

LATVIJAS UNIVERSITĀTES
ĶĪMIJAS FAKULTĀTES

**SAPONĪNU SATURA IZVĒRTĒJUMS
GRAUDAUGOS UN TO PĀRSTRĀDES PRODUKTOS**

MAĢISTRA DARBS

Autore: Rūta Spruksta

Studenta apliecības Nr.: rs09025

Darba vadītāja: Dr. ķīm., asoc. prof. Ida Jākobsone

RĪGA

2016

ANOTĀCIJA

Saponīnu satura izvērtējums graudaugos un to pārstrādes produktos. Spruksta R., darba vadītājs Dr. ķīm., asoc. Prof. Jākobsone I. Maģistra darbs, 56 lappuses, 13 attēli, 15 tabulas, 45 literatūras avoti, 2 pielikumi. Latviešu valodā.

Darbā apkopota literatūra par graudaugiem, saponīniem, saponīnu savienojumiem, saponīnu noteikšanas metodēm, saponīnu bioloģiskajām un farmakoloģiskajām īpašībām. Eksperimentāli ar gravimetrisko noteikšanas metodi ir iegūti saponīnu savienojumi glikozīdu veidā, aprēķināts to saturs un novērtēta sakarība starp graudaugu veidiem un to pārstrādes produktiem. Ar spektrofotometrisko metodi, izmantojot vanilīna–perhlorskābes šķīdumu maisījumu, noteikts kopējo saponīnu savienojumu saturs graudaugos un to pārstrādes produktos. Modificējot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfijas metodi, kvalitatīvai saponīnu savienojumu noteikšanai, auzu graudu un auzu pārslu paraugiem, kvantitatīvi noteikti triterpenoīdo saponīnu savienojumi (oleanolskābe un ursolskābe). Efektīvākai saponīnu savienojumu izdalīšanai no graudaugu matricas tiek pielietotas četras paraugu sagatavošanas metodes. Rezultāti un darba gaitā pielietotās metodes savstarpēji salīdzinātas.

GRAUDAUGI, AUZU PĀRSLAS, SAPONĪNI, OLEANOLSKĀBE, URSOLSKĀBE, GRAVIMETRIJA, SPEKTROFOTOMETRIJA, AEŠH.

ABSTRACT

Evaluation of the saponin content in cereals and cereal-based processed products.

Spruksta R., supervisor Dr. chem., assoc. prof. Jakobsons I. Master thesis, 56 pages, 13 figures, 15 tables, 45 literature references, 2 appendices. In Latvian.

Information about cereals, saponins, saponin compounds, saponin determination methods and their biological and pharmacological features has been studied. Saponin compounds in glycoside form, their content calculations and the connection between cereals and cereal-based processed products was determined experimentally using gravimetric method. The total saponin compound, in cereals and cereal-based processed products, were determined applying spectrophotometric method, using vanillin-perchloric acid solution. The saponin triterpenoid compounds (oleanolic acid and ursolic acid) were determined quantitatively by modifying high-performance liquid chromatography, for qualitative saponin compound determination, in cereals and cereal-based processed products. For more effective saponin compound extraction from cereal matrix, four sample preparation methods were used. The results and methods applied in the study were compared to each other.

CEREALS, OATMEAL, SAPONINS, OLEANOLIC ACID, URSOLIC ACID, GRAVIMETRY, SPECTROPHOTOMETRY, HPLC.

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	5
IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1. Graudaugi un to raksturojums	7
1.2. Saponīnu raksturojums	10
1.3. Saponīnu bioloģiskās un farmakoloģiskās īpašības	15
1.4. Oleanolskābe un ursolskābe	16
1.5. Ekstrakcijas metodes, to ietekmējošie faktori	17
1.6. Saponīnu noteikšanas metodes	20
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	25
2.1. Izmantotā aparatūra	25
2.2. Reaģenti	25
2.3. Analizējamo paraugu raksturojums	26
2.4. Saponīnu satura gravimetriska noteikšana	28
2.5. Kopējo saponīnu savienojumu satura spektrofotometriska noteikšana	29
2.6. Oleanolskābes un ursolskābes noteikšana ar AEŠH metodi	32
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	37
3.1. Saponīnu satura gravimetriska noteikšana	37
3.2. Kopējo saponīnu savienojumu satura spektrofotometriska noteikšana	38
3.3. Oleanolskābes un ursolskābes noteikšana ar AEŠH metodi	41
3.3.1. Linearitāte, noteikšanas robeža (LOD) un kvantificēšanas robeža (LQD)	45
3.3.2. Oleanolskābes un ursolskābes kvantitatīva noteikšana paraugos	46
SECINĀJUMI	50
PATEICĪBA	51
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	52
PIELIKUMI	56
1. pielikums Spektrofotometriskās metodes rezultātu apkopojums	
2. pielikums AEŠH metodes attēlotās hromatogrammas	

