin-6-C-heksozīds- C-pentosīds un tricīns) un polārie lipīdi (taukskābes). Šie ķīmiskie savienojumi papildus polārajiem lipīdiem pēc literatūras datiem ir klasificējami kā antioksidanti.

Lai labāk raksturotu paraugos esošo lignīna savienojumu struktūru, tika veikta lignīna izdalīšana pie pH 2.

Iegūtie lignīni tika izžāvēti un analizēti tādos pašos hromatografiskos apstākļos kā iepriekš aprakstītie paraugi. Ņemot vērā, ka šī pētījuma uzmanības centrā bija ar lignīnu bagātu frakciju valorizācijas stratēģiju raksturošana un novērtējums, lignīna oligomēru saturošām frakcijām papildus tika veikta masspektometriskā analīze. Savienojumu struktūras interpretācija veikta, izmantojot iepriekš izveidoto lignīna modeļvielu datu bāzi, ChemsSpider masspektometrisko datu bāzi un pieejamos literatūras datus.

Ņemot vērā, ka lignīna molekulu pētījumi ar šķidrums hromatogrāfiju – masspektometriju pēc literatūras datiem ir sākti no 2003. gada un pierādīta kā efektīva lignīna oligomēru raksturošanas metode [175], tomēr dēļ lignīna lielās heterogenitātes un strukturālās dažādības tā vēl joprojām ir atzīta kā ļoti sarežģīta un izaicinājums zinātniekiem [176].

Promocijas darbā lignīna oligomēru un polifenola sekundāro metbolītu identifikācija ir veikta ar masspektometriju bez NMR analīzēm, visu identificēto lignīna oligomēru struktūras ir pamatotas ar masspektometrijas datiem no literatūras, pēc iespējas izvairoties no nepareizas iegūto eksperimentālo datu interpretācijas.

Pētījumā identificēto lignīna savienojumu struktūras ticamība ir eksperimentāli pamatota ar analītiskās pirolīzes datiem, tādejādi iegūstot kviešu salmu lignīna raksturojumu gan bez lignīna modificēšanas, gan degradējot to līdz monomēriem.

Individuālu polifenolu savienojumu raksturojums kviešu salmu frakcijās, izmantojot LC-ESI-TOF/MS

Smailes Nr.	Izdal. laiks, (min)	[M-H] ⁺ (m/z)	Fragmenta joni (m/z)	Provizoriskā identifikācija	Savienojumu ķīmiskā grupa	Esamība frakcijās					
						US 1	US 2	US 3	US 4	US 5	US 6
1	0,54	Regulārs 114 Da zaudējums abos jonizācijas režīmos, nav absorbcijas ultravioletā diapazonā, tas norāda uz ogļhidrātu atvasinājumiem; m/z 131 un m/z 115, arī m/z 159		Heksozes, pentozes	Ogļhidrāti, oligosaharīdi	+	+	+	+	+	+
2	0,59	515, 238, 200, 156, 97 asociēti ar ogļhidrātu atvasinājumiem				+	+	+	+	+	+
3	4,74	525	391, 331,329,315,215	Gvajacilgliceril tricīns	Flavonoīdu atvasinājums	+	+	+	+	+	+
	4,84	495	314,329,507	Hidroksifenilgliceril tricīns	Flavonoīdu atvasinājums	+	+	+	+	+	+
4	4,85	507	329,315, 257,215	Tricīna glikoronīds	Flavonoīdu atvasinājums	+	+	+	+	+	+
5	4,65	563	473,443,383,353	Apingenīna-6-C-heksozīds-C-pentozīds	Flavonoīdu atvasinājums	-	+	+	+	+	+
6	4,68	187	125	Hidroksikarboksilskābe	Organisko skābju atvasinājums	-	+	+	+	-	+
7	5,32		377,329,315,193, 179,164,	Tricīna - lignīns	Flavonoīdu /lignīna atvasinājums	-	+	-	-	-	-
8	5,41	1051	809,525,329,315			-	+	-	-	-	-
9	6,53	621	31,299,183,179	Lignīna oligomērs	Lignīna atvasinājums	-	+	-	-	-	-
10	0,48	1085	955,825,695,565,435,305,175	Heksozes, pentozes	Ogļhidrāti, oligosaharīdi	-	-	+	-	-	+
11	4,67	163	119	Kumarīnskābe	Organiskās skābes	-	-	+	+	+	+
12	5,01	163,193	178,149,134,117,119	Kumarīnskābes un ferulskābes atvasinājums	Organiskās skābes	-	-	+	-	-	+

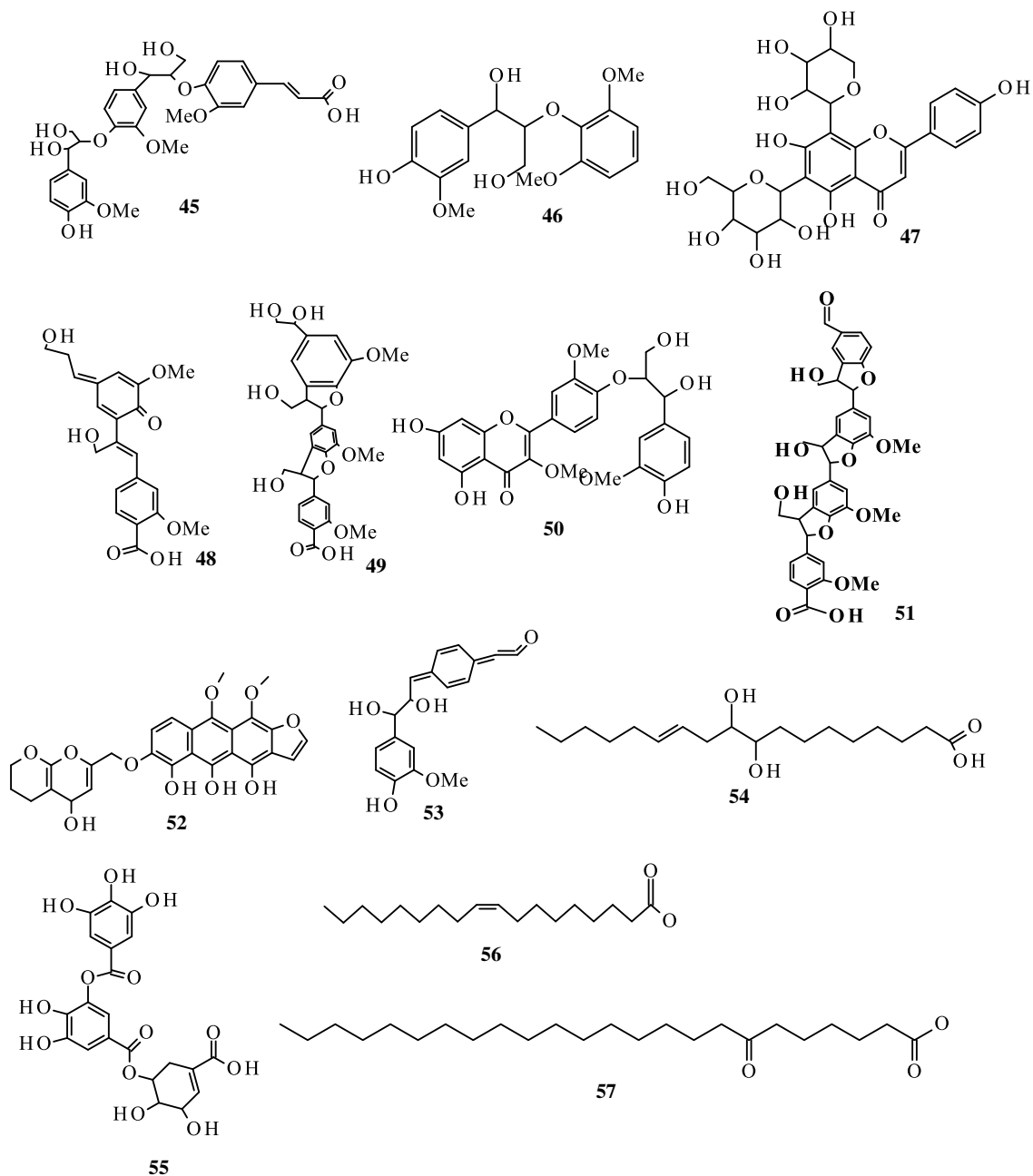
Kopumā, izmantojot šķidrums hromatografiju – masspektometriju, kviešu salmu lignīnu saturošajās frakcijās identificēti 19 dažādi lignīna oligomēri (3.5.tabula).

3.5. tabula

Lignīna oligomēru identifikācija kviešu salmu lignīnā ar UHPLC-TOF/MS analīzi

Smaile	[M-H] ⁻ , m/z	Fragmentācija	Identifikācija
1	585	389; 193; 178; 134	G(8-O-4)G(8-O-4)FA (45)
2	349	319; 301; 271; 331; 259; 195	Gvajacilglicerol-siringilēteris (46)
3	563	473,443, 383,353	Apigenīna-6-C-heksozīds-C-pentozīds (47)
4	999	957, 867, 825, 735, 693, 561, 429 (polisaharīda daļa regulārs pentozes zaudējums (132 Da)), 191, 173, 155, 129, 111, 85, 73 (izo-citronskābe)	Polisaharīds, veidots no pientozes vienībām savienotām ar izo-citronskābi
5	533	357, 327, 163, 119	Kumarīnskābes atvasinājums
6	1067	959, 841, 763, 567, 385, 341, 282, 267, 193, 134	Lignīna oligomēri (48) un (49)
7	525	507, 329, 314, 299	Gvajacilgliceril tricīna atvasinājums (50)
8	1023, 525, 507, 329, 314, 299		Gvajacilgliceril tricīna atvasinājums
9	1193,999,867,703,525,507,341,329,314,299, 193		Tricīna – lignīna atvasinājums
10	683	683, 637, 507, 339, 193	Lignīna oligomērs (51)
11	507	477, 341	Lignīna oligomērs (52)
12	311	182	Lignīna oligomērs (53)
13	313	201, 171	9,10-dihidroksi-12-oleīnskābe (54)
14	628,325,311, 297, 267,183		Lignīna oligomērs
15	1136, 834, 441, 325, 297, 293, 183, 134		Lignīna oligomērs
16	833, 746, 485, 325, 297, 183		Lignīna oligomērs
17	477	179, 161, 155, 137, 135, 93	Digallil-šikimīnskābes atvasinājums (55)
18	281	281, 263	Oleīnskābe C18:1 (56)
19	381	381, 335, 117	7-Oksotetra kozānskābes atvasinājums (57)

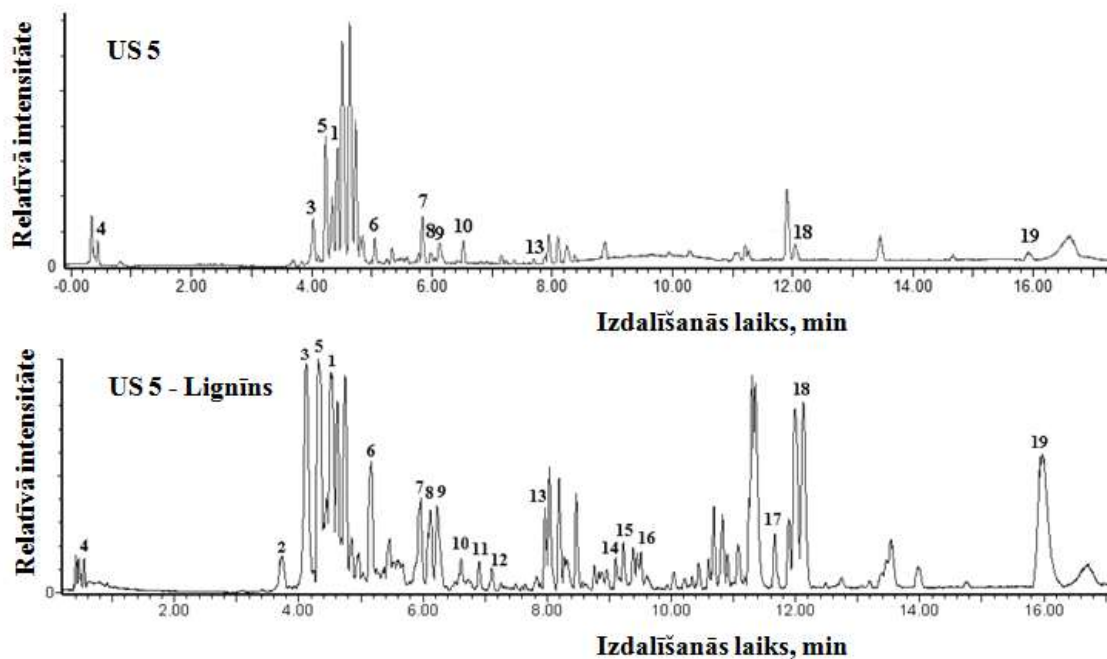
Pamatojoties uz literatūras datiem un masspektometrijas datu bāzi ir izveidotas iespējamās lignīna oligomēru ķīmiskās struktūras, kuras attēlotas 3.5. attēlā.



3.5.att. Lignīnu oligomēru piedāvātās struktūrformulas un citu raksturīgu identificēto savienojumu (skatīt 3.5. tabulu) struktūrformulas

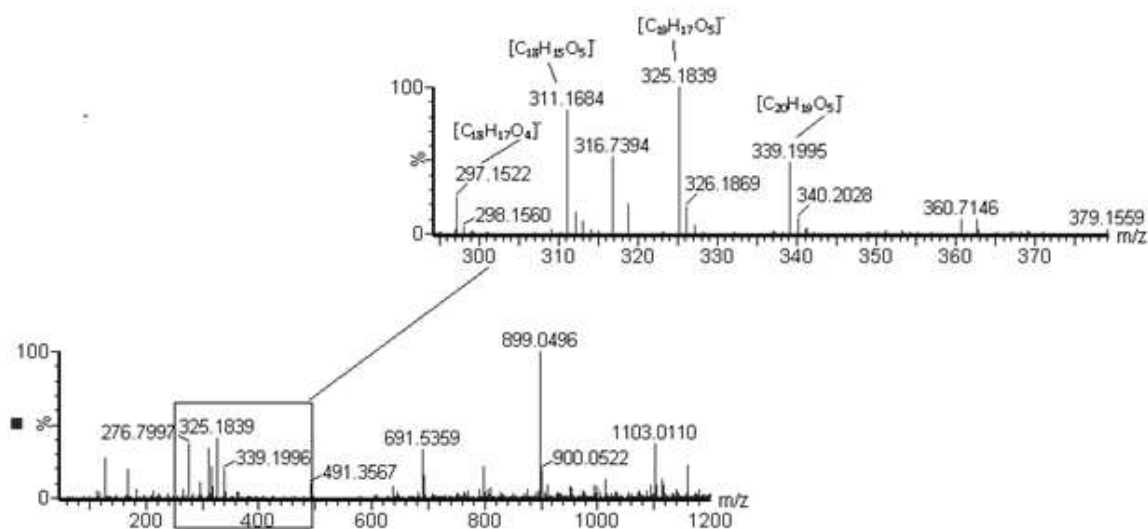
Izdalītā lignīna un kviešu salmu neapstrādātas frakcijas kopējie masspektri ar identificētajiem savienojumiem ir parādīti 3.6. attēlā. Hromatogrammas parāda, ka lignīni ir cieši saistīti ar sekundārajiem metabolītiem - flavonoīdu savienojumiem, to izdalīšanās secība un masspektri to apstiprina. Pēc izdalīšanās laika un raksturīgākajiem

fragmentjoniem ir iespējams veikt relatīvu savienojumu grupu klasifikāciju pirmie iznāk ogļhidratu atvasinājumi neatdaloties uz C18 kolonnas, tad fenolisko skābju un flavonoīdu atvasinājumi un pēc tam lignīna oligomērus saturošie savienojumi.



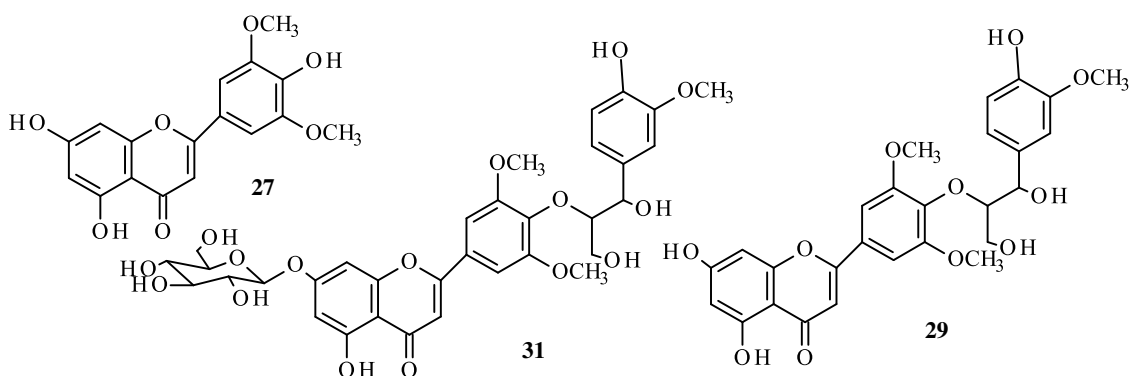
3.6.att. Kviešu salmu neapstrādātas lignīna saturošas frakcijas (US 5) un izdalītā lignīna (US 5-Lignīns) kopējie masspektri

Ir konstatēta polisharīdu saistība ar lignīna molekulām, identificējot tipiskos lignīna oligomēru fragmentus kopā ar ogļhidrātu fragmentiem (3.7. att.). Fragmentjoni ar m/z 169 un m/z 127 tiek asociēti ar heksozes molekulu fragmentāciju. Jons m/z 277 ir saistīts ar heksozes klasteriem. Jons m/z 325 saskaņā ar literatūru tiek identificēts kā trisaharīds, kas sastāv no heksozēm. Var secināt, ka jons m/z 899 ir polisaharīds, kura iespējamā formula ir heksoze-O-heksoze-O-heksoze-O-lignīna fragments.



3.7.att. Tipisks kviešu salmu lignocelulozes kompleksā identificēts lignīna un ogļhidrātu atvasinājumu mass spektrs

Tricīna atvasinājumu raksturojums parādīja, ka lielākā daļa tricīna ir savienota ar monolignoliem un ogļhidrātu fragmentiem. Starp provizoriski identificētajiem tricīna atvasinājumiem var minēt gvajacilgliceriltricīnu (**29**) un tricīn-4-O gvajacilglicerilēteri 7-O-glikopiranozi (**31**) (3.8. att.).



3.8.att. Kviešu salmu ekstraktos identificētā savienojumu tricīna (**27**) un tā raksturīgo atvasinājumu ķīmiskās struktūrformulas

Brīvs tricīns ievērojamā daudzumā tika identificēts tikai references paraugā (ASE, etanola ūdens ekstrakts). Citos ekstraktos tas galvenokārt bija savienots ar lignīna

fragmentiem, proti, dominējošais bija tricīn-4-O-gvajacil-glicerilēteris (variē līdz 20 % no ekstrakta) un tricīn-4-O-gvajacilglicerilēteris 7-O-glikopiranoze (variē līdz 12 % no ekstrakta).

Saskaņā ar puskvantitatīvās analīzes rezultātiem (LC, 280 nm), izmantojot tricīnu kā references savienojumu, tricīna atvasinājumu koncentrācija ekstraktos ir aptuveni 30 – 35 % no sausa bez pelnu parauga masas. Tricīna saturs tā atvasinājumos ir tikai 1-2 % no sausiem bez pelnu paraugiem (LC-MS, MRM skenēšanas režīms). Brīvs tricīns etanola ūdens ekstraktā, kas iegūts ar ASE, bija 0,6 % no sausa bezpelnu ekstrakta (3.6. tabula). Tricīns, kas galvenokārt ir zāles un labības augu sugās, ar β-O-4 saitēm tiek saistīts lignīna makromolekulās [109]. Tā rezultātā ekstrahējamais tricīns un tā atvasinājumi tika kvantitatīvi novērtēti bez modificēšanas, ir paredzams, ka kopējais tricīna daudzums būs ievērojami lielāks, jo iespējams visas tricīnu saturošās lignīna makromolekulas netiek sašķeltas līdz brīvam tricīnam. Literatūrā tiek ziņots, ka kviešu salmos ir gandrīz desmit reizes vairāk ar lignīnu integrēts tricīns nekā brīvais tricīns attiecīgi 4841 un 376 mg kg⁻¹ [177].