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

- AEŠH – augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija;
- AU – absorbcijas vienība;
- DI – drošības intervāls;
- FTIS – Furje transformācijas infrasarkanā spektroskopija;
- LOD – noteikšanas robeža;
- LQD – kvantificēšanas robeža;
- MAE – mikroviļņu veicināta ekstrakcija;
- PSH – plānslāņa hromatogrāfija;
- S – hromatogrāfijas signāla laukums;
- Sn – standartnovirze;
- UAEŠH – ultra augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija;
- UE – ultraskaņas ekstrakcija;
- UV – ultra violetā gaisma.

IEVADS

Medicīnā un uzturā lietojamie augi ir apdraudēti ar apkārtējās vides izraisītām patogēnām slimībām. Tās spēj izraisīt plašs organismu spektrs (piemēram, sēnes, baktērijas, vīrusi, parazitiskie augi, kukaiņi), kas ietekmē auga kopējo veselību un tālāku izmantošanu. Katrs augis ir nodrošināts ar dabīgu izveidotu aizsargslāni, viens no tiem ir saponīni. Saponīni ir sekundārie metabolīti, kuri sastopami daudz dažādu augu sugās (piemēram, pupās, zirņos, auzās, garšvielās, bērza tāsī). Tie ne tikai darbojas kā ķīmiska barjera, lai aizsargātu augus pret vīrusu, mikroorganismu infekcijām un dzīvnieku uzbrukumiem, bet pēdējo desmit gadu laikā ir augusi interese par to bioloģiskajām un farmakoloģiskajām īpašībām. Saponīnu savienojumiem atklātas antialergiskas, antibakteriālas, citotoksiskas, pretaudzēju un citas ļoti nozīmīgas īpašības.

Auzas no citiem graudaugiem atšķiras ar to, ka vienīgajām dabiski veidojas gan steroīdo, gan triterpenoīdo saponīnu savienojumi. Pārējos graudaugos un stiebrzālē saponīni nav atklāti. Tas pastiprina vēlmi izpētīt saponīnu saturu dažādu šķirņu auzu graudos un uzturā plaši lietojamās, rūpnieciski pārstrādātos (attīrītos) graudos. Papildināt graudaugu bioloģisko vielu sastāvu.

Darba mērķis: pierādīt un izvērtēt saponīnu saturu dažādu šķirņu graudaugos un to pārstrādes produktos, ar darbā izmantotām noteikšanas metodēm.

Darba uzdevumi:

- iepazīties un apkopot literatūru par graudaugiem, graudaugu pārstrādes produktiem, saponīniem, saponīnu bioloģiskajām un farmakoloģiskajām īpašībām, saponīnu iegūšanas un noteikšanas metodēm;
- gravimetriski un spektrofotometriski noteikt saponīnu saturu dažādu šķirņu auzu graudos, miežu graudos, miežu grūbās un uzturā plaši lietojamās auzu pārslās;
- ar AEŠH metodi noteikt oleanolskābes un ursolskābes saturu dažādu šķirņu auzu graudos, miežu graudos, miežu grūbās un uzturā plaši lietojamās auzu pārslās.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Graudaugi un to raksturojums

Graudaugi jeb labība ir graudzāļu *Poaceae* dzimtas kultūraugi. Graudaugiem mūsdienās ir liela nozīme cilvēku un dzīvnieku uzturā, pārtikas aprītē un enerģijas ražošanā (biogāze, bioetanolis). Galvenajiem graudaugiem ir kvieši, kukurūza, rīsi, mieži, prosa, auzas un rudzi. Pasaulē tos audzē aptuveni 60% no lauksaimniecībā izmantojamās zemes. Visu labību audzēšanas princips ir praktiski vienāds. Tie ir viengadīgi augi, kas dot vienu ražu. Klimatam ir liela nozīme to audzēšanā. „Siltās sezonas” graudaugus (kukurūza, rīsi, prosa) audzē tropu zemienēs. Rīsiem ir nepieciešams liels siltums un mitrums, bet prosai ir nepieciešami sausi audzēšanas apstākļi. „Vēsās sezonas” graudaugi (kvieši, rudzi, mieži un auzas) vislabāk aug mērenajā klimatā [1, 2].