3.6. tabula

Tricīna saturs kviešu salmu šķidrās frakcijās (mg kg⁻¹)

Paraugs	Kopējais tricīna saturs ar masu < 1200 Da, mg tricīna · kg ⁻¹ parauga
Kviešu salmi, 60% EtOH ekstrakts [#]	7793
US 1	2503
US 2	2201
US 3	9739
US 4	4922
US 5	9850
US 6	9970

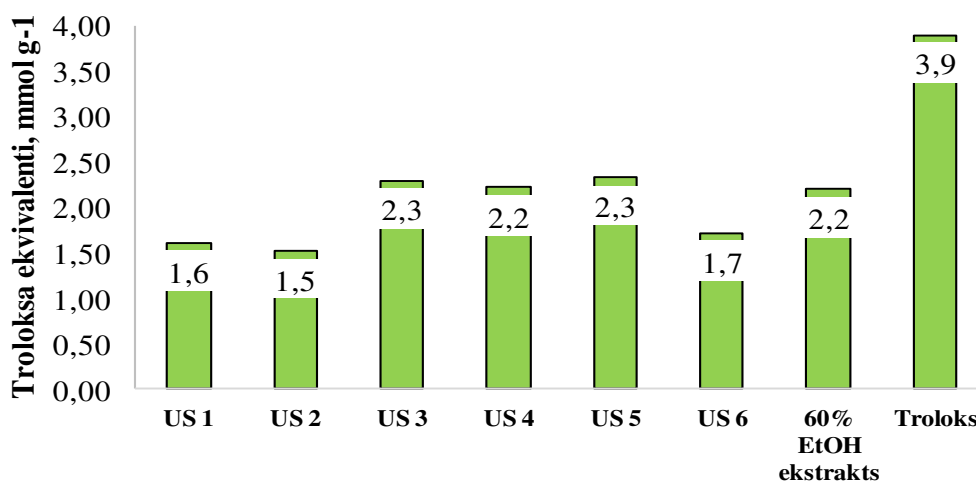
[#] Ekstrakts iegūts ar ASE

Vairāk nekā 50 savienojumi ekstraktos tika asociēti ar mazmolekulāriem lignīna fragmentiem, kas nesatur tricīnus, un tika provizoriski identificēti, izmantojot kā instrumentu ar augstas izšķirtspējas masas spektrometriju balstītu fragmentāciju (sekvencēšanu) un pašizveidotu datu bāzi, kas sastāv no 20 savienojumiem, kas modelē lignīna struktūras vienības (gvajakola), metilgvajakols, etilgvaijakols, propilgvaijakols, izoegenols, eugenols, vanilīns, acetovanilons, propiovanilons, homovanilskābe,

vanililmanmanskābe, vanilglikolskābe, ferulīnskābe, dihidroferulīnskābe, divanilīns, dipropiovanilons). Ir pierādīts, ka no lignīna atvasinātiem savienojumiem ar zemu molekulmasu ir augsta antioksidantā aktivitāte un tie ir perspektīvi dabiski antioksidanti, īpaši lipīdu sistēmās [178]. Tādā pašā nolūkā iespējams varētu izmantot arī šīs kviešu salmu lignīnu saturošās frakcijas.

3.5. Kviešu salmu lignīnu saturošās frakcijas kā dabiskie antioksidanti

No neapstrādātiem kviešu salmu ekstraktiem izgulsnētais lignīns parādīja tipisku salmu tehniskajiem lignīniem raksturīgu antioksidanto aktivitāti (3-4 Troloksa ekvivalenti, mmol g⁻¹ sausa bezpelnu parauga), kas ir tuvs specīgam antioksidantam par referenci izmantatam - ūdenī šķīstošajam E vitamīna analogam - Troloksam (3,9 Troloksa ekvivalenti, mmol g⁻¹ uz sausa bezpelnu paraugu). Kviešu salmu lignīna saturošo frakciju aktivitāte bija robežās no 1,5 līdz 2,3 troloksa ekvivalentu mmol · g⁻¹ uz sausiem pelnus nesaturošiem paraugiem (3.9. att.). Novērota vispārzināmā korelācija starp polifenola savienojumiem un antioksidanto aktivitāti, liecinot, ka šie savienojumi ir tās pamatā.

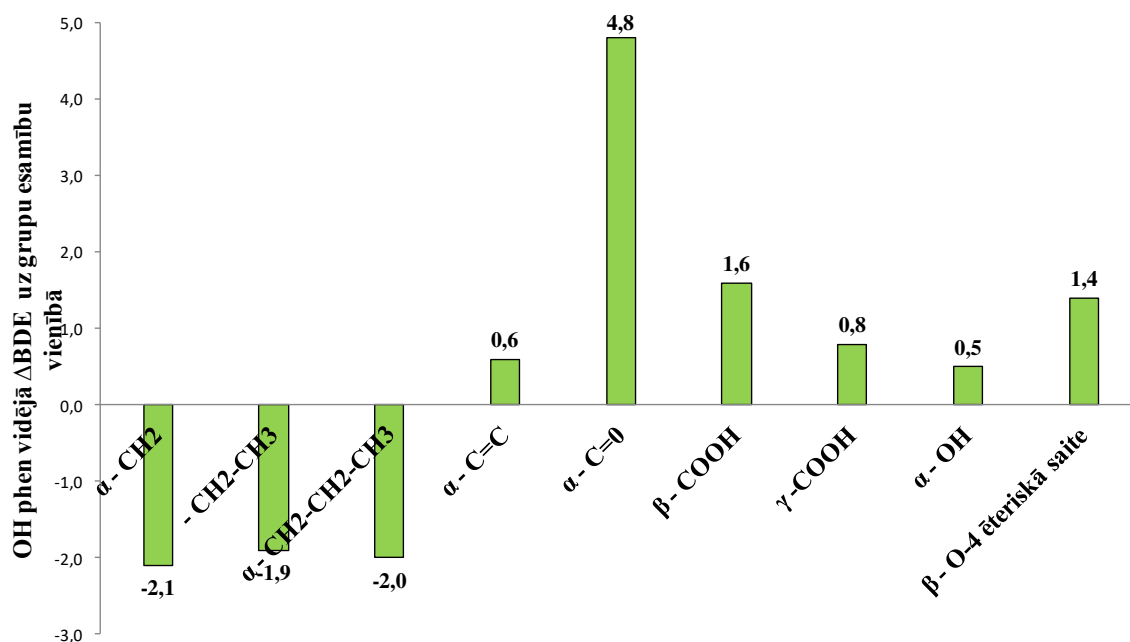


3.9. att. Antioksidantā aktivitāte kviešu salmu lignīna frakcijām un ekstraktam

Neapstrādāto ekstraktu un to frakciju augstā antioksidantā aktivitāte norāda, ka visiem ekstraktos esošiem savienojumiem, ieskaitot polifenolus, ir pozitīva ietekme uz šīs aktivitātes uzlabošanas. Zemas molekulmasas lignīna un tricīna un tā atvasinājumu apvienojums, kas atrodas vienā un tajā pašā ekstraktā, padara tos par perspektīvajiem

stipriem dabīgiem antioksidantiem, visvairāk piemērotiem lipīdu sistēmās, jo tricīns slikti šķīst ūdens šķīdumos.

Nemot vērā, ka lignīna struktūrai ir tieša saistība ar antioksidanto aktivitāti. Paralēli iegūto kviešu salmu frakciju antioksidantās aktivitātes noteikšanai un bioloģiski aktīvo savienojumu struktūras noskaidrošanai, tika iegūta kvantitatīva informācija par lignīna un radniecīgo fenolu struktūras-antioksidatīvas aktivitātes sakarībām (QSAR). Pašlaik trūkst informācijas, īpaši kvantitatīvas, par lignīna fenilpropāna vienību sāņķežu uzbūves un saišu tipu starp vienībām ietekmi uz lignīna produktu fenola OH grupu reaģētspēju ar antioksidatīvo aktivitāti saistītajās reakcijās. Lai novērtētu katra struktūras deskriptora tiešo ieguldījumu lignīna produktu antioksidatīvajā aktivitātē, ir aprēķinātas lignīna modeļvielu fenola O-H grupu BDE starpības (Δ BDE), kas ir saistītas ar noteiktas grupas vai saites klātbūtni (3.10. att.). Pozitīva BDE starpība nozīmē negatīvu ietekmi, negatīva Δ BDE nozīmē pozitīvu ietekmi.



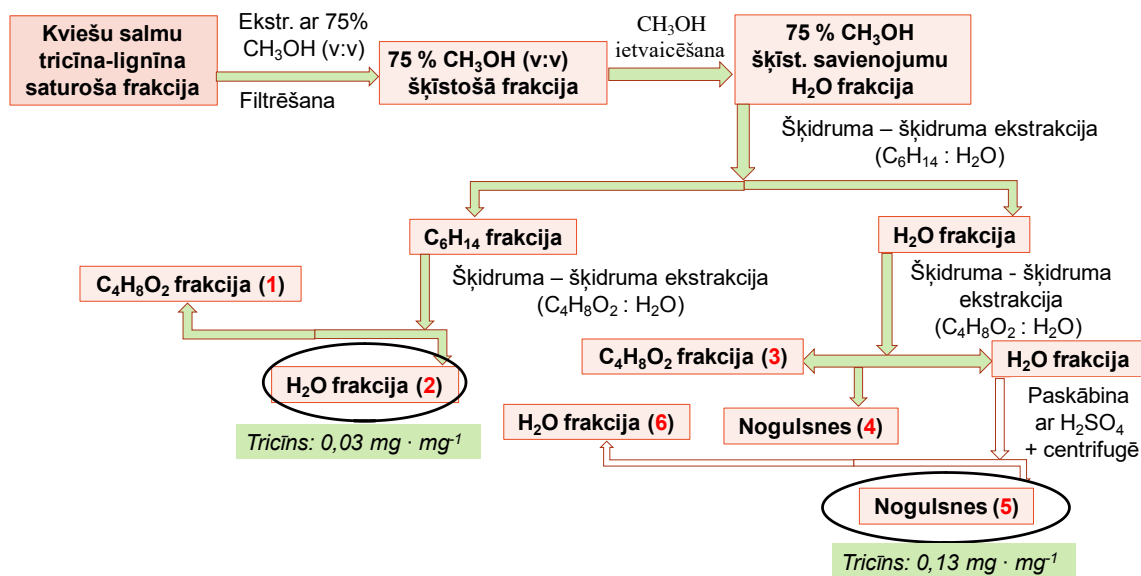
3.10. att. Lignīna struktūras deskriptoru ieguldījums tā antioksidantajā aktivitātē

α -karbonilgrupu klātbūtnē gandrīz pilnīgi deaktivē lignīna fenola hidroksilgrupas ar antioksidatīvo aktivitāti saistītajās reakcijās, arī citu skābekli saturošās grupas fenilpropāna vienību sāņķēdēs negatīvi ietekmē to antioksidatīvo aktivitāti.

Konkurētspējīgo antioksidantu uz lignīna bāzes iegūšanai ir nepieciešams veikt lignīna produktu mērķtiecīgu modifikāciju un palielināt fenilpropāna vienību ar piesātinātajam sāņķēdēm saturu.

3.6. Tricīna un tricīna-lignīnu kompleksu attīrīšana

Pamatojoties uz iegūtajiem rezultātiem, ir iespējams apspriest tricīna un tā atvasinājumiem bagātos ekstraktus, kas šobrīd ir blakusprodukti kviešu pārstrādē cukuru ieguvei, kā produktus ar pievienoto vērtību - dabiskos antioksidantus. Ņemot vērā vispārzināmo flavonoīdu, tai skaitā tricīna un tā atvasinājumu bioloģisko aktivitāti kopā ar lignīna oligomēriem kā spēcīgiem antioksidantiem, šo kompleksu ieguve koncentrētā veidā varētu būt ieguvums šo savienojumu izmantošanas jomu paplašināšanā, tai skaitā arī lauksaimniecības vajadzībām, jo pašlaik tie ir komerciāli nepieejami un iegūstami mazos apjomos. Tricīna un tā lignīna atvasinājumu izdalīšanas shēma ir parādīta 3.11. attēlā. Izmantojot šo shēmu iegūtas divas ar tricīna molekulām bagātas frakcijas.



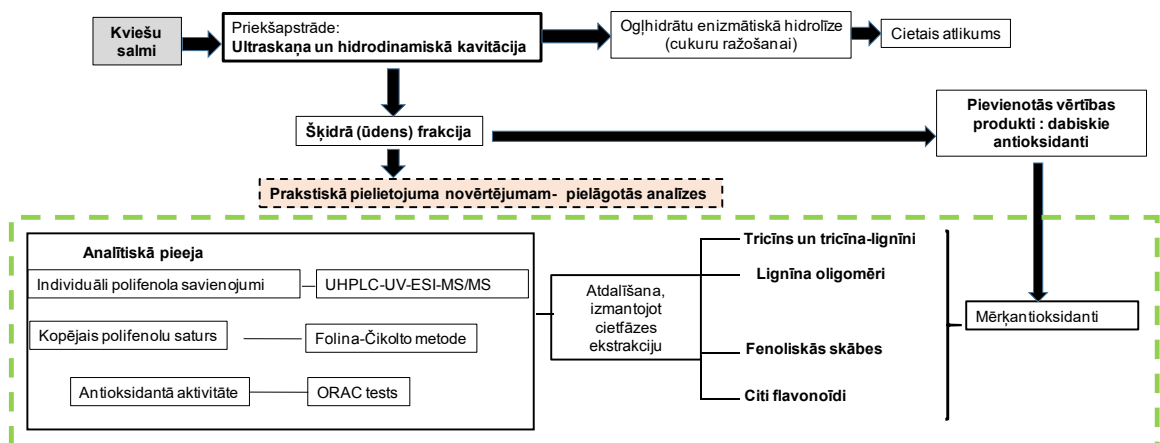
3.11. att. Tricīna un tā lignīna atvasinājumu attīrīšanas shēma

Tricīns un tā atvasinājumi koncentrējas 2. un 5. frakcijā. Tricīna saturošie savienojumi ir identificēti ar LC-MS/MS, un ir noteikts saistīto tricīna molekulu daudzums. Tas ir apmēram $0,03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 2 frakcijā un $0,13 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5 frakcijā.

3.7. Analītiskās pieejas izmantošana kviešu salmu raksturošanai kā bioloģiski aktīvo savienojumu avotam

Tricīns un tricīna-lignīni ir zināmi to bioloģiskās aktivitātes dēļ, īpaši to labvēlīgai ietekmei uz augu augšanu un to potenciālai farmaceitiskai nozīmībai (antioksidants, anti-novecošanās, pretvēža un kardioprotektīvais potenciāls). Ņemot vērā, ka rezultāti parādīja, ka gandrīz viss tricīns ir integrēts lignīnā, tad tīra tricīna attīrīšana nav iespējama, tādēļ piedāvāts tiek tricīna un tricīna lignīna savienojumu maisījums. Ir ziņots, ka tricīna atvasinājumi ir aktīvi mazā koncentrācijā, no tā var secināt, ka šos paraugus var uzskatīt par fitoķimikāliju ar pievienoto vērtību - tricīna-lignīnu avotu, bet attīrīšana ir kā rīks šo savienojumu aktivitātes pierādīšanai.

Piedāvātais ceļš, kā novērtēt kviešu salmu apstrādes atlikumus kā dabiskos antioksidantus, proti, kā tricīnu un tā atvasinājumu avotu, parādīts 3.12. attēlā redzamajā shēmā.



3.12. att. Tricīniem bagāto ekstraktu piedāvātā integrācija kviešu salmu pārstrādes shēmā, kas virzīta uz cukuru ražošanu

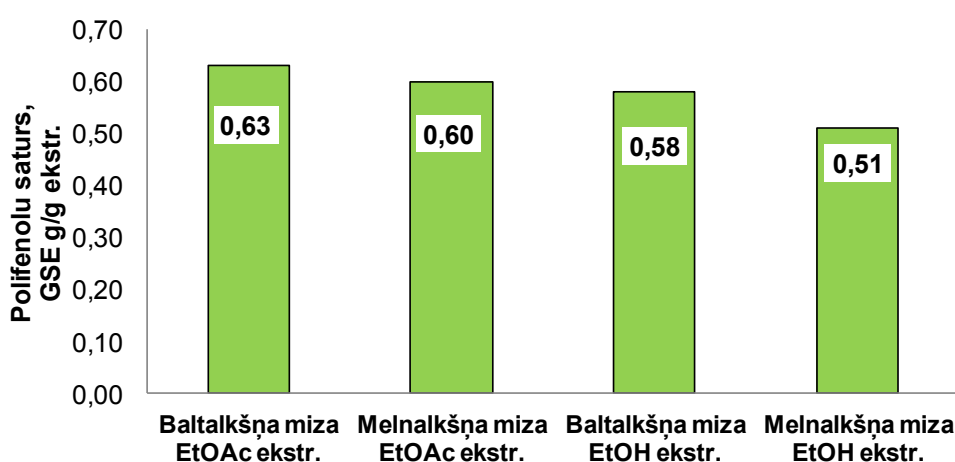
3.8. Baltalkšņa un melnalkšņa mizas ķīmiskās kompozīcijas analīze

Otrs nozīmīgs promocijas darba virziens bija jau bakalura darbā aizsāktie alkšņu mizas sekundāro metabolītu pētījumi. Bakalaura darbā tika izdalīts diarilheptanoīds oregonīns analītiskos daudzumos, veikta kā identifikācija ar NMR un masspektometriju, bet maģistra darbā kvalitatīvi un kvantitatīvi izpētītas alkšņu mizas lipofilās ekstraktvielas. Promocijas darbi pētījumi vērsti uz alkšņu diarilheptanoīdu savienojumu ķīmisko

raksturošanu, īpaši uz piemērotāko analīžu metožu izvēli un bioloģiskās aktivitātes pētījumiem. Promocijas darbā ir izmantotas dažādas modernas hromatogrāfijas metodes, veicot analīzes parametru pielāgošanu un iegūts pamatojums piemērotākās metodikas izvēlei, izveidots iegūtajos ekstraktos dominējošo individuālo savienojumu kvalitatīvās un kvantitatīvās noteikšanas protokols. Alkšņu mizas ekstraktiem izstrādāti vienoti principi dominējošā savienojuma diarilheptanoīda oregonīna noteikšanai (metodes validācija izmantojot UV detektoru, 280 nm). Oregonīna noteikšana ar validētu metodi, ir svarīga, novērtējot alkšņu mizas ekstraktu aktīvo savienojumu ķīmisko sastāvu, raksturojot ekstrakta bioloģisko efektivitāti un nekaitīgumu. Dominējošā alkšņu mizas diarilheptanoīda savienojuma oregonīna attīrīšanas metodikas pielāgošana lielākiem apjomiem un iegūtā oregonīna hromatogrāfiskās tīrības raksturošana veikta ar mērķi izpētīt tā bioloģiskās aktivitātes.

3.9. Alkšņu mizas hidrofilo ekstraktu kvalitatīvā un kvantitatīvā analīze ar UHPLC-TOF/MS

Vidēji alkšņu ekstrakti atkarībā no izdalīšanas veida un ievākšanas gada satur 0,4 līdz 0,6 GSE g/g polifenolu savienojumus (3.13.att.), salīdzinot ar literatūras, tas atbilst vidēji Eiropā augošu alkšņu hidrofilajos ekstraktos noteiktam polifenolu savienojumu saturam, jāņem gan vērā, ka to saturs ir atkarīgs no Folina – Čikolto metodē izmantotā standarta.



3.13. att. Alkšņu mizas kopējais polifenolu savienojumu saturs ekstraktos

Piemēram Bosnijas un hercogovinas teritorijā augošos alkšņos kopējais polifenolu saturs ir apmēram 0,3 līdz 0,8 g CAT g⁻¹ atkarībā no alkšņu sugas un morfoloģiskās daļas [179].

Izmantojot augstas izšķirtspējas masspektometriju, tās datu bāzi un literatūras datus kopumā alkšņu mizās un šķeldā identificēti 24 dažādi individuāli savienojumi, tai skaitā 19 pirmo reizi Latvijā augošos alkšņos, noteikta arī līdz šim neidentificēto savienojumu ķīmisko savienojumu grupu piederība, kā ogļhidrāti, flavonoīdu un organisko skābju atvasinājumi. Nepārprotamu savienojumu identifikāciju, alkšņu gadījumā ar uzsvāru uz tiem raksturīgiem savienojumiem - diarilheptanoīdiem, var iegūt interpretējot augstas izšķirtspējas tandēma vai multi pakāpju MS analizēs iegūtos spektrus [180]. Ir literatūras dati par alkšņu mizas sekundāro metabolītu kvalitatīvo un kvantitatīvo noteikšanu citviet pasaulē, ieskaitot pētījumus, kas veikti, izmantojot hromatogrāfiju - masas spektometriju. Tomēr mērenā klimatiskajā zonā augošo alkšņu bioaktīvo savienojumu detalizēts apraksts, iekļaujot to identifikāciju un kvantifikāciju vēl nav publicēts. Pētījumi ir nepieciešami, lai nodrošinātu augu materiāla autentiskumu un to saturošo produktu ķīmiskā sastāva kontroli, kurus var iegūt no šajā reģionā augošām koku mizām. Savienojumu masspektrometriskai analīzei promocijas darbā izmantots negatīvās jonizācijas režīms, jo priekšizpētes eksperimenti šajā režīmā parādīja augstāku signāla intensitāti un labāku smaiļu izšķirtspēju. Ir zināms, ka alkšņiem ir raksturīgi diarilheptanoīdu savienojumi [72], tādēļ šai savienojumu grupai identifikācijas procesā tika pievērsta īpaša vērība. Ekstraktos identificēti pavisam divpadsmit dažādi diarilheptanoīdi. Savienojums **32** ir identificēts kā hirsutenona heksozīds. Iepriekš alkšņos nav identificēts, bet tā aglikons hirsutenons ir zināms kā sastāvdaļa dažādiem *Alnus* sugas augiem [55]. Deprotonētais molekulārais jons [M-H]⁻ tika detektēts pie m/z 507,1870 un tas deva intensīvus produktu jonus pie m/z 327 (neitrāls zaudējums 180 amu attiecas uz heksozes cukura vienību) [181] un raksturīgus fragmentjonus pie m/z 205 un 121 norādot uz hirsutenonu [72]. Savienojumi **33** un **34** tika identificēti kā 1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-3-hidroksiheptāns-5-O-β-D-ksilopiranozīds vai hidroksioregonīns un oregonīns. Oregonīna hromatogrāfiskās un spektrālās īpašības bija identiskas ar tā komerciāli pieejamā analītiskā standarta spektru īpašībām, hidroksioregonīns tika identificēts, izmantojot laboratorijā iegūto tā standartvielu, kuras identitāte ir pierādīta ar NMR un masspektometriju [182]. Savienojuma **35** deprotonētais

molekulārais jons $[M-H]^-$ tika konstatēts pie m/z 345,1362, parādot raksturīgus fragment jonus pie m/z 165 un 691 (divu hirsutanonola molekulu klasteris)[67], identificēts kā hirsutanonols. Savienojums **36** parāda molekulāro jonu ar m/z : 463,1978 $[M-H]^-$. MS dati parādīja fragmentu signālus pie m/z : 331 ($[Aglīkons-H]^-$ jons, 132 Da (pentozes daļas zaudējums)) un 313 ($[Aglīkons-H_2O-H]^-$ jons). Pamatojoties uz to, ka rubranola ksilozīds ir sastopams starp *Betulaceae* augiem[183], savienojums **37** tika identificēts kā 1,7-bis (3,4-dihidroksifenil) -3-heptanil-ksilopiranozīds (rubranola ksilozīds). Savienojums **38** tika identificēts kā akeozīds VII, uzrādot raksturīgo molekulāro jonu $[M-H]^-$ pie m/z 461,1813 un fragmentus pie m/z 311 un m/z 189. Savienojums **39** ar molekulmasu 462 ($[M-H]^-$ pie m/z 461,1777) un deva fragmentjonus pie m/z 311 un m/z 205, un saskaņā ar literatūru par alkšņos identificētiem diarilheptanoīdiem tas tika identificēts kā 1- (4-hidroksifenil) -7-(3,4-dihidroksifenil) heptān-3-ons-5-O-pentozīds. Savienojums **40** tika identificēts kā platofilozīds ($[M-H]^-$ - pie m/z 475,1947), izmantojot laboratorijas standartvielu, kas iepriekš izdalīta no *Betula pendula* mizas un struktūra apstiprināta ar NMR. Savienojums **41** tika identificēts kā rubranols C ar deprotonētu molekulāro jonu $[M-H]^-$ pie m/z 625,2496 un raksturīgiem fragmentjoniem pie m/z 493 un m/z 373, kas atbilst pentozes un heksozes zaudējumam un rubranola aglikona joniem pie m/z 331 un m/z 313 $[aglikons-H]^-$ un $[aglikons-H_2O-H]^-$ attiecīgi. Savienojums **42** tika identificēts kā rubranozīds A, parādot $[M-H]^-$ pie m/z 493,2060 un tipiskus fragmentjonus pie m/z 331 m/z 313 un m/z 987 (divu molekulu klasteris). Molekulārais jons pie m/z 593,2615 un fragmentjoni pie m/z 299 ($[aglikons-H]^-$), m/z 461 (pentozes zudums 132 Da) un m/z 1187 savienojumā **43** tika saistīti ar akeozīdu VIII. Savienojums **44** ar molekulāro jonu ($[M-H]^-$ pie m/z 327,1165) tika identificēts kā hirsutenons, parādot tā tipiskos fragmentjonus pie m/z 205 (hirsutenona aglikons) un m/z 121.