Kvieši. Kviešu graudi ir visvairāk audzētā labība pasaulē. Galvenās kviešu šķirnes ir mīkstie kvieši (*Triticum vulgare*), cietie kvieši (*Triticum durum*) un pundurkvieši (*Triticum compactum*). Mīksto kviešu miltus, audzētus dažādos klimatiskajos apstākļos, parasti izmanto maizes un konditorejas izstrādājumu cepšanā. Cietie kvieši piemēroti pastas un makaronu pagatavošanai [3].

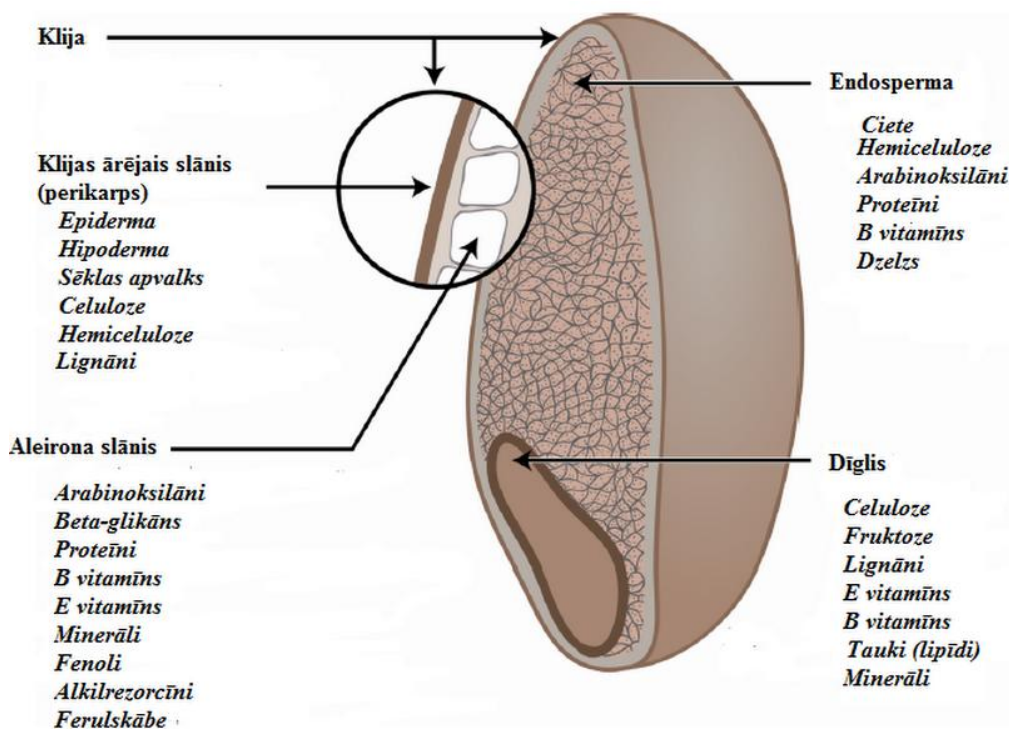
Mieži. Miežu graudi (*Hordeum vulgare*) ir ceturtais plašāk izplatītais graudaugs, tūlīt pēc kviešiem, rīsiem un kukurūzas. Tos galvenokārt izmanto uzturā, lopbarībā un iesala ražošanā alkoholiskajos dzērienos. Mieži aug dažādos klimatiskajos apgabalos, piemēram, mērenajos, subarktiskajos un subtropu. Tie ir izturīgāki pret sausumu un karstumu, nekā citi graudaugi. Graudi satur augstu ogļhidrātu, olbaltumvielu, kalcija, fosfora un B vitamīna daudzumu. Miežu miltus neizmanto maizes cepšanā, jo tie satur maz lipekli un elastīgo proteīnu vielu. Uzturā daudzās pasaules daļās plaši izmanto miežu grūbas, kas ir miežu graudu pārstrādes produkts. Miežu graudu pulēšanas laikā, veselais kodols tiek atdalīts no ārējās mizas un kliju slāņa [3].