Individuālu savienojumu raksturojums alkšņu mizas ekstraktos, izmantojot LC-ESI-TOF/MS

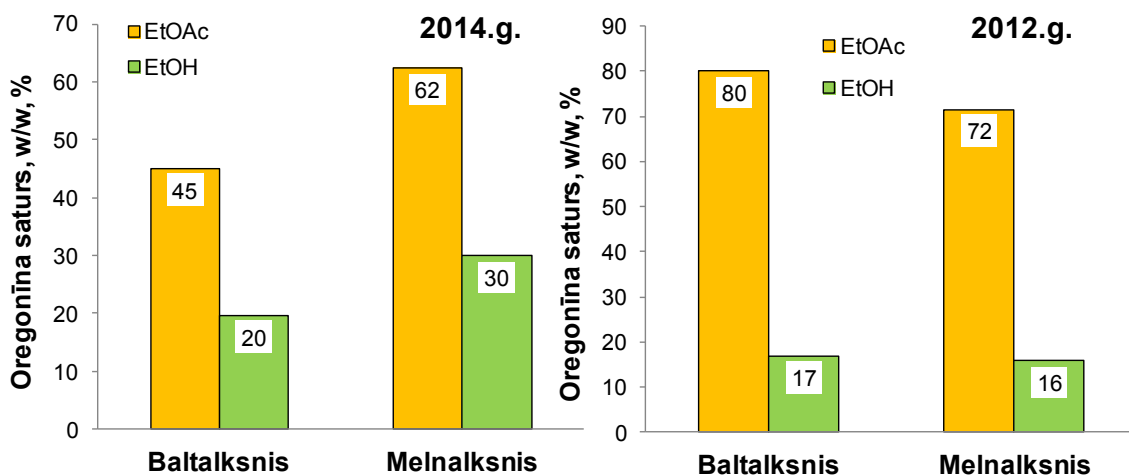
Smaile	Izdal. laiks, (min)	[M-H] ⁺ (m/z)	Fragmentjoni (m/z)	Provizoriskā identifikācija	Savienojumu ķīmiskā grupa	Esamība ekstraktos			
						BA EtOAc	BA 60% EtOH	MA EtOAc	MA 60% EtOH
1	3,83	507,1870	327; 205; 121; 1015	Hirsutenona heksozīds (32)	Diarilheptanoīdi	x	x	x	x
2	4,01	479,1939	347;193; 959	Hidroksioregonīns (33)		x	x	x	-
3	4,30	477,1773	327; 205; 955	Oregonīns (34)		x	x	x	x
4	4,87	345,1362	165; 691	Hirsutanonols (35)		x	-	x	x
5	5,16	463,1933	331; 313	Rubranola ksilozīds (36)		x	-	-	-
6	5,43	461,1783	311;189	Akerozīds VII (37)		x	x	x	-
7	5,57	461,1777	311; 205	1- (4-hidroksifenil) -7- (3,4-dihidroksifenil) heptān-3-ons-5-O-pentozīds (38)		x	x	x	-
8	5,86	475,1947	295; 950	Platofilozīds (39)		x	x	x	-
9	6,03	625,2496	493; 373; 331; 313	Rubranols C (40)		x	x	x	x
10	6,36	493,2060	331; 313; 987	Rubranozīds A (41)		x	x	x	x
11	6,61	593,2615	461; 299; 1187	Akerozīds VIII (42)		x	x	x	-
12	6,85	327,1165	205; 121	Hirsutenons (43)		x	x	x	x
14	1,70	577,1370	245; 289; 407; 451	Procianidīna B –tipa dimērs (44)	Proantocianidīni	x	x	x	x
15	1,91	865,1983	577; 407; 287; 245	Procianidīna B –tipa trimērs (45)		-	x	x	x
16	1,97	1153,2623	865, 863, 577, 243	Procianidīna B –tipa tetramērs (46)		-	x	-	x
17	3,09	729,1499	577; 559; 289; 287	Epikatehīna- epikatehīna – O – gallāts (47)		-	x	-	x
18	3,73	441,1756	289; 245	Epikatehīna- gallāts (48)		-	x	-	x
19	3,11	289,0715	245; 205; 179; 137	Epikatehīns (49)	Flavonoīdi	x	-	x	-
20	1,42	337,0940	163; 191; 675	Kumarilhinīnskābe (50)	Organiskās skābes	x	x	-	-
21	0,17	341,1093	683; 1025	3-glikopiranosiloksi-1-(4-hidroksifenil)-butanons (51)	Fenilbutanoni	-	x	-	x

Kopā ar diarilheptanoīdiem alkšņu mizās kā otra no dominējošām savienojumu grupām ir noteikti proantociānīdīni [184], promocijas darbā ir identificēti procianidīni: B-tipa dimērs ar molekulāro jonu pie m/z 577 un tam pēc literatūras [185] raksturīgiem fragmentjoniem m/z 245, m/z 289 (3.7. tabula), procianidīna B –tipa trimērs $[M-H]^-$ 865 ar fragmentjoniem pie m/z 577, m/z 287, 245, procianidīna B–tipa tetramērs ar molekulāro jonu pie m/z 1153 ar fragmentjoniem m/z 865, m/z 863, m/z 577, m/z 243, ekstraktos tika identificēts epikatehīns, apstiprināts izmantojot komerciāli pieejamo standartu. Identificēti pēc literatūrā [186] ziņotiem masspektru joniem arī gallokatehīna saturoši tanīnu savienojumi kā epikatehīna- epikatehīna – O – gallāts ($[M-H]^-$ 729) un epikatehīna gallāts ($[M-H]^-$ 441). Citi identificētie savienojumi ir kumarilhinīnskābe ($[M-H]^-$ m/z 337) [185] un 3-glikopiranosiloksi-1-(4-hidroksifenil)-butanons ($[M-H]^-$ m/z 341) [185].

Individuālu polifenola savienojumu raksturojums veikts interpretējot savienojumu hromatogrammas pie 280 nm un to attiecīgos masspektus, absorbcija pie 280 nm lielāko daļu ir dēļ polifenola savienojumos esošiem benzola cikliem.

3.10. Oregonīna noteikšana alkšņu mizas hidrofilajos ekstraktos

Diarilheptanoīdi kā vieni no raksturīgākiem savienojumiem Latvijā augošo alkšņu mizu ekstraktos tika konstatēti jau 2005-2009. gadā KĶI veiktajos pētījumos [187]. Tādēļ mani pētījumi tika vērsti tieši uz šo savienojumu klasi – individuālu diarilheptanoīdu identifikāciju un to ķīmisko raksturojumu, analīžu metožu pielāgošanu tieši šai klasei. Dominējošais diarilheptanoīds visos ekstraktos tika noteikts oregonīns. Tādēļ tieši oregonīnam tika izvēlētas, testētas un pielāgotas dažādas analīzes metodikas. Sākumā līdz 2015. gadam oregonīns tika galvenokārt kvantificēts izmantojot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju pie viļņa garuma 280 nm, pierādot oregonīnu kā vienu no dominējošiem savienojumiem ekstraktos (3.14. att.), metodika tika pielāgota mana bakalaura darba ietvaros un izmantota promocijas darba izstrādei līdz 2015. gadam. Attīstoties metožu pieejamībai un savienojumu noteikšanas jutībai promocijas darbā tika pielāgota metodika oregonīna noteikšanai ar ultraefektīvo šķidrums hromatogrāfiju ar dažādiem detektoriem.



3.14. att. Oregonīna saturs alkšņu mizas hidrofilajos ekstraktos

Oregonīna noteikšanas metodei ar UHPLC hromatogrāfisko sistēmu veikta validācija saskaņā ar ASV Pārtikas un zāļu pārvaldes (FDA) vadlīnijām. Metode tālāk izmantota oregonīna un citu diarilheptanoīdu saturošu alkšņu mizas ekstraktu individuālu savienojumu raksturošanai. Izveidotā metode tika validēta uz sekojošiem parametriem - selektivitāte, linearitāte, atgūstamība un precizitāte, kā arī noteikta detektēšanas un kvantificēšanas robeža. Validācijas mērķis bija novērtēt analīzes metodes piemērotību oregonīna noteikšanai alkšņu mizas ekstraktos. Oregonīna $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ šķīduma absorbcija tika uzņemta ar UV spektrofotometru apgalā 200-800 nm. Acetonitrils vai metanols tika izmantoti kā tukšie references paraugi. Kā maksimālais oregonīna absorbcijas viļņa garums tika apstiprināts 280 nm.

Izmantotā metode ir lineāra oregonīna koncentrācijas diapazonā $10\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ar korelācijas koeficientu vērtību 0,99. Sistēmas stabilitātes tests parādīja, ka relatīvā standartnovirzes (RSD) vērtības izteiktas procentos (%), iegūtas no oregonīna izdalīšanās laika un joslas laukuma, ir mazākas par 2 %, kas norāda uz nelielu izmērīto vērtību variāciju un augstu precizitāti [188]. Šis pētījums ir pirmais, kas piedāvā validētu apgrieztās fāzes UPLC metodi oregonīna kvantificēšanai alkšņu mizas ekstraktos. Kalibrēšanas taisne parādīja lineāru attiecību starp smailes laukumu un koncentrāciju apgalā $10\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ar korelācijas koeficientu (R^2) vērtību 0,99. Arī izdalīšanās laiku un joslu laukumu signālu relatīvās standartnovirzes ir mazākas par 2 %, parādot metodes piemērotību (3.8.tabula).

3.8.tabula

Sistēmas piemērotība oregonīna noteikšanai, (n=6)

Injekcijas Nr.	Izdalīšanās laiks, min	Signāls
1	3,70	3267
2	3,71	3184
3	3,68	3150
4	3,69	3226
5	3,70	3133
6	3,68	3201
Vidēji	3,69	3194
% RSD	0,34	1,55

Trīs dažādu oregonīna koncentrāciju pievienošana parādīja, ka atgūstamības vērtības ir ap 101 %, kas ir ļoti tuvu teorētiskai vērtībai un liecina par pieņemamu metodes precizitāti (3.9. tabula).

3.9.tabula

Oregonīna atgūstamības noteikšana

Pievienotā oregonīna koncentrācija ekstraktam ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Kopējā oregonīna koncentrācija ekstraktā, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ekspierimentāli noteiktā oregonīna koncentrācija ekstraktā, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Atgūstamība (%)	Vidējā atgūstamība (%)
0	45,26	44,99	99,4	100,6
10	55,26	55,01	99,6	
40	85,26	87,04	102,1	
80	125,26	126,96	101,4	

Nozīmīgas parametru izmaiņas netika novērotas arī precizitātes mērījumos vienas dienas un dažādās dienās uzņemtiem un pagatavotiem oregonīna šķīdumiem (3.10. tabula).

3.10. tabula

Vienas dienas un citā dienā analizētu oregonīna paraugu precizitāte (n=3)

	Dienas laikā				Citā dienā			
	Izdalīšanās laiks, min		Signāls, Rel.v.		Izdalīšanās laiks, min		Signāls, Rel.v.	
Oregonīna konc., ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Vidējā vērtība	% RSD	Vidējais laukums	% RSD	Vidējā vērtība	% RSD	Vidējais laukums	% RSD
18,4	3,67	0,35	1177,57	1,49	3,68	0,41	1185,39	1,45
36,8	3,69	0,49	2187,29	1,32	3,69	0,49	2152,21	1,56
73,6	3,68	0,56	4418,97	1,01	3,69	0,53	4199,57	0,96
92,0	3,68	0,41	5715,13	0,97	3,67	0,46	5603,63	1,12
Ekstrakts	3,69	0,55	2907,54	1,14	3,69	0,39	3066,59	1,03

Aprēķinātās LOD ($0,51 \mu\text{g g}^{-1}$) un LOQ ($1,29 \mu\text{g g}^{-1}$) vērtības bija zemākas par mazāko analizēto koncentrācijas līmeni ($0,7 \mu\text{g g}^{-1}$). Tika iegūta lineāra korelācija ($R^2 > 0,998$) starp smailes laukumu un oregonīna standartšķīdumu koncentrāciju diapazonā no 260 līdz $2800 \mu\text{g mL}^{-1}$. Vidējā oregonīna atgūstamība bija $100 \pm 11 \%$.

Oregonīna saturs noteikts arī izmantojot citas hromatogrāfiskās detektēšanas sistēmas – masspektrometriskās (MRM, SIR režīmi) un gaismas izkliedes detektoru (3.11. tabula). Neskatoties uz šo metožu dažādiem detektēšanas principiem oregonīna noteiktais saturs ekstraktos ir savstarpēji salīdzinājums izmantojot visas šīs metodes.

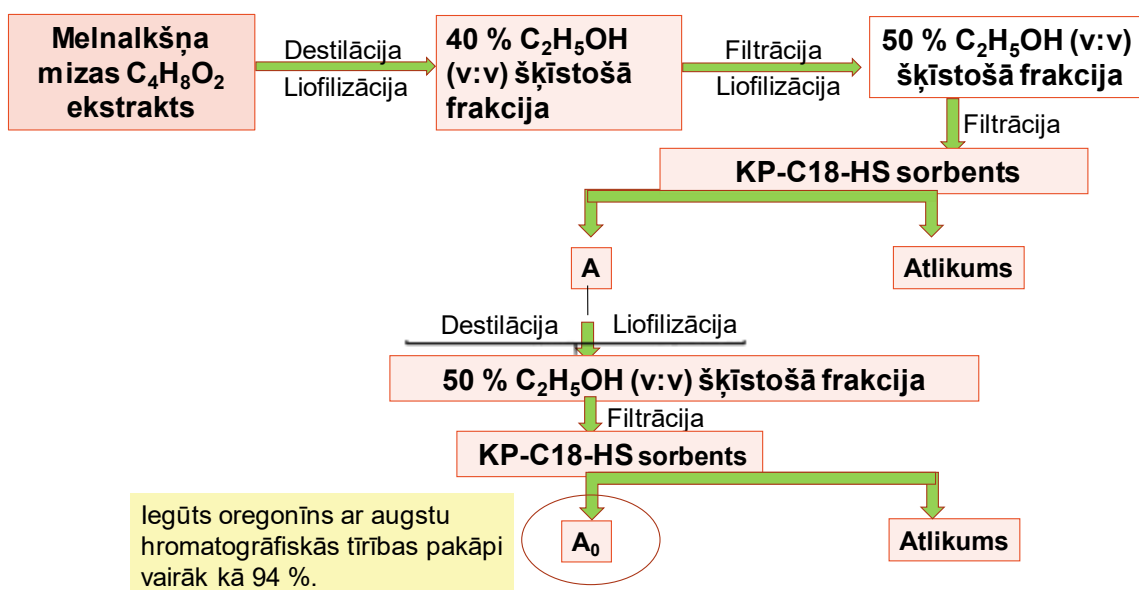
3.11. tabula

Alkšņu mizas diarilheptanoīdu saturošo ekstraktu hromatogrāfisko joslu laukumi un oregonīna saturs tajos (% uz a.s. ekstraktu), noteikšana ar dažādiem detektoriem

Ekstrakts	Vidējais joslas augstums, Rel.v.			Oregonīna saturs ekstraktos, %		
	MRM	280nm	SIR	MRM	280nm	SIR
Etilacetāta ekstrakts						
BA	74665	7466502	531389	46	43	46
MA	83267	83267	625923	60	64	63
Etilspirta ūdens ekstrakts						
BA	68716	1909	381112	21	20	18
MA	77815	2325	455773	29	31	30

3.11. Oregonīna attīrīšana no melnalkšņa mizas

Oregonīna attīrīšanas procedūras izveide tika aizsākta maģistra darba izstrādes laikā, pierādot, ka melnalkšņa mizas ekstrakts, lai gan ar nedaudz mazāku oregonīna saturu nekā baltalkšņa mizas ekstrakts, tomēr ir piemērotāks oregonīna ieguvei attīrītā veidā, iegūstot dominējošo alkšņu mizas diarilheptanoīda savienojumu – oregonīnu ar mazāku attīrīšanas ciklu skaitu un hromatogrāfisko tīrību. Šajā promocijas darbā ir veikta oregonīna attīrīšanas procedūras mērogošana no FLASH kolonnas uz SNAP. Ir iegūts oregonīns ar augstāku hromatogrāfiskās tīrības pakāpi nekā tas bija izmantojot FLASH kolonnu un iegūts pietiekams daudzums bioloģiskiem pētījumiem. Oregonīna attīrīšanai ir izveidota blokshēma, kura parāda visus attīrīšanas procesa etapus (3.15. attēls).



3.15. att. Alkšņu mizas diarilheptanoīda oregonīna attīrīšanas shēma

Diarilheptanoīda oregonīna saturs ar preparatīvo hromatogrāfiju iegūtajās frakcijās ir parādīts 3.12. tabulā. Iegūtās frakcijas pirms oregonīna noteikšanas tika liofilizētas un uzglabātas saldētavā, jo kā zināms oregonīna savienojums augstās ķīmiskās aktivitātes dēļ nav stabils brīvā veidā un pastāv risks tā ķīmiskai degradācijai.

3.12. tabula

Oregonīna saturs alkšņu mizas etilacetāta ekstraktā un no tā iegūtajās frakcijās

Frakcija	Oregonīna saturs, %
MA EtOAc ekstrakts	0,72±0,05
A	0,86±0,05
Atlikumi	0,15±0,03
A ₀	0,94±0,04
Atlikumi	0,11±0,03

Ar preparatīvo hromatogrāfiju iegūts oregonīns ar augstu hromatogrāfiskās tīrības pakāpi vairāk kā 94 %. Bioloģiskās aktivitātes pētījumos izmantots attīrīts oregonīns ar tīrības pakāpi virs 90% (LC-UV-MS), un piemaisījumiem 5 % 1,7-bis- (3,4-dihidroksifenil)-3-hidroksiheptāna-5-O-β-D-ksilopiranozīda un 4 % hirsutanolola. Oregonīna identifikāciju un tīrības pakāpi noteica, izmantojot UPLC-PDA-MS/MS un

NMR metodes. Attīrītā oregonīna kvalitāte novērtēta, salīdzinot to ar komerciāli pieejamo oregonīna analītisko standartu ($\geq 95\%$ (LC/MS-ELSD)).

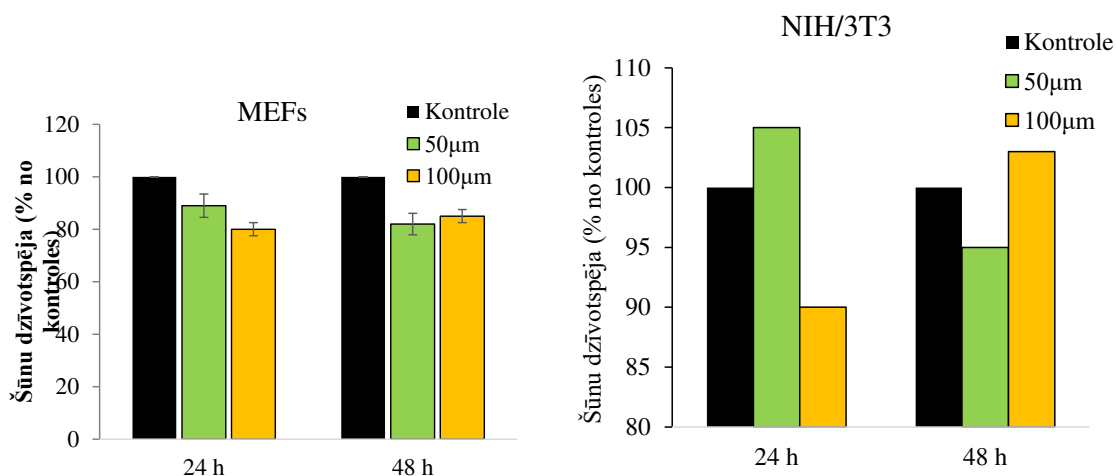
Iegūtais diariheptanoīds oregonīns tiek izmantots kā LC standarts šī savienojuma kvantitatīvai noteikšanai, kā arī to īpašību pētīšanai, īpaši lai novērtētu bioloģisko aktivitāti gan tam esot ekstraktos, gan arī attīrītā veidā.