Rudzi. Rudzu graudus (*Secale cereale*) mēdz saukt arī par ziemas rudziem. Tos galvenokārt izmanto rudzu maizes cepšanai un alkoholisko dzērienu (piemēram, viskija) ražošanai [3]. Rudzi satur augstu šķiedrvielu saturu, bioloģiski aktīvās vielas ar antioksidanta īpašībām un to pielietojums pārtikā pozitīvi ietekmē cilvēka veselību [4].

Auzas. Auzu graudi ietver lielu skaitu šķirņu, tostarp vispazīstamākās ir sējas auzas (*Avena sativa*), velna auzas (*Avena strigosa*) un savvaļas auzas (*Avena sterilis*). Auzas audzē daudzās valstīs, bet tās nav piemērotas Vidusjūras klimatam. Šiem graudiem ir augsts

tauku saturs, tos plaši lieto uzturā kā auzu pārslas, auzu miltus un lopbarību [3]. Tie ir pazīstami kā unikāls uzturvielu avots ar augstu olbaltumvielu (13-22%) un labi sabalansētu aminoskābju saturu. Auzu graudu taukos nepiesātināto taukskābju saturs ir lielāks nekā kviešu, miežu un rudzu taukos. To sastāvā ir linolskābe, linolēnskābē un oleīnskābe. Graudos ir liels šķiedrvielu saturs, viens no tiem ir (1-3), (1-4) β -D – glikāns vai arī ASB – glikāns [5].

Grauda uzbūve. Graudu veido trīs galvenās sastāvdaļas – klijas, dīglis un endosperma (skat. 1.1. att.). Zem grauda ārējā aizsargājošā apvalka – plēksnes, atrodas vairāki (4–5) grauda apvalka slāņi, piemēram, ārējais un iekšējais slānis (perikarps) un aleirona slānis. Šīs daļas tiek atdalītas graudu apstrādes procesā un veido tās saucamās klijas. Ārējais grauda apvalks aizsargā graudu no vides, tai skaitā ūdens, mikroorganismu un kaitēkļu nelabvēlīgās ietekmes. Zem vairākām graudu kārtām, grauda vidū (kodolā) atrodas endosperma, kurās uzkrājas galvenās barības rezerves, piemēram, ciete (50-75% no grauda masas). Pārējo endospermas daļu veido proteīni, šūnu sieniņu polimēri, vitamīni, minerālvielas un šķiedrvielas [6].



1.1. att. Grauda uzbūve, ķīmiskās un bioloģiski aktīvās vielas [7]

Graudu ķīmiskais un bioloģiski aktīvo vielu sastāvs. Grauda bioķīmisko struktūru veido oglehidrāti, olbaltumvielas jeb proteīni, tauki jeb lipīdi, mikroelementi, vitamīni, ūdens un šķiedrvielas (skat. 1.1. tabulu). Jau iepriekš pieminēts, ka graudā visvairāk ir ciete (50-70%), proteīni (8-30%), tauki (3-10%), šķīstošās un nešķīstošās šķiedrvielas (5-15%), minerālvielas. Grauda bioķīmisko sastāvu var ietekmēt gan šķirņu ģenētiskās īpašības, gan audzēšanas apstākļi, kas var būtiski atšķirties starp dažādām šķirnēm un sugām. Dažādās graudu daļās bioķīmisko vielu sastāvs un koncentrācijas ir atšķirīgas. Visvērtīgākās vielas ir bioloģiski aktīvās vielas – minerālvielas, vitamīni un citi bioķīmiski savienojumi. Tām ir liela nozīme ne tikai grauda dzīvības procesu uzturēšanā, bet arī cilvēku veselības uzlabošanā [6].

1.1. tabula

Graudaugu sastāvs [8]

Sastāvs	Kvieši	Mieži	Rudzi	Auzas
Mitrumš, %	10,0	10,6	10,5	9,8
Proteīni, %	14,3	13,0	13,4	12,0
Tauki (lipīdi), %	1,9	2,1	1,8	5,1
Šķiedrvielas, %	3,4	5,6	2,2	12,4
Pelnvielas, %	1,8	2,7	1,9	3,6
Vitamīns B1 (tiamīns), mg/kg	5,5	5,7	4,4	7,0
Vitamīns B2 (riboflavīns), mg/kg	1,3	2,2	1,8	1,8
Vitamīns PP (niacīns), mg/kg	63,6	64,5	1,3	17,8
Pentotēnskābe mg/kg	13,6	7,3	7,7	14,5

Hemiceluloze ir polisaharīdu grupa, kas saistīta ar augu šūnu sienīņu komponentiem, piemēram, ar celulozes, olbaltumvielas, lignīnu un fenola savienojumiem. Graudaugos hemicelulozei klāt parasti ir arabinoksilāni, beta-glikāns un pektīni [7].

Graudi ir dabīgs E vitamīna avots cilvēkam. Tiek saukts arī par tokoferolu. E vitamīns ir antioksidants, kas cilvēka organismā spēj darboties šūnu līmenī, aizsargājot to apvalkus no brīvo radikāļu ietekmes, kā arī kontrolē selēna daudzumu organismā [9].

Fitosteroli, saukti arī par auga steroliem. Visvairāk fitosterolu sastopami tieši diedzētos graudos. Tie ir specifiski ķīmiski savienojumi augos, līdzīgi pārtikas holesterīnam, tikai tie neabsorbējas cilvēka organismā, bet spēj regulēt holesterīna daudzumu. Visvairāk fitosterolu sastopami tieši diedzētos graudos [6].

Graudos sastopami arī lignāni – augu ķīmiskās struktūras – fitoestrogēni [8], kas ir auga hormons ar antioksidantu īpašībām. Lignānus nav iespējams noteikt „attīrītos” graudos, jo tie koncentrējas galvenokārt tikai grauda ārējā apvalkā. Visvairāk lignāni sastopami pilngraudu kviešu, auzu un rudzu miltos [6].

Daudzas bioloģiski aktīvās vielas ir kopīgas vairākiem augu pārtikas produktiem, piemēram, fenola rindas savienojumi, bet tikai auzu graudos sastopami fitoaleksīni, kas ir uzskatāmi par augu valsts antibiotiku. Tā atbild par augstu antioksidantu aktivitāti pilngraudu produktos [6].

Graudu pārstrāde. Graudu pārstrādes procesā tie zaudē daudz bioloģiski aktīvās vielas. Tā kā veselus, neapstrādātus graudus nav iespējams izmantot pārtikā, pierādījies, ka pārstrādes procesi ļauj graudus attīrīt no ārējā apvalka, grauda daļiņām un no kaitīgām aizsargvielām, kas graudam veidojas dabīgā ceļā. Līdz ar to, apstrāde palīdz bioloģiski aktīvajām vielām atbrīvoties no pārējās grauda struktūras, ļaujot tām vieglāk uzsūkties cilvēka organismā. Pārstrādes procesos jāizmanto pareizas tehnoloģijas [10].

1.2. Saponīnu raksturojums

Saponīni ir sekundārie metabolīti, kuri sastopami daudz dažādu augu sugās (piemēram, ārstniecības augos, ziepjusaknē, zirņos, pupās, auzās, garšvielās). Saponīnu nosaukums ir atvasināts no latīņu valodas „*Sapo*”, kas nozīmē ziepes. Tie darbojas kā ķīmiska barjera, lai aizsargātu augus pret vīrusu un mikroorganismu infekcijām un dzīvnieku uzbrukumiem. Tie uzkrājas visās auga daļās vai atsevišķos orgānos – sakneņos un saknēs, lapās, ziedos vai augļos. Saponīni tiek saukti par toksiskām vielām, kas palīdz augam izdzīvot [11].

Saponīniem piemīt virsmaktīvas vielas īpašības, ar ko ir iespējams atšķirt tos no citiem glikozīdiem, kuri šķīst ūdenī un veido koloīdu šķīdumu. Augus, kas satur saponīnus, piemēram, ziepjusakne (*Saponaria officinalis*), jau gadsimtiem tikusi plaši izmantota, kā mazgāšanas līdzeklis, pateicoties tās amfifiliskai dabai, lipīdos šķīstošajām un ūdenī šķīstošajām saitēm. Saponīnus izmantoja mājlapiem kā barības piedevu, lai palielinātu iegūtā piena un vilnas apjomus. Āzijas un Klusā okeāna zvejnieki, izmantojuši par zivju indi, lai palielinātu noķerto zivju apjomus [12].