3.12. Oregonīna - Latvijā augošo alkšņu dominējošā diariheptanoīda bioloģiskā aktivitāte

Promocijas darba izstrādes gaitā attīrītā oregonīna un tā saturošo ekstraktu bioloģiskās aktivitātes pētījumi veikti sadarbībā ar RSU Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedru, Bulgārijas reproduktīvās bioloģijas un imunoloģijas institūtu, kā arī Francijas valsts agronomijas institūta (INRA) Klermontas Overņa-Rona-Alpu zinātniskā centra Cilvēku uztura katedru.

Līdz šim oregonīnam no Latvijā augošiem alkšņiem ir pierādītas ievērojamas antioksidantās un pretiekaisuma īpašības, tas kavē adipoģenēzi un to var izmantot aptaukošanās un ar to saistīto metabolisma traucējumu profilaksei [88,189]. Papildus šīm īpašībām promocijas darbā iegūtam oregonīnam ir veikts ietekmes novērtējums epiģenētiskam regulējumam šūnās, kā arī tā spēja modulēt DNS metilējošo enzīmu ekspresiju un mitohondriju DNS (mtDNS) kopijas.

Peļu embrionālie fibroblasti (MEFs) tika apstrādāti ar oregonīnu 48 h un salīdzinot tos ar neapstrādātiem tika novērotas apoptotiskas morfoloģijas šūnu izmaiņas. Attēlā ir parādīts oregonīna potenciāls samazināt šūnu dzīvostpēju fibroplastos, pēc 24 h apstrādes ar 100mM oregonīna šķīdumu šūnu dzīvostpēja tika samazināta par aptuveni 18%, pēc 48h tā samazinājās vēl par 16%, oregonīns inhibēja NIH/3T3 šūnu augšanu (3.16. att.).

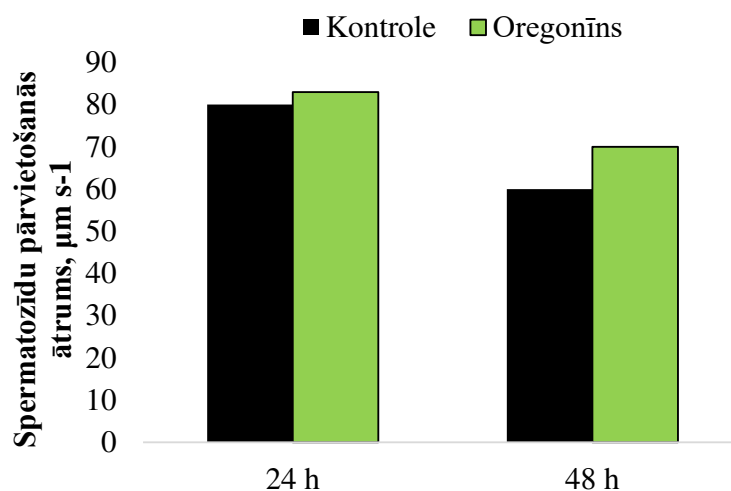


3.16. att. Oregonīna (50 mM un 100 mM šķīduma) ietekme uz MEFs an NIH/3T3 šūnu dzīvotspēju

Ar oregonīnu apstrādātajās MEF un NIH/3T3 šūnās tika konstatēts ievērojams mtDNA kopiju skaita pieaugums. Vislielākais efekts tika novērots MEFs inkubācijā ar 100 mM oregonīna šķīdumu (pieaugums 3,37 reizes). 50 mM un 100mM oregonīna šķīdums palielināja mtDNA kopiju skaitu NIH/3T3 šūnās attiecīgi 0,17 un 0,39 reizes. Pētījums ir publicēts [88] un pierādīja oregonīna spēju izmainīt epģenētiskas iezīmes, kas saistītas ar DNA metilēšanu.

Otrs nozīmīgs bioloģiskās aktivitātes pētījums ir oregonīna ietekme uz dzīvnieku spermas kvalitāti. Mērķis bija noteikt dažādu dozu ietekmi uz aunu spermas kvalitāti.

Spermas koncentrācija tika pielāgota līdz 20×10^6 šūnām uz mililitru atšķaidot to ar komerciāli pieejamo šim nolūkam paredzēto Triladyl līdzekli, šis paraugs tika izmantots kā kontroles paraugs un daļai šo spermas paraugu tika pievienots oregonīna šķīdums dažādās koncentrācijās (100 µM, 200 µM, 500 µM un 5 mM). Uzglabājot no 0 līdz 6 stundām ar oregonīnu apstrādātajos paraugos salīdzinājumā ar kontroli spermotizīdu kustīgums palielinājās par 4% (100 µM) un 6% (500 µM un 5 mM). Pēc 2 h uzglabāšanas spermotizīdu pārvietošanās ātrums (VCL) palielinājās attiecīgi par 9,1% (100 µM) un 6,7% (500 µM un 5 mM) un par 4,3% (100 µM) un 2,7% (500 µM un 5 mM), izmaiņas parādītas 3.17. attēlā.



3.17. att. Kopējo spermatozoīdu VCL 24. un 48. uzglabāšanas stundā 5 °C temperatūrā ar 100 μM oregonīna šķīdumu, * - p <0,05

Plazmas membrānas integritāte eksperimentālajos paraugos bija vidēji par 17% augstāka, salīdzinot ar kontroles paraugiem pēc 6 stundām ($p < 0,05$). Dabīgais antioksidants oregonīns mikromolu devās uzlaboja auna spermatozoīdu kinemātiskās īpašības, negatīvi neietekmējot to morfoloģiju. In vivo auglības tests parādīja, ka paraugiem ir saglabājusies spermatozoīdu apaugļošanas spēja. 20. Dienā pēc mākslīgās apsēklošanas grūtniecības iestāšanās ātrums kontroles un eksperimentālās grupās bija attiecīgi 80% un 60%.

Ievērojams kustīgo spermatozoīdu procentuālais samazinājums no 0 līdz 48 stundām tika reģistrēts kontroles paraugos, bet ar oregonīnu apstrādātajos paraugos šis parametrs bija tuvu sākotnēji noteiktajam. Rezultāti izvērstā veidā ir publicēti [148]. Kopumā šis pētījums ir devis inovatīvus datus par oregonīna labvēlīgo ietekmi uz spermas kvalitāti, vienlaicīgi uzlabojot arī apaugļošanas spēju.

Melnalkšņa un baltalkšņa oregonīnu saturošie ekstrakti konsekventi visos lipāzes funkcijas *in vitro* tests parādīja, ka tie ir spēcīgi aizkuņģa dziedzera lipāzes aktivatori. Lai arī abu ekstraktu reakcijas bija ievērojamas, melnalkšņa ekstrakts parādīja vidēju aktivitāti ($12\% \pm 1\%$) salīdzinājumā ar baltalkšņa pH izmaiņām ($15\% \pm 1\%$) un vairāk fermentatīvos produktus, salīdzinot ar kontroles grupu. Abu alkšņu ekstraktu ievērojamā

ietekme uz aizkuņģa dziedzera lipāzes aktivitāti var būt noderīga aizkuņģa dziedzera lipāzes aktivizēšanai pacientiem ar hronisku pankreatītu, malabsorbcijas sindromu un jebkādiem aizkuņģa dziedzera darbības traucējumiem.

Par oregonīna jaunu bioloģisko aktivitāšu noteikšanu un pierādīšanu promocijas darba izstrādes laikā ir iegūti divi patenti un publicētas divas publikācijas, kuros esmu kā līdzautore.

3.13. Analītiskās pieejas izveide oregonīna un citu alkšņu mizām raksturīgo diarilheptanoīdu analīzei

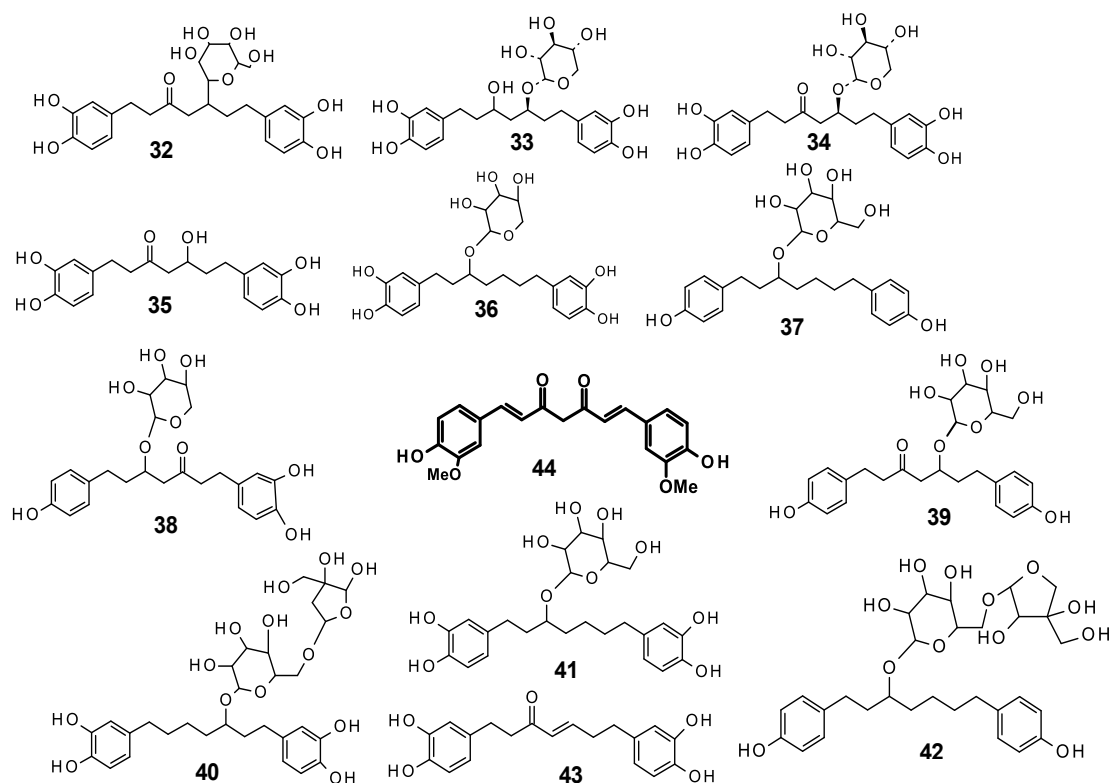
Diarilheptanoīdu farmakoloģiskā aktivitāte ir skaidri parādīta gan *in vivo* gan *in vitro* pētījumos, tomēr neskatoties uz to informācija un metodikas individuālu diarilheptanoīdu hromatografiskai analīzei ir limitētas un nav pieejamas metodes, kas ļautu novērtēt kopējo jeb vienlaicīgu dažādu diarilheptanoīdu savienojumu noteikšanu. Aktualizējoties diarilheptanoīdu savienojumu ieguves metožu optimizācijai, lai paplašinātu to izmantošanas sfēras un ieviestu jaunus to saturošos produktus tirgū, arvien nepieciešamāka kļūst ne tikai viena dominējošā aktīvā diarilheptanoīda kvalitatīva un kvantitatīva raksturošana ar vienu metodi, bet arī kopējo diarilheptanoīdu savienojumu novērtējums un dažādu metožu salīdzinājums.

Tādēļ paralēli Latvijā augošos alkšņos dominējošā diarilheptanoīda oregonīna kvantificēšanai ar dažādām metodēm promocijas darbā tika izveidota puskvantitatīva identificēto diarilheptanoīdu analīze, izmantojot iekšējā standarta metodi. Kā iekšējais standarts tika izmantots kurkumīns, kas ir oregonīna un citu alkšņos identificēto diarilheptanoīdu strukturālais analogs, identificēto un pēc iekšējā standarta kvantificējamo diarilheptanoīdu ķīmiskās struktūrformulas ir parādītas 3.16. attēlā. Komerciāli pieejamo standartvielu trūkuma un/vai to dārgo izmaksu dēļ citi provizoriski identificētie diarilheptanoīdi tika kvantificēti, izmantojot oregonīna kurkumīna daudzumu attiecību, kas iegūta salīdzinot to signālu attiecību.

Diarilheptanoīdu saturs baltalkšņa un melnalkšņa mizas ekstraktos, mg mg⁻¹

Savienojums	BA, EtOAc ekstrakts	MA, EtOAc ekstrakts
32	0.01± 0.001	0.02± 0.01
33	0.02± 0.01	0.02±0.01
34	0.68± 0.05	0.4±0.04
35	0.01± 0.002	0.04±0.01
36	0.03± 0.01	0.04±0.01
37,38	0.02± 0.01	0.06±0.01
39	0.04± 0.01	0.05±0.01
40	0.02± 0.01	0.05±0.02
41	0.03± 0.01	0.07±0.03
42	0.06± 0.01	0.02±0.01
43	0.01± 0.005	0.03±0.01
Kopā	0.94± 0.04	0.80±0.02

Identificētos diarlheptanoīdu savienojumu un kurkumīna (**44**) struktūformulas dotas 3.18. attēlā.



3.18. att. Alkšņu mizās identificēto un puskvantificēto diarlheptanoīdu (32-43) un kurkumīna (44) struktūrformulas

Puskvantitatīvie dati parādīja, ka dominē viens diarilheptanoīds – oregonīns un pārējie diarilheptanoīdi ir salīdzinoši mazos daudzumos, tomēr ir nepieciešams tos kontrolēt, jo tiem visiem ir literatūrā ziņotas spēcīgas bioloģiskās aktivitātes. Paralēli iekšējā standarta metodei visos paraugos oregonīns tiek kvantificēts izmantojot validētu ārējā standarta metodi, izmantojot kalibrēšanas taisni, tādējādi kontrolējot abu metožu pareizību, un maksimāli izvairoties no kļūdām kvantificēšanas gaitā. Rezultāti iegūti ar abām metodēm uzrādīja savstarpēji salīdzināmu labu oregonīna kvantitatīvo datu sakritību, tomēr ir redzams, ka iekšējā standarta metodē ir ievērojami lielāka standarnovirze (3.14. tabula).

3.14. tabula

Oregonīna saturs alkšņu mizas ekstraktos izmantojot dažādas noteikšanas metodes

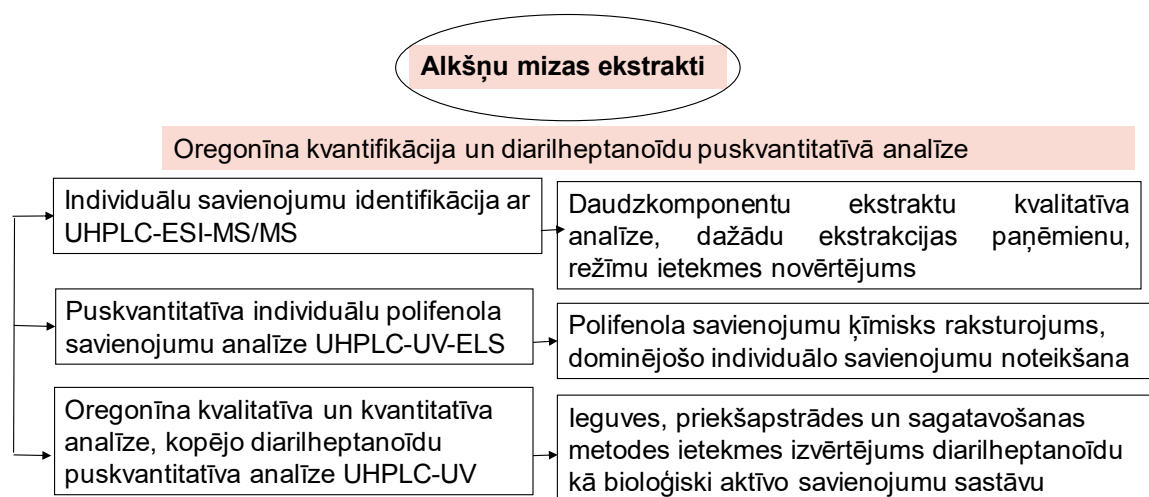
MA, EtOAc ekstrakts	Ārējā standarta metode	Iekšējā standarta metode
2015.g. ievāktas	0,71±0,03	0,68±0,05
2019. g. ievāktas	0,57±0,04	0,45±0,08

Izveidotā puskvantitatīvā metode tiks izmantota diarilheptanoīdu kvantitatīvam novērtējumam, iegūstot diarilheptanoīdus no alkšņu mizas ar paātrinātā šķidrums ekstrakciju un ekstrakciju mikroviļņos, izmantojot dažādus ekstrakcijas režīmus, ekstrakcijas efektivitātes raksturojumam. Pamatojoties uz iepriekš promocijas darbā aprakstītajām un eksperimentāli pārbaudītajām diarilheptanoīdu analīzes metodēm ir izveidota analītiskā pieeja to kvalitatīvai un kvantitatīvai noteikšanai alkšņu mizas vidēji polāros un polāros ekstraktos, skatīt 3.19. attēlu.

Promocijas darbā izveidotā analītiskā pieeja diarilheptanoīdu analīzei alkšņu mizas ekstraktos uzsver nepieciešamību lietot šķidrums hromatogrāfijas metožu kopumu nevis līdz šim plaši piekopto vienas analīzes veikšanu, tādējādi izvairoties no maldīgiem ķīmiskiem raksturojumiem.

Promocijas darbā ir pielāgotas kvalitatīvās un kvantitatīvās analīzes metodes (hromatogrāfiskās un spektrofotometriskās) analītiskās pieejas izveidei bioloģiski aktīvu vielu analīzei dažādos alkšņu ekstraktos, identificēti jauni līdz šim neidentificēti savienojumi tieši Latvijā augošo alkšņu mizās, kā arī attīstītas un ieviestas specifisku

ķīmisko grupu (kopējo diarilheptanoīdu) kvantitatīvā sastāva skrīninga metodika un individuāla savienojuma – oregonīna validēta kvantificēšanas analīze.



3.19. att. Analītiskā pieeja alkšņu mizas diarilheptanoīdu analīzei

SECINĀJUMI

1. Izmantojot hromatogrāfisko un spektrofotometrisko metožu kombinācijas kā analītisko pieeju, ir izdevies identificēt vērtīgus savienojumus alkšņu mizās un kviešu salmos, kā arī attīstīt specifisku ķīmisko grupu kvantitatīvā sastāva skrīninga metodikas lignocelulozes paraugos un oregonīna validētu kvantificēšanas analīzi alkšņu ekstraktos.
2. Izveidota kviešu salmos esošo savienojumu tricīna un tricīna - lignīna kompleksu kvalitatīvā un kvantitatīvā sastāva raksturošanas metodika, kas ir vienlaicīgi izmantojama gan tricīna - lignīna, gan lignīna oligomēru sastāva kontrolei kā vienam no ekstraktu bioloģiskās aktivitātes raksturojošiem rādītājiem.
3. Kviešu salmus paraugu UPLC-MS / MS analīzes rezultāti parāda, ka pēc to apstrādes ar ultraskaņu sārmainā vidē, ne tikai hemicelulozes daļēji tiek pārnestas šķidrās frakcijās, bet arī lignīna atvasinājumi un lignīna-ogļhidrātu kompleksi.
4. Pirmo reizi kviešu salmu biomasas lignīna frakcijās, kas rodas ogļhidrātu ražošanas procesā, tika identificēti vērtīgi bioloģiski aktīvi flavonoīdi - tricīns, apigenīns un to atvasinājumi. Šis pētījums parāda, ka lignīna blakusproduktu plūsmas, kas radušās kviešu salmu pārstrādē, varētu uzskatīt par pievienotās vērtības produktu avotu, piemēram, dabisko antioksidantu tricīna-lignīna kompleksiem.
5. Iegūts oregonīns ar augstu hromatogrāfisko tīrību > 94% (LC-UV-ELS, LC-MS/MS), un palielināti tā attīrīšanas apjomi, pielāgojot lielākas ietilpības preparatīvās kolonnas, iegūstot to pietiekošā daudzumā biomedicīnisko pētījumu veikšanai.
6. Sadarbībā ar bioloģiskās aktivitātes jomas speciālistiem pirmo reizi pierādīta oregonīna labvēlīgā ietekme uz aunu spermas uzglabāšanas laika pagarināšanu, vienlaikus saglabājot labas apaugļošanas spēju un pozitīva ietekmi uz epģenētiskām iezīmēm, kas saistītas ar DNA metilēšanu.
7. Paralēli oregonīna kā alkšņu mizas aktīvā savienojuma analīzes metodes validācijai un tā analīzes metožu salīdzinajumam, izveidota puskvantitatīva diarilheptanoīdu noteikšanas metodika, izmantojot šķidrums hromatografijas sistēmu ar UV detektoru un masspektometru.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Farzad, S.; Mandegari, M.A.; Guo, M.; Haigh, K.F.; Shah, N.; Görgens, J.F. Multi-product biorefineries from lignocelluloses: A pathway to revitalisation of the sugar industry? *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *10*, 1–24.
2. de Jong, E.; Jungmeier, G. Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries. In *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*; Elsevier, 2015; pp. 3–33 ISBN 9780444634535.
3. Isikgor, F.H.; Becer, C.R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 4497–4559.
4. Kohli, K.; Prajapati, R.; Sharma, B.K. Bio-based chemicals from renewable biomass for integrated biorefineries. *Energies* 2019, *12*.
5. Behera, B.K.; Varma, A. (Ajit) *Bioenergy for sustainability and security*; Springer: India, 2019; ISBN 9783319965383.
6. Das, H.; Singh, S.K. Useful Byproducts from Cellulosic Wastes of Agriculture and Food Industry - A Critical Appraisal. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 77–89.
7. Devappa, R.K.; Rakshit, S.K.; Dekker, R.F.H. *Forest biorefinery: Potential of poplar phytochemicals as value-added co-products*; 2015; Vol. 33, pp. 681–716;.
8. Martin, M.; Boucher, Y.; Fenton, N.J.; Marchand, P.; Morin, H. Forest management has reduced the structural diversity of residual boreal old-growth forest landscapes in Eastern Canada. *For. Ecol. Manage.* **2020**, *458*, 117765.
9. Amidon, T.E.; Bujanovic, B.; Liu, S.; Howard, J.R. Review Commercializing Biorefinery Technology: A Case for the Multi-Product Pathway to a Viable Biorefinery. **2011**.
10. Ekman R, H.B. The chemistry of wood resin. In *Pitch control wood resin and deresination*; 2000; pp. 37–76.
11. Umezawa, T. Chemistry of extractives. In *ood and Cellulosic Chemistry*,; New York, 2001; pp. 213–242.
12. Sjöström, E. Chapter 5 - EXTRACTIVES BT - Wood Chemistry (Second Edition). In *Wood Chemistry (Second Edition)*; Academic Press, 1993; pp. 90–108 ISBN 978-0-08-092589-9.