Saponīnus izmanto ne tikai sadzīvei, bet to bioloģisko īpašību dēļ nesēn tika atklāts pielietojums farmācijā. Vispazīstamākās īpašības ir pretiekaisuma, pretvēža, pretvīrusu, antibakteriālas, audzēju šūnu augšanu apturošas un citas īpašības [13].

Pārtikā vai dzīvnieku barībā sastopamais saponīns netiek uzskatīts par uzturvielu, jo tie var palielināt dzīvnieku šūnu caurlaidību, neatgriezeniski apvienojoties ar to membrānu stearīniem. Ir veikti pētījumi ar žurkām, ievadot lielu devu saponīna, kas izraisa caureju, histo-patoloģiskas izmaiņas aknās un nierēs, kā rezultātā noved pie žurku nāves. Saponīnu toksiskums tiek uzskatīts par zemu, bet to uzņemot lielā koncentrācijā, var ietekmēt citu uzturvielu uzsūkšanos organismā, ogļhidrātu sagremošanu un lipīdu metabolisma vielmaiņu [13].

Saponīni ir lielas molekulas, kas satur hidrofobo daļu. Tās sastāv no triterpenoīda (30 oglekļa atomiem) vai steroīda (27 oglekļa atomi ar 6 gredzenu spirostāna vai 5 gredzenu furostāna struktūru) pamata un hidrofilo daļu, kas sastāv no vairākām monosaharīdu atliekām. Triterpenoīdo saponīnu savienojumi parasti atrodas divdīgļlapju (piemēram, sojas pupas, pupas, zirņi, tēja, cukurbietes, auzas, spināti) augos, turklāt steroīdu saponīni atrodas viendīgļlapju augos (piemēram, auzas, pipari, baklažāni, tomātu sēklas, puravi, sīpoli) (skat. 1.2. tabulu) [14].

1.2.tabula

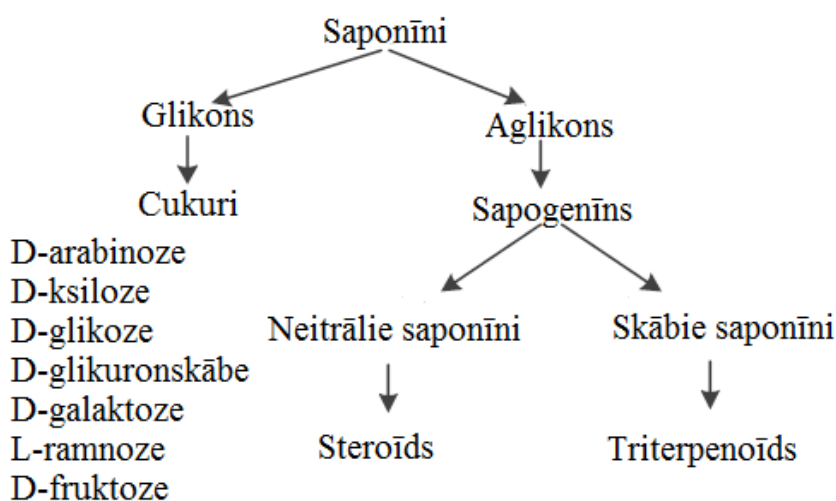
Triterpenoīdo un steroīdo saponīnu savienojumi dažādos augos

<i>Triterpenoīdo saponīnu savienojumi</i>	<i>Steroīdo saponīnu savienojumi</i>
Graudzāļu dzimta: Velna auzas (<i>Avena strigosa</i>), Sējas auzas (<i>Avena sativa</i>)	Graudzāļu dzimta: Velna auzas (<i>Avena strigosa</i>), Sējas auzas (<i>Avena sativa</i>), Klūdziņprosa (<i>Panicum virgatum</i>)
Balandu dzimta: Parastā biete (<i>Beta vulgaris</i>), Kvinoja sēklas (<i>Chenopodium quinoa</i>)	Nakteņu dzimta: Sarkanie pipari (<i>Capsicum frutescens</i>), Ēdamais tomāts (<i>Solanum lycopersicum</i>), Kartupelis (<i>Solanum tuberosum</i>)
Pākšaugu dzimta: Sējas zirņi (<i>Pisum sativum</i>), Sarmatainā soja (<i>Glycine max</i>), Lucerna (<i>Medicago truncatula</i>), Parastās pupiņas (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Sīpolu dzimta: Ķiploki (<i>Allium sativum</i>), Nokarenais sīpols (<i>Allium nutans</i>), Puravs (<i>Allium porrum</i>), Dārza sīpols (<i>Allium cepa</i>), Maurloks (<i>Allium schoenoprasum</i>)
Tējas koka dzimta: Tējas koks (<i>Camellia sinensi</i>)	