13. Willför, S.; Hemming, J.; Reunanen, M.; Eckerman, C.; Holmbom, B. Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. *Holzforschung* **2003**, *57*, 27–36.
14. Sasidharan, S.; Chen, Y.; Saravanan, D.; Sundram, K.M.; Yoga Latha, L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2011**, *8*, 1–10.
15. Molinder, R.; Almqvist, J. *Extractives in the Scandinavian pulp and paper industry Current and possible future applications Report produced by Processum within the Interreg project Bioraff Botnia*; 2018;
16. Cragg, G.M.; Newman, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2013, *1830*, 3670–3695.
17. Atanasov, A.G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, E.H.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* 2015, *33*, 1582–1614.
18. *WHO GLOBAL REPORT ON TRADITIONAL AND COMPLEMENTARY MEDICINE 2019*; 2019; ISBN 9789241515436.
19. Mármol, I.; Quero, J.; Jiménez-Moreno, N.; Rodríguez-Yoldi, M.J.; Ancín-Azpilicueta, C. A systematic review of the potential uses of pine bark in food industry and health care. *Trends Food Sci. Technol.* 2019, *88*, 558–566.
20. Zengion, A.H.; Yarnell, E. Herbal and Nutritional Supplements for Painful Conditions. In *Pain Procedures in Clinical Practice*; Elsevier Inc., 2011; pp. 187–204 ISBN 9781416037798.
21. Francezon, N.; Stevanovic, T. Integrated process for the production of natural extracts from black spruce bark. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *108*, 348–354.
22. Strøm-Andersen, N. Innovation and by-product valorization: A comparative analysis of the absorptive capacity of food processing firms. *J. Clean. Prod.* **2020**, *253*, 119943.
23. Biomass sidestreams: Promising feedstock to achieve a sustainable bioeconomy Available online: <https://www.openaccessgovernment.org/biomass-sidestreams-sustainable-bioeconomy/55811/> (accessed on Jun 1, 2020).

24. Turley, D.B.; Chaudhry, Q.; Watkins, R.W.; Clark, J.H.; Deswarte, F.E.I. Chemical products from temperate forest tree species-Developing strategies for exploitation. *Ind. Crops Prod.* **2006**, *24*, 238–243.
25. *Forest Sector Innovation in Canada 2015*;
26. FPInnovations partners with Naturex on forest-derived molecules - Pulp and Paper Canada Available online: <https://www.pulpandpapercanada.com/fpinnovations-partners-with-naturex-on-forest-derived-molecules-1100000069/> (accessed on Jun 1, 2020).
27. Watson, R.R. *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*; Elsevier Inc., 2014; ISBN 9780123979346.
28. Vermerris, W.; Nicholson, R. Biosynthesis of phenolic compounds. In *Phenolic Compound Biochemistry*; Springer Netherlands, 2006; pp. 63–149 ISBN 9781402051630.
29. Bernal, J.; Mendiola, J.A.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A. Advanced analysis of nutraceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, *55*, 758–774.
30. Bernhoft, A.; Flaten, T.P.; Holmsen, E.; Langmark, F.; Norum, K.R.; Bal, B.S.; Singh, R.; Steinnes, E.; Aaseth, J.O. *Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals The Norwegian Academy of Science and Letters*; 2008; ISBN 978-82-7099-583-7.
31. Li, A.N.; Li, S.; Zhang, Y.J.; Xu, X.R.; Chen, Y.M.; Li, H. Bin Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients* 2014, *6*, 6020–6047.
32. Khoddami, A.; Wilkes, M.A.; Roberts, T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 2013, *18*, 2328–2375.
33. Da Costa Lopes, A.M.; Brenner, M.; Falé, P.; Roseiro, L.B.; Bogel-Lukasik, R. Extraction and Purification of Phenolic Compounds from Lignocellulosic Biomass Assisted by Ionic Liquid, Polymeric Resins, and Supercritical CO₂. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 3357–3367.
34. Tanase, C.; Cosarcă, S.; Muntean, D.L. A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. *Molecules* 2019, *24*.
35. Şen, A.; Miranda, I.; Santos, S.; Graça, J.; Pereira, H. The chemical composition of

- cork and phloem in the rhytidome of *Quercus cerris* bark. *Ind. Crops Prod.* **2010**, *31*, 417–422.
36. Leite, C.; Pereira, H. Cork-Containing Barks—A Review. *Front. Mater.* **2017**, *3*, 63.
 37. Neiva, D.M.; Araújo, S.; Gominho, J.; Carneiro, A. de C.; Pereira, H. Potential of *Eucalyptus globulus* industrial bark as a biorefinery feedstock: Chemical and fuel characterization. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *123*, 262–270.
 38. The Utilization of Tree Bark | Pásztor | BioResources Available online: https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_11_3_Review_Pasztor_Utilization_Tree_Bark (accessed on May 6, 2020).
 39. Arús Pampín, L.; Paneque Quevedo, A.; García Pulpeiro, O.; Boza Rivera, A.; Sordo Martínez, L.; Nuñez-sellés, A. Estabilidad de la crema elaborada a partir del extracto seco de la corteza de *Mangifera indica* L. (*Vimang*). *Lat. Am. J. Pharm* **2003**, *22*, 335–338.
 40. Lemus-Molina, Y.; Sánchez-Gómez, M.V.; Delgado-Hernández, R.; Matute, C. *Mangifera indica* L. extract attenuates glutamate-induced neurotoxicity on rat cortical neurons. *Neurotoxicology* **2009**, *30*, 1053–1058.
 41. Harkin; Rowe *BARK AND ITS POSSIBLE USES*; 1971;
 42. Nyiksov V.D Komplexnol ispolzovanie dreveszini. *Lesznejá pramislénosztý* **1985**.
 43. Guidi, W.; Piccioni, E.; Ginanni, M.; Bonari, E. Bark content estimation in poplar (*Populus deltoides* L.) short-rotation coppice in Central Italy. *Biomass and Bioenergy* **2008**, *32*, 518–524.
 44. Verovkins, A. Koku mizas modificēšana ar slāpekli saturošām funkcijām, Riga Technical University, 2013.
 45. Nosek, R.; Holubcik, M.; Jandacka, J. The impact of bark content of wood biomass on biofuel properties. *BioResources* **2016**, *11*, 44–53.
 46. Jong, B. de The potential of wood residue streams for industrial wood pellet production in the Baltic Countries and Poland. **2012**.
 47. Rūta Bendere, Ivars Kudreņickis Atkritumi un to izmantošanas iespējas Latvijas enerģētiskajā bilancē. In Proceedings of the Proceeding book of EcoBalt 2001; 2001.
 48. *LATVIAN FOREST SECTOR 2018 IN FACTS & FIGURES*;
 49. *Sustainable and optimal use of biomass for energy in the EU beyond 2020*; 2017;

50. Miranda, I.; Lima, L.; Quilhó, T.; Knapic, S.; Pereira, H. The bark of *Eucalyptus sideroxylon* as a source of phenolic extracts with anti-oxidant properties. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *82*, 81–87.
51. Dagnis Dubrovskis, D. *Latvijas meža resursu Latvijas meža resursu vērtējums j*;
52. *CSP MEŽSAIMNIECĪBA 2018. GADĀ*;
53. Janceva, S. No Latvijas lapkoku mizas iegūtu dabas polifenolu un proantocianidīnu izpēte un modifikācija videi draudzīgu funkcionālu produktu un materiālu iegūšanai, Rīgas Tehniskā Universitāte, 2017.
54. Thomsen, T.P.; Ahrenfeldt, J.; Thomsen, S.T. Assessment of a novel alder biorefinery concept to meet demands of economic feasibility, energy production and long term environmental sustainability. *Biomass and Bioenergy* **2013**, *53*, 81–94.
55. Ren, X.; He, T.; Chang, Y.; Zhao, Y.; Chen, X.; Bai, S.; Wang, L.; Shen, M.; She, G. The genus *Alnus*, a comprehensive outline of its chemical constituents and biological activities. *Molecules* **2017**, *22*, 1383.
56. Daugaviete, M.; Liepiņš, K.; Lazdiņš, A.; Daugavietis, O.; Valsts, L.; Institūts, M.; Silava, " *Process of natural regeneration of grey alder (Alnus incana L. Moench) and Above-Ground Biomass Accumulation in the Young Stands*; 2009; Vol. 23;.
57. Daugaviete, M.; Bārdulis, A.; Daugavietis, U.; Lazdiņa, D.; Bārdule, A. *POTENTIAL OF PRODUCING WOOD BIOMASS IN SHORT-ROTATION GREY ALDER (ALNUS INCANA MOENCH) PLANTATIONS ON AGRICULTURAL LANDS*; 2015;
58. Middleton, P.; Stewart, F.; Al-Qahtani, S.; Egan, P.; O'Rourke, C.; Abdulrahman, A.; Byres, M.; Middleton, M.; Kumarasamy, Y.; Shoeb, M.; et al. Antioxidant, Antibacterial Activities and General Toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **2005**, *4*, 81–86.
59. Janceva, S.; Dižbite, T.; Teliševa, G.; Vēvere, L.; Krasilņikova, J.; Dzenis, M. Assessment of Alder Tree Bark Potential as a Renewable Source of Proanthocyanidins in Latvia. *Mater. Sci. Appl. Chem.* **2016**, *33*.
60. Ganapathy, G.; Preethi, R.; Moses, J.A.; Anandharamkrishnan, C. Diarylheptanoids as nutraceutical: A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019, *19*, 101109.
61. Jahng, Y.; Park, J.G. Recent studies on cyclic 1,7-diarylheptanoids: Their isolation,

- structures, biological activities, and chemical synthesis. *Molecules* 2018, 23.
62. Per, C.; Claeson, U.P.; Tuchinda, P.; Reutrakul, V. Occurrence, structure and bioactivity of 1,7-diarylheptanoids. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2002**, 26, 881–908.
 63. Keserü, G.M.; Nógrádi, M. The chemistry of natural diarylheptanoids. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **1995**, 17, 357–394.
 64. Miyagishi, S.; Saito, Y.; Goto, M.; Nakagawa-Goto, K. Antiproliferative and Chemosensitizing Effects of Diarylheptanoids on Intractable Tumor Cells. *ACS Omega* **2019**, 4, 2053–2062.
 65. Amalraj, A.; Pius, A.; Gopi, S.; Gopi, S. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives e A review. *J. Tradit. Chinese Med. Sci.* **2017**, 7, 205–233.
 66. Lv, H.; She, G. Naturally Occurring Diarylheptanoids -A Supplementary Version. *Rec. Nat. Prod.* 2012.
 67. Vidakovic, V.; Novakovic, M.; Popovic, Z.; Jankovic, M.; Matic, R.; Tešević, V.; Bojovic, S. Significance of diarylheptanoids for chemotaxonomical distinguishing between *Alnus glutinosa* and *Alnus incana*. *Holzforschung* **2017**, 72, 9–16.
 68. Yadav, D.; Gupta, M.M. Simultaneous quantification of diarylheptanoids in *alnus nepalensis* using a validated HPTLC method. *J. Chromatogr. Sci.* **2014**.
 69. Novaković, M.; Stanković, M.; Vučković, I.; Todorović, N.; Trifunović, S.; Tešević, V.; Vajs, V.; Milosavljević, S. Diarylheptanoids from *alnus glutinosa* bark and their chemoprotective effect on human lymphocytes DNA. *Planta Med.* **2013**, 79, 499–505.
 70. Dinić, J.; Novaković, M.; Podolski-Renić, A.; Stojković, S.; Mandić, B.; Tešević, V.; Vajs, V.; Isaković, A.; Pešić, M. Antioxidative Activity of Diarylheptanoids from the Bark of Black Alder (*Alnus glutinosa*) and Their Interaction with Anticancer Drugs. *Planta Med.* **2014**, 80, 1088–1096.
 71. Telysheva, G.; Dizhbite, T.; Bikovens, O.; Ponomarenko, J.; Janceva, S.; Krasilnikova, J. Structure and antioxidant activity of diarylheptanoids extracted from bark of grey alder (*Alnus incana*) and potential of biorefinery-based bark processing of European trees. In Proceedings of the *Holzforschung*; 2011; Vol. 65, pp. 623–629.
 72. Alberti, Á.; Riethmüller, E.; Béni, S. Characterization of diarylheptanoids: An

- emerging class of bioactive natural products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, *147*, 13–34.
73. González-Laredo, R.F.; Helm, R.F.; Chen, J.; Karchesy, J.J. Two acylated diarylheptanoid glycosides from red alder bark. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1292–1294.
 74. Gonzalez-Laredo, R.F.; Chen, J.; Karchesy, Y.M.; Karchesy, J.J. Four new diarylheptanoid glycosides from *Alnus rubra* bark. *Nat. Prod. Lett.* **1999**, *13*, 75–80.
 75. Roze, L. Zemmolekulāru savienojumu noteikšana un izdalīšana no Latvijā augošiem alkšņiem, Latvijas Universitāte, 2012.
 76. Saxena, G.; Farmer, S.; Hancock, R.E.W.; Towers, G.H.N. Antimicrobial compounds from *alnus rubra*. *Pharm. Biol.* **1995**.
 77. Chen, J.; Gonzalez-Laredo, R.F.; Karchesy, J.J. Minor diarylheptanoid glycosides of *Alnus rubra* bark. *Phytochemistry* **2000**.
 78. Kang, S.; Kim, J.E.; Li, Y.; Jung, S.K.; Song, N.R.; Thimmegowda, N.R.; Kim, B.Y.; Lee, H.J.; Bode, A.M.; Dong, Z.; et al. Hirsutenone in *Alnus* extract inhibits akt activity and suppresses prostate cancer cell proliferation. *Mol. Carcinog.* **2015**, *54*, 1354–1362.
 79. Nomura, M.; Tokoroyama, T.; Kubota, T. Biarylheptanoids and other constituents from wood of *Alnus japonica*. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1097–1104.
 80. Jin, W.Y.; Cai, X.F.; Na, M.K.; Lee, J.J.; Bae, K.H. Diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit the NF-κB activation and NO and TNF-α production. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**.
 81. Jin, W.Y.; Xing, F.C.; Na, M.K.; Jung, J.L.; Bae, K.H. Triterpenoids and diarylheptanoids from *alnus hirsuta* inhibit HIF-1 in AGS cells. *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30*, 412–418.
 82. Sati, S.C.; Sati, N.; Sati, O.P. Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus*. *Pharmacogn. Rev.* 2011.
 83. Siddiqui, I.N.; Ahmad, V.U.; Zahoor, A.; Ahmed, A.; Khan, S.S.; Khan, A.; Hassan, Z. Two new diarylheptanoids from *Alnus nitida*. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1787–1788.
 84. Altınyay, Ç.; Süntar, I.; Altun, L.; Keleş, H.; Küpeli Akkol, E. Phytochemical and biological studies on *Alnus glutinosa* subsp. *glutinosa*, *A. orientalis* var. *orientalis*

- and *A. orientalis* var. *pubescens* leaves. *J. Ethnopharmacol.* **2016**.
85. Lu, Y.; Yin, W.; Alam, M.S.; Kadi, A.A.; Jahng, Y.; Kwon, Y.; Rahman, A.F.M.M. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking Study of Cyclic Diarylheptanoids as Potential Anticancer Therapeutics. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2020**, *20*, 464–475.
 86. Sun, D.J.; Zhu, L.J.; Zhao, Y.Q.; Zhen, Y.Q.; Zhang, L.; Lin, C.C.; Chen, L.X. Diarylheptanoid: A privileged structure in drug discovery. *Fitoterapia* **2020**, *142*, 104490.
 87. Ahmad, R.S.; Hussain, M.B.; Sultan, M.T.; Arshad, M.S.; Waheed, M.; Shariati, M.A.; Plygun, S.; Hashempur, M.H. Biochemistry, Safety, Pharmacological Activities, and Clinical Applications of Turmeric: A Mechanistic Review. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2020**, *2020*.
 88. Krasilnikova, J.; Lauberte, L.; Stoyanova, E.; Abadjieva, D.; Chervenkov, M.; Mori, M.; De Paolis, E.; Mladenova, V.; Telysheva, G.; Botta, B.; et al. Oregonin from *Alnus incana* bark affects DNA methyltransferases expression and mitochondrial DNA copies in mouse embryonic fibroblasts.
 89. Anand, P.; Thomas, S.G.; Kunnumakkara, A.B.; Sundaram, C.; Harikumar, K.B.; Sung, B.; Tharakan, S.T.; Misra, K.; Priyadarsini, I.K.; Rajasekharan, K.N.; et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharmacol.* **2008**.
 90. Maheshwari, R.K.; Singh, A.K.; Gaddipati, J.; Srimal, R.C. Multiple biological activities of curcumin: A short review. In *Proceedings of the Life Sciences*; 2006.
 91. Friesen, J.B.; Liu, Y.; Chen, S.N.; McAlpine, J.B.; Pauli, G.F. Selective Depletion and Enrichment of Constituents in “curcumin” and Other *Curcuma longa* Preparations. *J. Nat. Prod.* **2019**.
 92. Kumarasamy, Y.; Cox, P.J.; Jaspars, M.; Nahar, L.; Sarker, S.D. *Bioactivity of Hirsutanolol, Oregonin and Genkwanin, Isolated from the Seeds of Alnus glutinosa (Betulaceae)*;
 93. Ilic-Tomic, T.; Sokovic, M.; Vojnovic, S.; Ciric, A.; Veljic, M.; Nikodinovic-Runic, J.; Novakovic, M. Diarylheptanoids from *Alnus viridis* ssp *viridis* and *Alnus glutinosa*: Modulation of Quorum Sensing Activity in *Pseudomonas aeruginosa*.

- Planta Med.* **2017**, *83*, 117–125.
94. Ponomarenko, J.; Trouillas, P.; Martin, N.; Dizhbite, T.; Krasilnikova, J.; Telysheva, G. Elucidation of antioxidant properties of wood bark derived saturated diarylheptanoids: A comprehensive (DFT-supported) understanding. *Phytochemistry* **2014**.
 95. León-Gonzalez, A.J.; Acero, N.; Muñoz-Mingarro, D.; López-Lázaro, M.; Martín-Cordero, C. Cytotoxic activity of hirsutanone, a diarylheptanoid isolated from *Alnus glutinosa* leaves. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 866–870.
 96. Dong, G. zhi; Jeong, J.H.; Lee, Y. ih; Lee, S.Y.; Zhao, H.Y.; Jeon, R.; Lee, H.J.; Ryu, J.H. Diarylheptanoids suppress proliferation of pancreatic cancer PANC-1 cells through modulating shh-Gli-FoxM1 pathway. *Arch. Pharm. Res.* **2017**, *40*, 509–517.
 97. Skrypnik, L.; Grigorev, N.; Michailov, D.; Antipina, M.; Danilova, M.; Pungin, A. Comparative study on radical scavenging activity and phenolic compounds content in water bark extracts of alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.), oak (*Quercus robur* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.). *Eur. J. Wood Wood Prod.* **2019**, *77*, 879–890.
 98. Stević, T.; Šavikin, K.; Zdunić, G.; Stanojković, T.; Juranić, Z.; Janković, T.; Menković, N. Antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activity of *Alnus incana* (L.) ssp. *incana* Moench and *A. viridis* (Chaix) DC ssp. *viridis* extracts. *J. Med. Food* **2010**.
 99. Xu, D.P.; Li, Y.; Meng, X.; Zhou, T.; Zhou, Y.; Zheng, J.; Zhang, J.J.; Li, H. Bin Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int. J. Mol. Sci.* 2017.
 100. Tung, N.H.; Kim, S.K.; Ra, J.C.; Zhao, Y.Z.; Sohn, D.H.; Kim, Y.H. Antioxidative and hepatoprotective diarylheptanoids from the bark of *alnus japonica*. *Planta Med.* **2010**.
 101. Kim, H.J.; Yeom, S.H.; Kim, M.K.; Shim, J.G.; Paek, I.N.; Lee, M.W. Nitric oxide and prostaglandin E2 synthesis inhibitory activities of diarylheptanoids from the barks of *Alnus japonica* steudel. *Arch. Pharm. Res.* **2005**.
 102. Lee, M.; Lee, M.K.; Kim, Y.C.; Sung, S.H. Antifibrotic constituents of *Alnus firma* on hepatic stellate cells. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**.
 103. Tung, N.H.; Suzuki, M.; Uto, T.; Morinaga, O.; Kwofie, K.D.; Ammah, N.; Koram,

- K.A.; Aboagye, F.; Edoh, D.; Yamashita, T.; et al. Anti-trypanosomal activity of diarylheptanoids isolated from the bark of *alnus japonica*. *Am. J. Chin. Med.* **2014**.
104. Amidon, T.E.; Bujanovic, B.; Liu, S.; Howard, J.R. Commercializing Biorefinery Technology: A Case for the Multi-Product Pathway to a Viable Biorefinery. *Forests* **2011**, *2*, 929–947.
105. Sawamura, R.; Sun, Y.; Yasukawa, K.; Shimizu, T.; Watanabe, W.; Kurokawa, M. Antiviral activities of diarylheptanoids against influenza virus in vitro. *J. Nat. Med.* **2010**.
106. Ponomarenko, J. Lielmolekulāro un mazmolekulāro lignīnam radniecīgo augu polifenolu struktūras un antioksidatīvas aktivitātes izpēte, to kopsakarību raksturošana, Latvijas Universitāte, 2014.
107. Tarasov, D.; Leitch, M.; Fatehi, P. Lignin-carbohydrate complexes: Properties, applications, analyses, and methods of extraction: A review. *Biotechnol. Biofuels* 2018.
108. Vanholme, R.; De Meester, B.; Ralph, J.; Boerjan, W. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019.
109. Del Río, J.C.; Rencoret, J.; Prinsen, P.; Martínez, Á.T.; Ralph, J.; Gutiérrez, A. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5922–5935.
110. van Erven, G.; Nayan, N.; Sonnenberg, A.S.M.; Hendriks, W.H.; Cone, J.W.; Kabel, M.A. Mechanistic insight in the selective delignification of wheat straw by three white-rot fungal species through quantitative ¹³C-IS py-GC–MS and whole cell wall HSQC NMR. *Biotechnol. Biofuels* **2018**.
111. Chateigner-Boutin, A.L.; Lapierre, C.; Alvarado, C.; Yoshinaga, A.; Barron, C.; Bouchet, B.; Bakan, B.; Saulnier, L.; Devaux, M.F.; Girousse, C.; et al. Ferulate and lignin cross-links increase in cell walls of wheat grain outer layers during late development. *Plant Sci.* **2018**, *276*, 199–207.
112. Wang, S.; Alseekh, S.; Fernie, A.R.; Luo, J. The Structure and Function of Major Plant Metabolite Modifications. *Mol. Plant* 2019, *12*, 899–919.
113. Li, M.; Pu, Y.; Yoo, C.G.; Ragauskas, A.J. The occurrence of triclin and its

- derivatives in plants. *Green Chem.* **2016**, *18*, 1439–1454.
114. Lu, Y.; Lu, Y.C.; Hu, H.Q.; Xie, F.J.; Wei, X.Y.; Fan, X. Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods. *J. Spectrosc.* **2017**.
 115. Lan, W.; Yue, F.; Rencoret, J.; del Río, J.C.; Boerjan, W.; Lu, F.; Ralph, J. Elucidating tricetin-lignin structures: Assigning correlations in HSQC spectra of monocot lignins. *Polymers (Basel)*. **2018**.
 116. Lan, W.; Lu, F.; Regner, M.; Zhu, Y.; Rencoret, J.; Ralph, S.A.; Zakai, U.I.; Morreel, K.; Boerjan, W.; Ralph, J. Tricetin, a flavonoid monomer in monocot lignification. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 1284–1295.
 117. Lan, W.; Rencoret, J.; Lu, F.; Karlen, S.D.; Smith, B.G.; Harris, P.J.; del Río, J.C.; Ralph, J. Tricetin-lignins: occurrence and quantitation of tricetin in relation to phylogeny. *Plant J.* **2016**, *88*, 1046–1057.
 118. Gall, D.L.; Kontur, W.S.; Lan, W.; Kim, H.; Li, Y.; Ralph, J.; Donohue, T.J.; Noguera, D.R. In vitro enzymatic depolymerization of lignin with release of syringyl, guaiacyl, and tricetin units. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*.
 119. Zikeli, F.; Ters, T.; Fackler, K.; Srebotnik, E.; Li, J. Successive and quantitative fractionation and extensive structural characterization of lignin from wheat straw. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *61*, 249–257.
 120. Mörsel, J.-T. *Seabuckthorn: research for a promising crop*; Books on Demand, 2014; ISBN 9783732299867.
 121. Ghaffar, S.H.; Fan, M. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass and Bioenergy* **2013**, *57*, 264–279.
 122. XU, C.C.; WANG, B.; PU, Y.Q.; TAO, J.S.; ZHANG, T. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chin. J. Nat. Med.* **2017**.
 123. Stevanato, R.; Fabris, S.; Momo, F. New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *J. Agric. Food Chem.* **2004**.
 124. Rover, M.R.; Brown, R.C. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2013**.
 125. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **2010**.

126. Pelozo, M.I.D.G.; Cardoso, M.L.C.; De Mello, J.C.P. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2008**.
127. Agbor, G.; Vinson, J.A.; Donnelly, P.E. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet.* **2014**.
128. Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* **2007**.
129. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1999**.
130. Paixão, N.; Perestrelo, R.; Marques, J.C.; Câmara, J.S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.* **2007**.
131. Tuyen, P.T.; Xuan, T.D.; Khang, D.T.; Ahmad, A.; Van Quan, N.; Anh, T.T.T.; Anh, L.H.; Minh, T.N. Phenolic compositions and antioxidant properties in bark, flower, inner skin, kernel and leaf extracts of *Castanea crenata* Sieb. et Zucc. *Antioxidants* **2017**.
132. Sánchez-Rangel, J.C.; Benavides, J.; Heredia, J.B.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D.A. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* **2013**.
133. Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 2007.
134. Proestos, C.; Komaitis, M. Analysis of Naturally Occurring Phenolic Compounds in Aromatic Plants by RP-HPLC Coupled to Diode Array Detector (DAD) and GC-MS after Silylation. *Foods* **2013**.
135. PROESTOS, C.; KAPSOKEFALOU, M.; KOMAITIS, M. ANALYSIS OF NATURALLY OCCURRING PHENOLIC COMPOUNDS IN AROMATIC PLANTS BY RP-HPLC AND GC-MS AFTER SILYLATION. *J. Food Qual.* **2008**, *31*, 402–414.
136. Sjöström, E. *Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking*;

- 1998; ISBN 3-540-63102-X.
137. Sonoda, T.; Ona, T.; Yokoi, H.; Ishida, Y.; Ohtani, H.; Tsuge, S. Quantitative analysis of detailed lignin monomer composition by pyrolysis-gas chromatography combined with preliminary acetylation of the samples. *Anal. Chem.* **2001**.
 138. Van Erven, G.; De Visser, R.; Merkx, D.W.H.; Strolenberg, W.; De Gijssel, P.; Gruppen, H.; Kabel, M.A. Quantification of Lignin and Its Structural Features in Plant Biomass Using ¹³C Lignin as Internal Standard for Pyrolysis-GC-SIM-MS. *Anal. Chem.* **2017**.
 139. Motilva, M.J.; Serra, A.; Macià, A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *J. Chromatogr. A* 2013, *1292*, 66–82.
 140. Cortese, M.; Gigliobianco, M.R.; Peregrina, D.V.; Sagratini, G.; Censi, R.; Di Martino, P. Quantification of phenolic compounds in different types of craft beers, worts, starting and spent ingredients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2020**.
 141. Karlsen, J. Quality control and instrumental analysis of plant extracts. In *The Medicinal Plant Industry*; CRC Press, 2017; pp. 99–105 ISBN 9781351409858.
 142. Upton, R.; David, B.; Gafner, S.; Glasl, S. Botanical ingredient identification and quality assessment: strengths and limitations of analytical techniques. *Phytochem. Rev.* 2019, 1–21.
 143. Nikam, P.H.; Kareparamban, J.; Jadhav, A.; Kadam, V. Future Trends in Standardization of Herbal Drugs.
 144. Zeng, J.; Tan, M.; Peng, X.; Luo, Q. Standardization and Quality Control of Herbal Extracts and Products. In *Traditional Herbal Medicine Research Methods*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2010; pp. 377–427.
 145. WHO Guidelines for Quality Standardized Herbal Formulations | PharmaTutor Available online: <https://www.pharmatutor.org/articles/who-guidelines-for-quality-standardized-herbal-formulations> (accessed on Jun 17, 2020).
 146. Shulammithi R; Sharanya M; Tejaswini R Standardization and quality evaluation of herbal drugs. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci. (IOSR-JPBS 11)*, 89–100.
 147. Bijauliya, R.K.; Alok, S.; Chanchal, K.; Kumar, M. A Comprehensive Review on

- Standardization of Herbal Drugs. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2017**, *8*, 3663–3677.
148. Abadjieva, D.; Yotov, S.; Mladenova, V.; Lauberte, L.; Kalvanov, I.; Krasilnikova, J.; Telesheva, G.; Kistanova, E. Positive effect of natural antioxidant oregonin from *Alnus incana* bark on ram semen quality stored at 5 °C for 48 h. *Res. Vet. Sci.* **2020**.
 149. Lu, Y.C.; Lu, Y.; Lu, Z.L.; Wei, X.Y. Detailed Componential Characterization of Extractable Species with Organic Solvents from Wheat Straw. *Int. J. Anal. Chem.* **2017**, *2017*.
 150. Ur Rehman, M.S.; Kim, I.; Chisti, Y.; Han, J.I. *Use of ultrasound in the production of bioethanol from lignocellulosic biomass*; 2012;
 151. Yachmenev, V.; Condon, B.; Klasson, T.; Lambert, A. Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound. *J. Biobased Mater. Bioenergy* **2009**, *3*, 25–31.
 152. Sannigrahi, P.; Kim, D.H.; Jung, S.; Ragauskas, A. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4*, 1306–1310.
 153. Bussemaker, M.J.; Xu, F.; Zhang, D. Manipulation of ultrasonic effects on lignocellulose by varying the frequency, particle size, loading and stirring. *Bioresour. Technol.* **2013**, *148*, 15–23.
 154. Kuna, E.; Behling, R.; Valange, S.; Chatel, G.; Colmenares, J.C. Sonocatalysis: A Potential Sustainable Pathway for the Valorization of Lignocellulosic Biomass and Derivatives. *Top. Curr. Chem.* **2017**, *375*.
 155. Del Río, J.C.; Gutiérrez, A.; Martínez, M.J.; Martínez, A.T. Py-GC/MS study of *Eucalyptus globulus* wood treated with different fungi. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2001**, *58–59*, 441–452.
 156. Ohra-aho, T.; Gomes, F.J.B.; Colodette, J.L.; Tamminen, T. S/G ratio and lignin structure among *Eucalyptus* hybrids determined by Py-GC/MS and nitrobenzene oxidation. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2013**, *101*, 166–171.
 157. Rodrigues, J.; Meier, D.; Faix, O.; Pereira, H. Determination of tree to tree variation in syringyl/guaiacyl ratio of *Eucalyptus globulus* wood lignin by analytical pyrolysis. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1999**, *48*, 121–128.
 158. Sun, R.; Lawther, J.M.; Banks, W.B.; Xiao, B. Effect of extraction procedure on the molecular weight of wheat straw lignins. *Ind. Crops Prod.* **1997**, *6*, 97–106.

159. Hosoya, T.; Sakaki, S. Levoglucosan formation from crystalline cellulose: Importance of a hydrogen bonding network in the reaction. *ChemSusChem* **2013**, *6*, 2356–2368.
160. De, S.; Mishra, S.; Poonguzhali, E.; Rajesh, M.; Tamilarasan, K. Fractionation and characterization of lignin from waste rice straw: Biomass surface chemical composition analysis. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**.
161. Michelin, M.; Liebentritt, S.; Vicente, A.A.; Teixeira, A. Lignin from an integrated process consisting of liquid hot water and ethanol organosolv: Physicochemical and antioxidant properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120*.
162. Banoub, J.; Delmas, G.-H.; Joly, N.; Mackenzie, G.; Cachet, N.; Benjelloun-Mlayah, B.; Delmas, M. A critique on the structural analysis of lignins and application of novel tandem mass spectrometric strategies to determine lignin sequencing; A critique on the structural analysis of lignins and application of novel tandem mass spectrometric strategies to determine lignin sequencing. **2015**.
163. Wang, L.; Lu, N.; Zhao, L.; Qi, C.; Zhang, W.; Dong, J.; Hou, X. Characterization of stress degradation products of curcumin and its two derivatives by UPLC-DAD-MS/MS. *Arab. J. Chem.* 2016.
164. Urine, I.; Magera, M.J.; Thompson, A.L.; Matern, D.; Rinaldo, P. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Vanillylmandelic Acid*; 2003; Vol. 49;.
165. Gamze Ağalar, H.; Çiftçi, G.A.; Göger, F.; Kırimer, N. *Supporting Information Activity Guided Fractionation of Arum italicum Miller Tubers and the LC/MS-MS Profiles*; 2018; Vol. 12;.
166. Tan, S.; Calani, L.; Bresciani, L.; Dall’asta, M.; Faccini, A.; Augustin, M.A.; Gras, S.L.; Del Rio, D. The degradation of curcuminoids in a human faecal fermentation model. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2015**, *66*, 790–796.
167. Wahjudi, P.N.; Patterson, M.E.; Lim, S.; Yee, J.K.; Mao, C.S.; Lee, W.N.P. Measurement of glucose and fructose in clinical samples using gas chromatography/mass spectrometry. *Clin. Biochem.* **2010**, *43*, 198–207.
168. Tokareva, E.N.; Pranovich, A. V.; Holmbom, B.R. Characteristic fragment ions from lignin and polysaccharides in ToF-SIMS. *Wood Sci. Technol.* **2011**, *45*, 767–785.

169. Moreira, A.S.P.; Simões, J.; Nunes, F.M.; Evtuguin, D. V.; Domingues, P.; Coimbra, M.A.; Domingues, M.R.M. Nonenzymatic Transglycosylation Reactions Induced by Roasting: New Insights from Models Mimicking Coffee Bean Regions with Distinct Polysaccharide Composition. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 1831–1840.
170. Geng, P.; Sun, J.; Zhang, M.; Li, X.; Harnly, J.M.; Chen, P. Comprehensive characterization of C-glycosyl flavones in wheat (*Triticum aestivum* L.) germ using UPLC-PDA-ESI/HRMSn and mass defect filtering. *J. Mass Spectrom.* **2016**, *51*, 914–930.
171. Faustino, M. V.; Faustino, M.A.F.; Silva, H.; Cunha, Â.; Silva, A.M.S.; Pinto, D.C.G.A. Puccinellia maritima, Spartina maritima, and Spartina patens Halophytic Grasses: Characterization of polyphenolic and chlorophyll profiles and evaluation of their biological activities. *Molecules* **2019**, *24*.
172. Es-Safi, N.E.; Gómez-Cordovés, C. Characterization of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) crude seeds by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 20668–20685.
173. Banoub, J.H.; Benjelloun-Mlayah, B.; Ziarelli, F.; Joly, N.; Delmas, M. Elucidation of the complex molecular structure of wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 2867–2888.
174. Richel, A.; Vanderghem, C.; Simon, M.; Wathelet, B.; Paquot, M. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for second-generation lignin analysis. *Anal. Chem. Insights* **2012**, *7*, 79–89.
175. Evtuguin, D. V.; Amado, F.M.L. Application of electrospray ionization mass spectrometry to the elucidation of the primary structure of lignin. *Macromol. Biosci.* **2003**.
176. Barnhart-Dailey, M.C.; Ye, D.; Hayes, D.C.; Maes, D.; Simoes, C.T.; Appelhans, L.; Carroll-Portillo, A.; Kent, M.S.; Timlin, J.A. Internalization and accumulation of model lignin breakdown products in bacteria and fungi. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 175.
177. Lan, W.; Morreel, K.; Lu, F.; Rencoret, J.; del Río, J.C.; Voorend, W.; Vermerris, W.; Boerjan, W.A.; Ralph, J. Maize Tricin-Oligolignol Metabolites and their

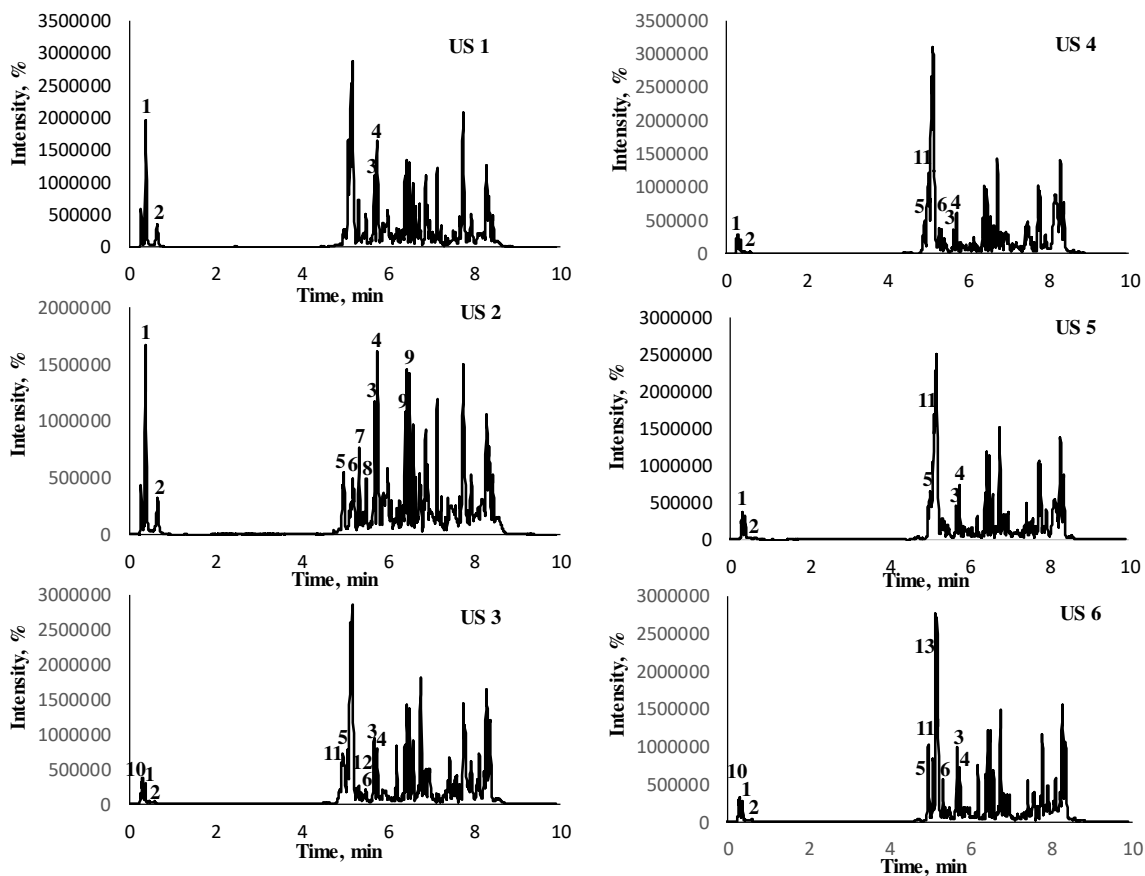
- Implications for Monocot Lignification. *Plant Physiol.* **2016**, *171*, pp.02012.2016.
178. Aminzadeh, S.; Lauberts, M.; Dobele, G.; Ponomarenko, J.; Mattsson, T.; Lindström, M.E.; Sevastyanova, O. Membrane filtration of kraft lignin: Structural characteristics and antioxidant activity of the low-molecular-weight fraction. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *112*, 200–209.
 179. Dahija, S.; Cakar, J.; Vidic, D.; Maksimović, M.; Parić, A. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Alnus incana* (L.) Moench and *Alnus viridis* (Chaix) DC. extracts. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 2317–20.
 180. Sun, X.; Gao, C.; Cao, W.; Yang, X.; Wang, E. Capillary electrophoresis with amperometric detection of curcumin in Chinese herbal medicine pretreated by solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **2002**, *962*, 117–25.
 181. Luo, J.; Rui, W.; Jiang, M.; Tian, Q.; Ji, X.; Feng, Y. Separation and identification of diarylheptanoids in supercritical fluid extract of *Alpinia officinarum* by UPLC-MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **2010**, *48*, 795–801.
 182. Riethmüller, E.; Tóth, G.; Alberti, Á.; Végh, K.; Burlini, I.; Könczöl, Á.; Balogh, G.T.; Kéry, Á. First characterisation of flavonoid- and diarylheptanoid-type antioxidant phenolics in *Corylus maxima* by HPLC-DAD-ESI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *107*, 159–167.
 183. Graduate Thesis Or Dissertation | Polyphenols from the bark of Douglas-fir and red alder | ID: cv43p193k | ScholarsArchive@OSU Available online: https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/cv43p193k (accessed on Feb 27, 2020).
 184. Janceva, S.; Lauberte, L.; Dizhbite, T.; Krasilnikova, J.; Telysheva, G.; Dzenis, M. Protective effects of proanthocyanidins extracts from the bark of deciduous trees in lipid systems. *Holzforschung* **2017**, *71*, 675–680.
 185. 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.
 186. Hammerstone, J.F.; Lazarus, S.A.; Mitchell, A.E.; Rucker, R.; Schmitz, H.H. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-

- performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 490–496.
187. Teļiševa, G.; Dižbite, T.; Bikovens, O.; Krasilņnikova, J. *Grey Alder Bark As Raw Material For Bioactive Polyphenols, Chemicals And Sorbents Obtaining*; Andersons, B., Daugavietis, M., Tuherm, H., Viesturs, U., Grīnfelds, A., Eds.; Latvian State Institute of Wood Chemistry, 2009; ISBN 978-9984-39-935-5.
188. Wichitnithad, W.; Jongaroonngamsang, N.; Pummangura, S.; Rojsitthisak, P. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochem. Anal.* **2009**, *20*, 314–319.
189. Lauberts, M.; Telysheva, G.; Venskutonis, P.R.; Lauberte, L.; Dizhbite, T.; Kazernavičiūte, R.; Pukalskas, A. Diarylheptanoid-rich extract of grey and black alder barks: An effective dietary antioxidant in mayonnaise. *Chem. Pap.* **2017**, *71*, 1007–1012.
190. Vaz, S. *Analytical chemistry applied to emerging pollutants*; 2018; ISBN 9783319744032.

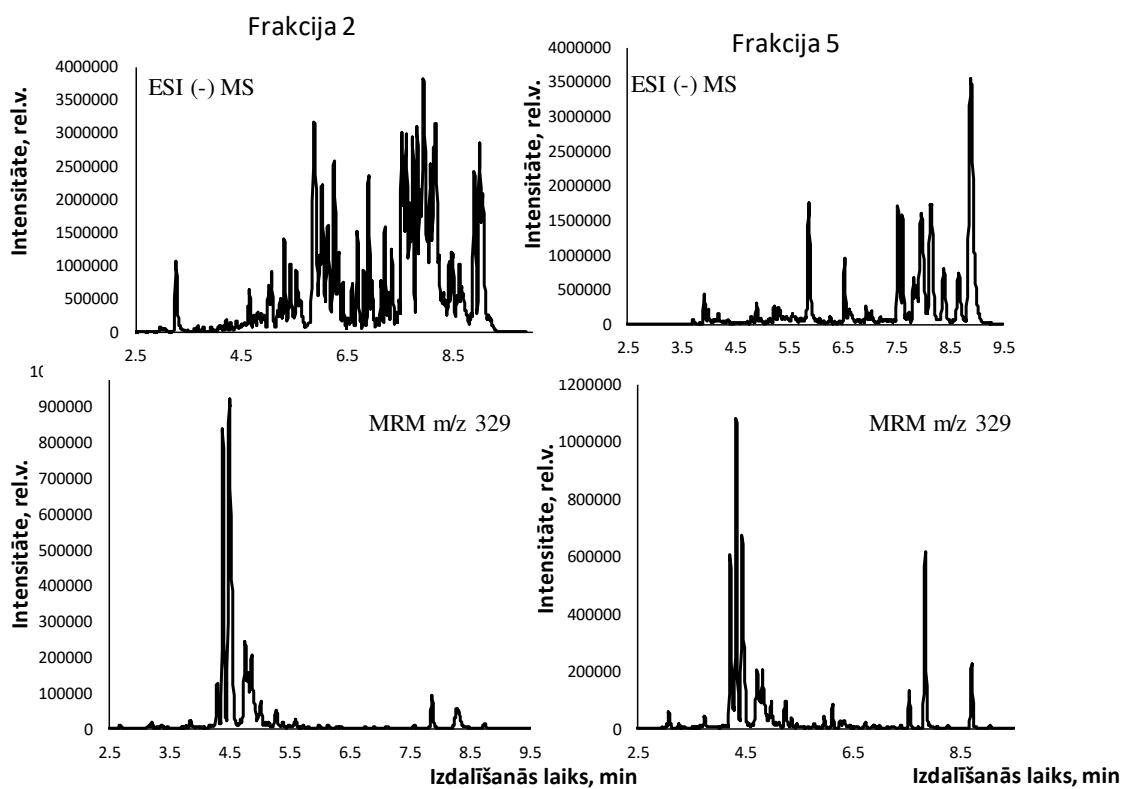
PIELIKUMI

1.pielikums

Kviešu salmu hromatogrammas



1. att. Kviešu salmu frakciju kopējie masspektri



2.att. Tricīna-lignīnu attīrīto frakciju masspektri

2. PIELIKUMS

PIROLĪZES PRODUKTU ANALĪŽU REZULTĀTI

1. Tabula

Kviešu salmu analitiskās pirolīzes (Py-GC-MS-FID) gaistošie produkti un to relatīvais saturs, %

Savienojums	M _w	Izcel sme	Relatīvais saturs, %						
			Izejas biomasa	US1	US 2	US 3	US 4	US 5	US 6
Etīkskābe	60	C ¹	8,43	2,21	6,41	1,72	1,97	2,07	1,86
Skudrskābes metilesteris	60	C	0,27	0,28	0,24	0,34	0,29	0,26	0,23
Skudrskābes 1-metilpropil esteris	102	C	0,17	0,18	0,25	0,10	0,12	0,17	0,14
Propionskābe	74	C	1,13	0,33	0,35	0,25	0,32	0,31	0,28
2-Propēnskābes metilesteris	86	C	0,23	0,40	0,30	0,39	0,30	0,37	0,33
Etīkskābes metilesteris	74	C	1,77	1,81	1,73	1,52	1,55	1,70	1,70
Propānskābes 2-oksietilesteris	102	C	2,17	3,53	3,22	3,08	3,08	3,30	3,25
Krotonskābes vinilesteris	112	C	0,20	0,18	0,14	0,19	0,21	0,17	0,15
Propānskābes 2-metilpropilesteris	130	C	0,12	0,20	0,17	0,21	0,20	0,19	0,17
Krotonskābe	86	C	0	0,18	0,14	0,19	0,21	0,17	0,15
2-propēnskābes etilesteris	98	C	0	0,12	0,09	0,16	0,08	0,11	0,09
Propionskābes etilesteris	100	C	0	0,20	0,17	0,21	0,20	0,19	0,17
2-propil-1-heptanols	158	C	0,20	1,20	2,03	3,80	2,93	2,22	2,84
Metilglioksāls	72	C	2,75	3,63	4,27	5,63	4,84	5,36	5,56
2,3-Butāndions	86	C	2,29	1,70	1,54	1,49	1,58	1,75	1,74
1-hidroksi - 2-propanons	88	C	0,36	0,66	0,80	0,86	0,71	0,88	0,85
Hidroksi acetaldehīds	60	C	6,16	5,78	7,29	9,60	9,41	10,10	10,18
2,3-Pentāndions	100	C	0,28	0,02	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06
1-hidroksi 2-Propanons	74	C	13,31	11,27	9,27	9,13	10,41	10,92	10,89
1-hidroksi-2-Butanons, izomērs	88	C	2,78	1,63	1,29	1,03	1,11	1,31	1,30
Propanāls un butāndiols	58/86	C	4,04	2,49	2,40	0	2,34	2,85	2,75
5-metil-3-heptanons	128	C	0,38	0	0	0	0	0	0

1-(acetiloksi)-propanons,	2-	116	C	1,43	1,94	1,89	1,67	1,44	1,59	1,50
3-metil- 2-heptanons		128	C	0,50	0,51	0,53	0,36	0,47	0,52	0,45
1-(acetiloksi)-butanons	2-	130	C	0,13	0,10	0,06	0,09	0,08	0,06	0,06
Pentanāls pentanediols	un	86/100	C	5,05	1,60	1,62	1,50	1,78	2,24	2,16
2-Butenāls		70	C	0	0	0	0,14	0,13	0,11	0,14
5-metil-, (Z)-4-heptēn-3-ons		126	C	0	0,15	0,25	0,00	0,33	0,33	0,34
2-ciklopentēn-1-ons		82	C	0,80	0,64	0,61	0,54	0,58	0,63	0,60
2-metil-2-ciklopentēn-1-ons		96	C	0,40	0,25	0,25	0,22	0,24	0,27	0,25
4- Ciklopentēn -1,3-dions		96	C	0,15	0,13	0,13	0,15	0,15	0,17	0,15
1,2- Ciklopentēndions		98	C	3,16	3,76	3,80	3,88	4,20	4,70	4,45
3-metil-2-ciklopentēn-1-ons		96	C	0,53	0,41	0,36	0,37	0,40	0,60	0,55
2,3-dimetil-ciklopentēn-1-ons	2-	110	C	0,46	0,18	0,13	0,16	0,18	0,35	0,25
3-metil-1,2-ciklopentāndions		112	C	2,67	2,47	1,87	1,77	1,93	2,10	2,01
2-hidroksi-3-metil-2-ciklopentēn-1-ons		126	C	0,00	0,12	0,16	0,19	0,21	0,22	0,24
2-hidroksi-3,4-dimetil-2-ciklopentēn-1-ons		126	C	0,28	0,49	0,47	0,31	0,32	0,32	0,31
3-etil- 2- ciklopentēn -1-ons		110	C	0,25	0	0	0	0	0	0
3-etil-2-hidroksi-2-ciklopentēn -1-ons		126	C	1,01	0	0	0	0	0	0
2-metil-furāns		82	C	0,08	0,05	0,05	0,04	0,06	0,06	0,06
2,3-dihidro-3-metil-furāns		84	C	0,20	0,23	0,35	0,21	0,21	0,23	0,22
3-metil- furāns		82	C	0,05	0,12	0,13	0,12	0,12	0,19	0,16
2(3H)-furanons		84	C	0,36	0,43	0,52	0,46	0,57	0,62	0,58
3(2H)- furanons		84	C	0,46	0,64	0,64	0,78	0,85	0,65	0,67
Furfuols		96	C	1,94	2,60	2,90	2,41	2,60	2,78	2,67
2-furānmetanols		98	C	0,46	0	0	0	0	0	0
Acetilfurāns		110	C	0,50	0,10	0,19	0,18	0,18	0,21	0,19
5-metil-2-furānkarboksilaldehīds		110	C	0,28	0,20	0,24	0,24	0,24	0,29	0,25
Dihidro- 2(3H)-furanons		86	C	0,51	0,26	0,19	0,19	0,21	0,19	0,19
2(5H)- furanons		84	C	1,04	1,12	1,32	1,20	1,38	1,56	1,50
3-metil- 2,5-furāndions		112	C	0,20	0,12	0,09	0,09	0,12	0,09	0,11

3-metil- 2(5H)-furanons	98	C	0,10	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03
4-hidroksi-2,5-dimetil-3(2H)-furanons	128	C	0	0	0	0,28	0,21	0,14	0,19
Metil 2-furoāts	126	0	0	0	0	0,31	0,32	0,32	0,31
3-Hidroksidihidro-2(3H)-furanons	102	C	0,51	0,25	0,16	0,25	0,30	0,34	0,39
4-metil-5H-furān-2-ons	98	C	0	0,40	0,35	0,43	0,47	0,42	0,46
5-(Hidroksimetil)dihidro-2(3H)-furanons	116	C	0,15	0,16	0,30	0,27	0,30	0,28	0,25
5-acetildihidro- 2(3H)-furanons	128	C	0,28	0,12	0,09	0,18	0,20	0,17	0,19
3-metil-2,4(3H,5H)-furandions	114	C	0,33	0,33	1,04	1,81	1,77	1,70	1,81
2,3-dihidro- benzofurāns	120	C	1,74	1,32	1,43	0,99	0,95	0,77	0,75
4-hidroksi-,5,6-dihidro-(2H)-pirān-2-ons	114	C	0,27	1,30	1,74	2,92	2,85	1,60	1,44
1,4;3,6-dianhidro-.α-D-glikopiranoze	144	C	0,45	0,46	0,47	0,35	0,53	0,65	0,67
2-deoksi-D-eritropentoze	134	C	0	0	0	0,68	0,39	0,48	0,67
D-(+)-ribonic skābes .gamma.-laktons	148	C	0	0,89	1,04	2,94	1,41	1,42	1,61
1,6-Anhidro-.beta.-D-glikopiranoze	162	C	0,30	11,04	9,63	15,00	13,20	11,10	12,30
Fenols	94	L ²	0,60	0,38	0,39	0,31	0,27	0,28	0,29
2-metilfenols	108	L	0,51	0,28	0,28	0,28	0,27	0,27	0,28
4-metil- un 3-metilfenols	108	L	0,56	0,21	0,28	0,31	0,30	0,37	0,40
3,4-dimetilfenols	122	L	0,56	0,08	0,05	0,15	0,09	0,09	0,07
4-etilfenols	122	L	0,08	0,16	0,14	0,19	0,15	0,15	0,12
Gvajakols	124	L	2,09	1,50	1,30	0,78	0,79	0,74	0,65
p- metilgvajakols	138	L	1,00	1,70	1,50	0,99	0,87	0,79	0,71
p- etilgvajakols	152	L	0,80	0,70	0,75	0,37	0,33	0,27	0,28
p-vinilgvajakols	150	L, FA ³	5,67	4,90	4,67	2,42	2,14	2,00	1,80
Eigenols un p-propilgvajakols	164/166	L	0,70	0,44	0,48	0,28	0,27	0,26	0,23
Cis-Izoeigenols	164	L	0,10	0,36	0,38	0,10	0,14	0,14	0,12
Trans-Izoeigenols	164	L	1,90	1,80	1,53	1,78	1,95	1,82	1,62
Vanilīns	152	L	0,30	0,51	0,45	0,28	0,45	0,35	0,27
Homovanilīns	166	L	0,20	0	0	0	0	0	0
Acetogvajakols	166	L	0,30	0,78	0,64	0,10	0,14	0,12	0,11

Gvajacilacetons	180	L	0,25	0,75	0,32	0,07	0,09	0,06	0,09
Koniferilspirts	180	L	0,10	0	0	0	0	0	0
Koniferilaldehīds	178	L	0,20	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15	0,12
Siringols	154	L	1,74	1,37	1,21	1,29	1,15	1,10	1,16
4-metilsiringols	168	L	0,27	0,79	0,71	0,51	0,62	0,55	0,51
4-etilsiringols	182	L	0,15	0,23	0,16	0,16	0,23	0,16	0,15
4-Vinilsiringols	180	L	2,30	2,10	1,48	2,37	2,10	1,70	1,50
4-Allilsiringols un 4-propilsiringols	194/ 196	L	0,13	0,54	0,50	0,40	0,46	0,41	0,34
4-Propenil-(cis)siringols	194	L	0,17	0,28	0,22	0,13	0,20	0,15	0,13
4-propenil-(trans)siringols	194	L	1,08	1,30	1,05	0,74	0,82	0,75	0,70
Siringilaldehīds	182	L	0,13	0,31	0,25	0,15	0,18	0,18	0,14
Acetosiringons	196	L	0,40	0,36	0,30	0,16	0,18	0,17	0,12
Siringilacetons	210	L	0,27	0,23	0,22	0,15	0,15	0,15	0,12
Sinapilaldehīds	208	L	0	0,21	0,22	0	0	0	0
2,3-dihidro- 1,4-dioksāns	86	E ⁴	0,86	0,68	0,82	0,71	0,67	0,79	0,71
D-Limonēns	136	E	0,50	0,23	0,31	0,31	0,36	0,35	0,37
2,3,7,7-tetrahdro-7-metil- 1H-indēn-1,5(6H)-dions	164	C	0,15	0	0,16	0,22	0,26	0,29	0,26
2-Pentadekanons	226	E	0,12	0	0	0	0	0	0
2-Nonadekanons	282	E	0,13	0	0	0	0	0	0
n- heksadekānskābe	256		0	0	0,11	0,13	0,12	0,12	0,15
6,10,14-trimetil-2-Pentadekanons	268	E	0	0,12	0,09	0,07	0,06	0,08	0,09
1,1,2-trimetil-cikloundekāns	196	E	0	0,10	0,11	0,07	0,08	0,06	0,08
2-Heptadekanons	254	E	0	0	0,09	0,04	0,08	0,08	0,09
Heneikozāns	296	E	0	0,36	0,41	0,46	0,35	0,31	0,42

¹ No ogļhidrātiem iegūti pirolīzes produkti

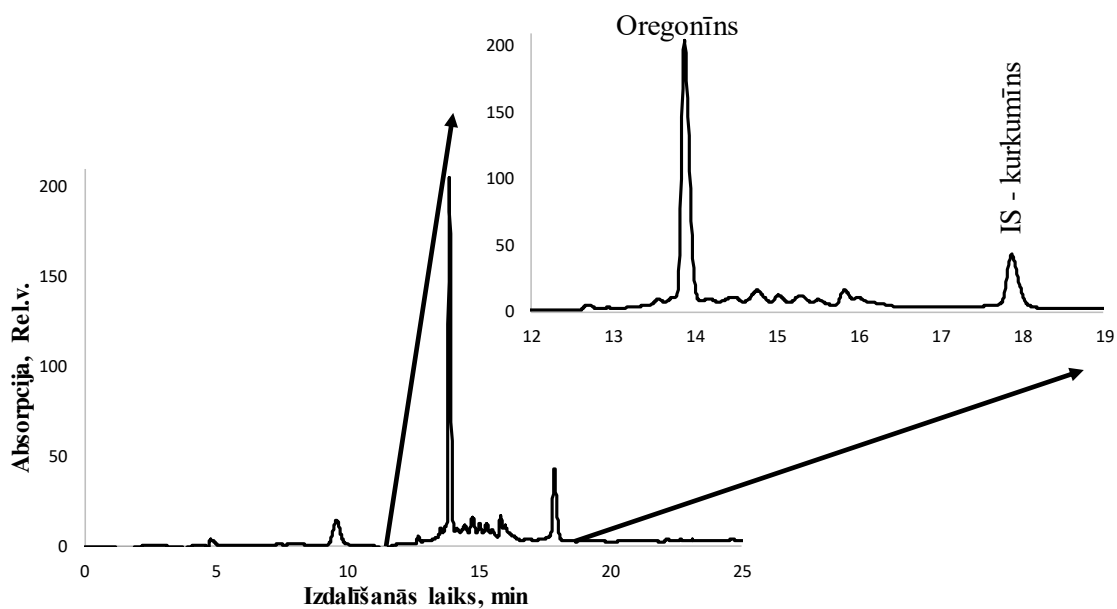
² No lignīna iegūti pirolīzes produkti

³ Ferulēti savienojumi

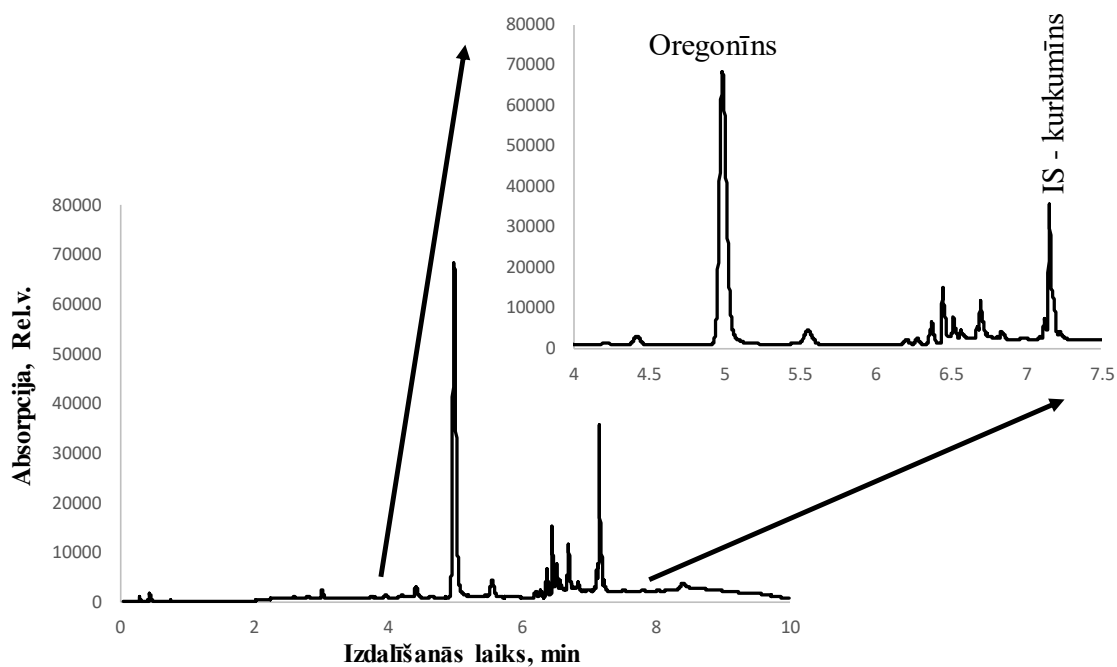
⁴ Izstrādājumi, kas iegūti no ekstraktiem

3. PIELIKUMS

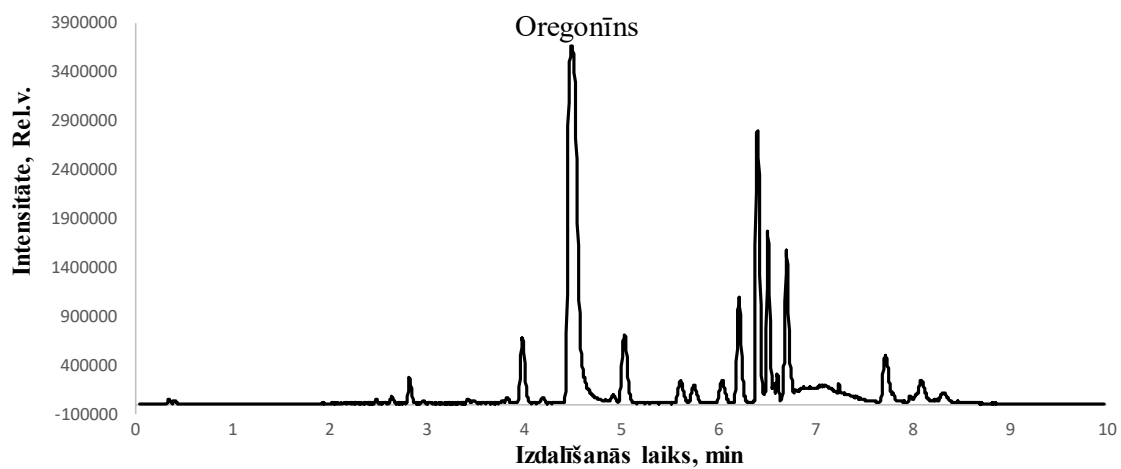
ALKŠŅU MIZAS HROMATOGRAMMAS



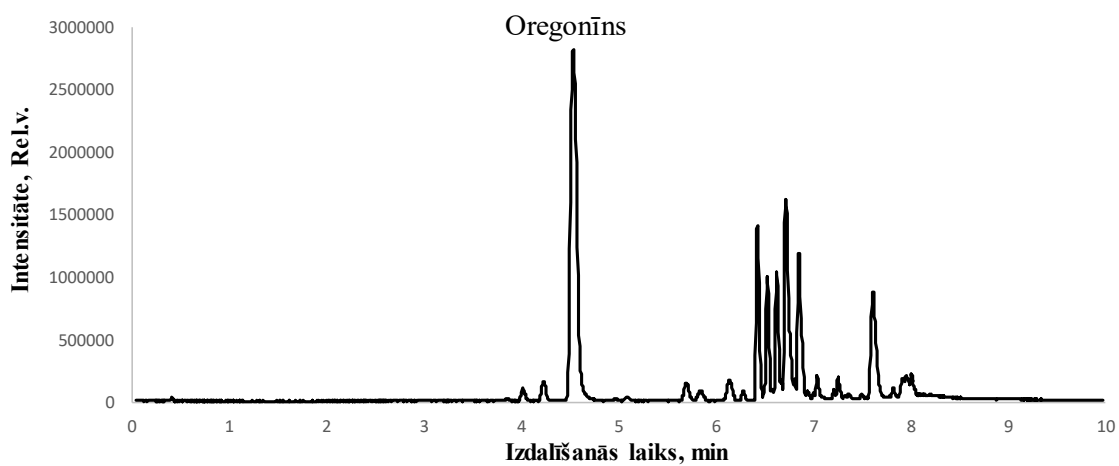
1. Att. Melnalkšņa mizas etilacetata ekstrakta HPLC hromatogramma pie 280 nm



2. Att. Melnalkšņa mizas etilacetata ekstrakta UHPLC hromatogramma pie 280 nm



3. Att. Melnalkšņa mizas etilacetata ekstrakta kopējais masspektrs



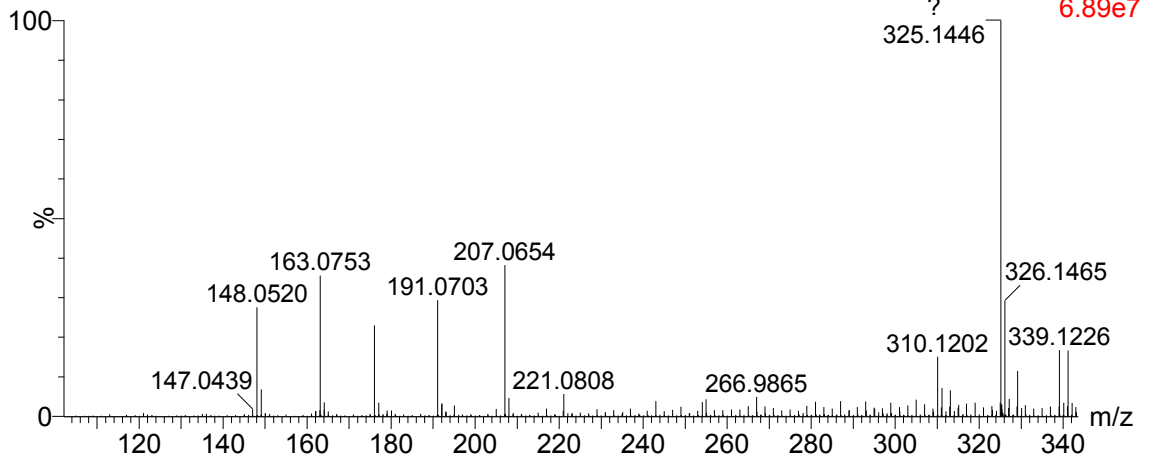
4. Att. Baltalkšņa mizas etilacetata ekstrakta kopējais masspektrs

4. PIELIKUMS

LIGNĪNA MODEĻVIELU MASSPEKTRI

7 EUGENOL_NEG-220217_1 1863 (7.215) Cm (1858:1868)

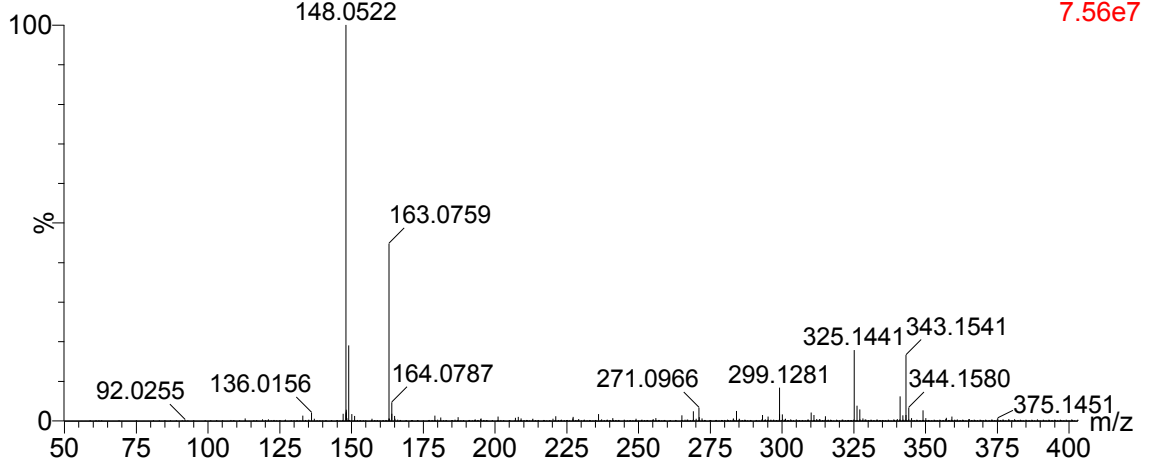
1: TOF MS ES-
6.89e7



1. att. Lignīna modeļvielas 1 (eigenola) TOF-MS (ESI-) spektrs

2 ISOEUGENOL_NEG_010317_1 1722 (6.683) Cm (1718:1727)

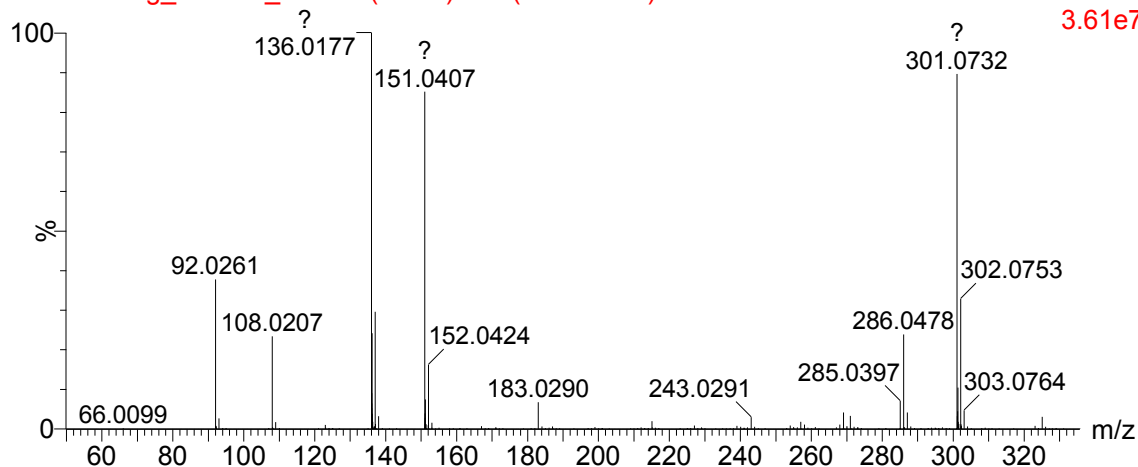
1: TOF MS ES-
7.56e7



2. att. Lignīna modeļvielas 2 (izoeiganola) TOF-MS (ESI-) spektrs

6 vanillin-neg_010317_1 1444 (5.595) Cm (1439:1449)

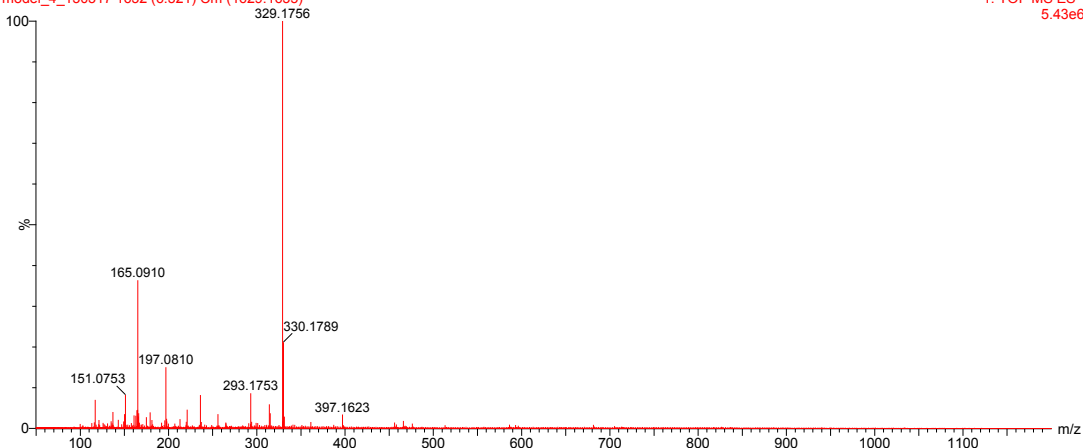
1: TOF MS ES-
3.61e7



3.att.Lignīna modeļvielas 3 (vanilīna) TOF-MS (ESI-) spektrs

model_4_130317 1632 (6.321) Cm (1629:1635)

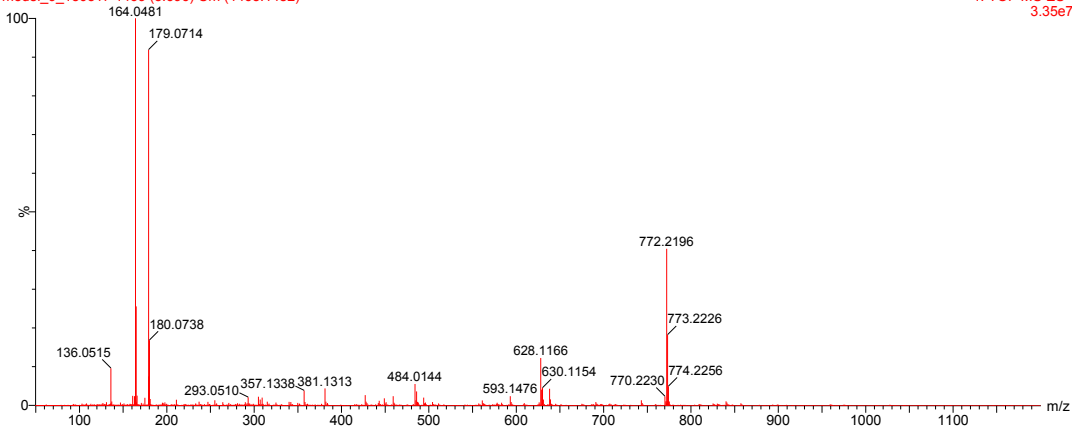
1: TOF MS ES-
5.43e6



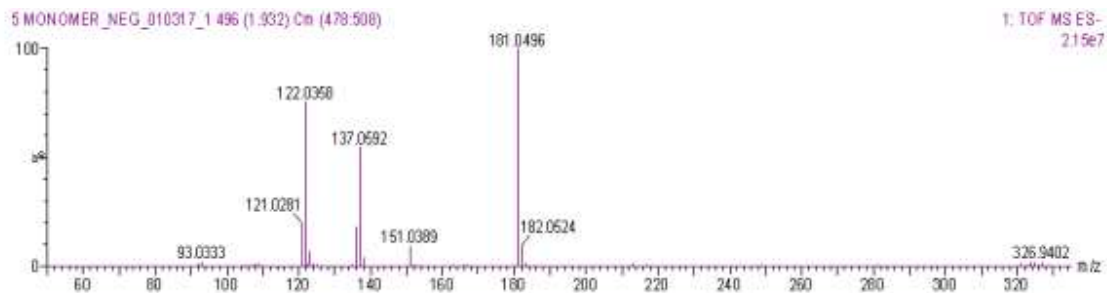
4.att.Lignīna modeļvielas 4 (acetovanilona) TOF-MS (ESI-) spektrs

model_9_130317 1469 (5.696) Cm (1463:1482)

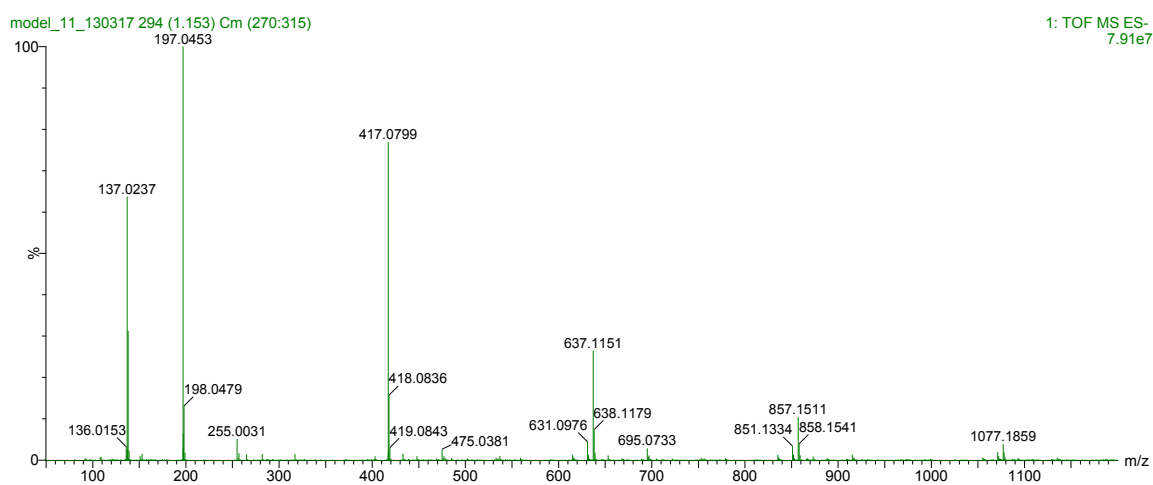
1: TOF MS ES-
3.35e7



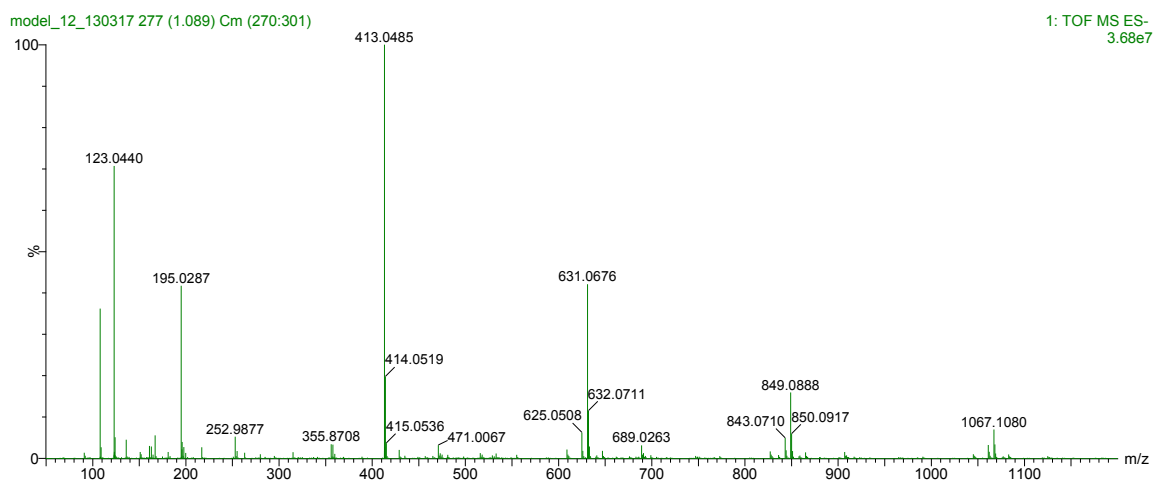
5.att.Lignīna modeļvielas 5 (propiovanilona) TOF-MS (ESI-) spektrs



6.att.Lignīna modeļvielas 6 (homovanelīnskābes) TOF-MS (ESI-) spektrs



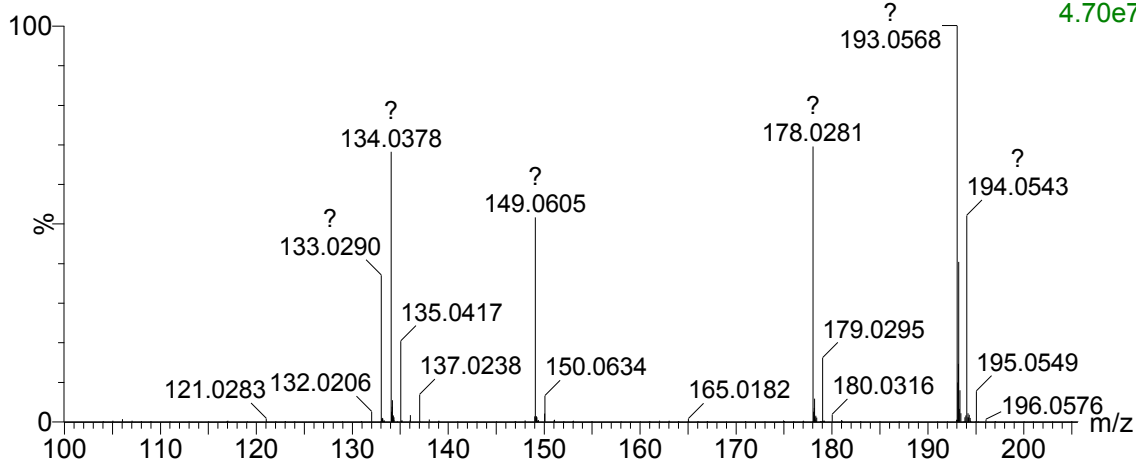
7.att.Lignīna modeļvielas 7 (vanelīnmandeļskābes) TOF-MS (ESI-) spektrs



8.att.Lignīna modeļvielas 8 (vanelīnglikoskābes) TOF-MS (ESI-) spektrs

FERULIC ACID_NEG_20217_1 1653 (6.405) Cm (1650:1660)

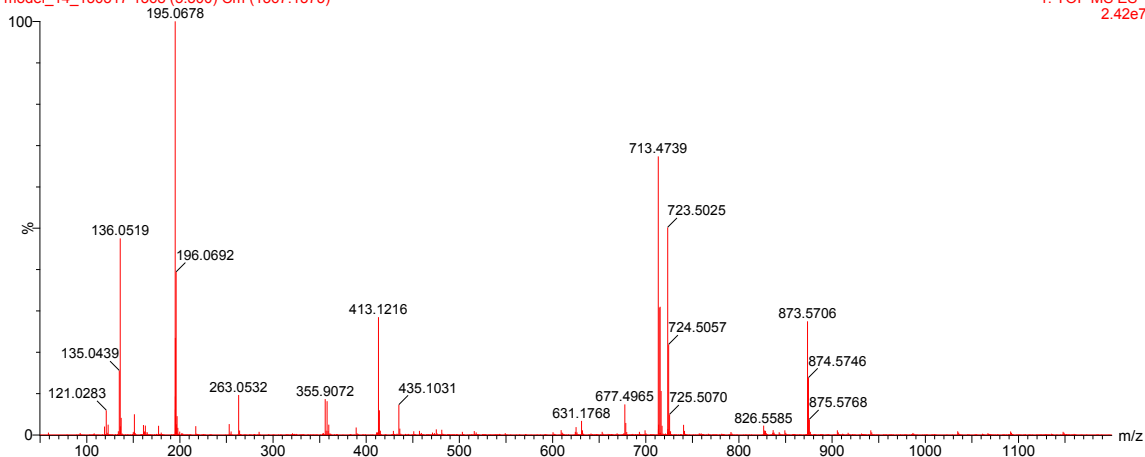
1: TOF MS ES-
4.70e7



9.att.Lignīna modeļvielas 9 (ferulskābes) TOF-MS (ESI-) spektrs

model_14_130317 1368 (5.300) Cm (1367:1373)

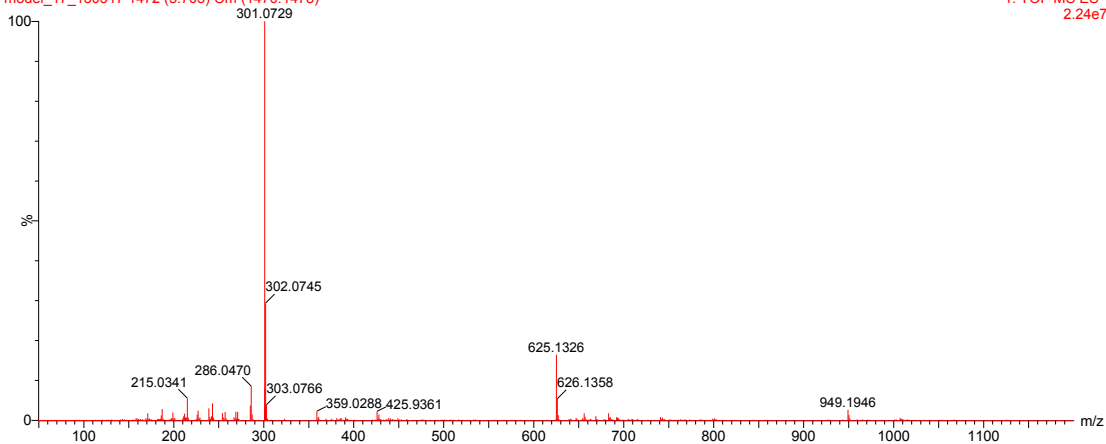
1: TOF MS ES-
2.42e7



10.att.Lignīna modeļvielas 10 (dihydroferulskābes) TOF-MS (ESI-) spektrs

model_17_130317 1472 (5.705) Cm (1470:1478)

1: TOF MS ES-
2.24e7



11.att.Lignīna modeļvielas 11 (divanilīna) TOF-MS (ESI-) spektrs