Novērots, ka jauniem augiem raksturīgs augstāks saponīnu saturs, nekā nobriedušiem un gados vecākiem augiem. Saponīnu saturu augos var ietekmēt vides fizioloģiskais stāvoklis un uzglabāšanas apstākļi pēc to novākšanas. Tos iegūst no dažādām auga daļām, piemēram,

kā saknēm, lapām, augļiem, mizām un ziedu kātiem, kur to kopējais saturs var ievērojami atšķirties [14].

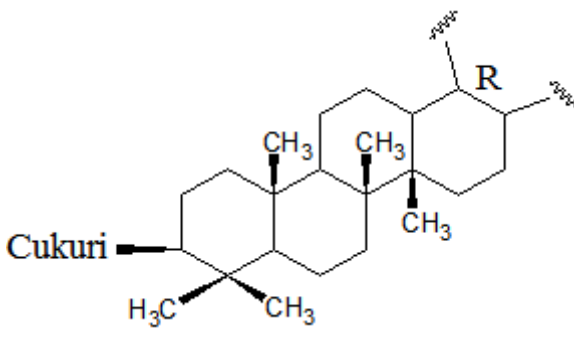
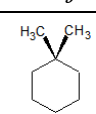
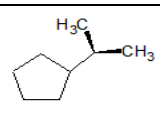
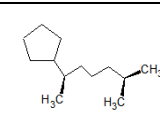
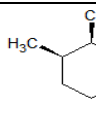
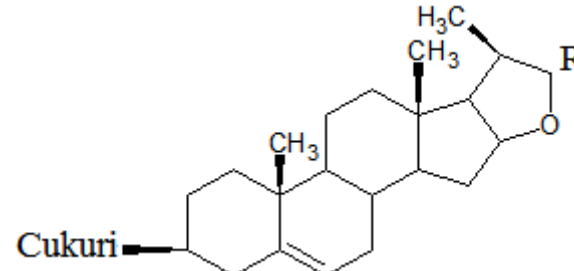
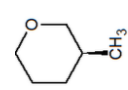
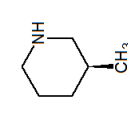
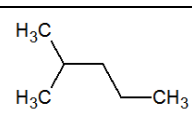
Saponīnu ķīmiskā struktūra. Saponīni ir glikozīdu savienojumi. To struktūra sastāv no aglikona, kas pazīstams kā sapogenīns – ūdenī nešķīstošiem savienojumiem (steroīda, triterpenoīda vai alkoloīda formā) un glikona - ūdenī šķīstošajiem cukuru savienojumiem (L–arabinoze, D–ksiloze, D–glikoze, D–glikuronskābe, D–galaktoze, L–ramnoze, D–fruktoze), kuri atšķiras pēc to veida un kopējā cukura daudzuma [15, 16]. Saponīna sadalījuma struktūru attēlota 1.2. attēlā.



1.2. att. Saponīna sadalījuma struktūra

Glikona daļu saponīna struktūrā sauc par oligosaharīdiem. Oligosaharīdi pie sapogenīna ir saistīti ar estera vai ētera glikozīdisko saiti pie vienas vai divām glikozilēšanas vietām [17]. Aglikons var saturēt vienu vai vairākas nepiesātinātas C–C saites. Kad oligosaharīda ķēde ir pievienota pie 3 molekulas oglekļa atoma, tad to sauc par monodesmosīda saponīnu, bet saponīni, kas papildināti ar cukura atlikumu pie 26 vai 28 oglekļa atoma, tiek saukti par bidesmosīda saponīnu. Atkarībā no aglikona dabas, saponīnus iedala divās galvenajās grupās: saponīni ar steroīda aglikonu un saponīni ar triterpenoīda jeb triterpēna aglikonu (skat. 1.3. tabulu) [16, 18].

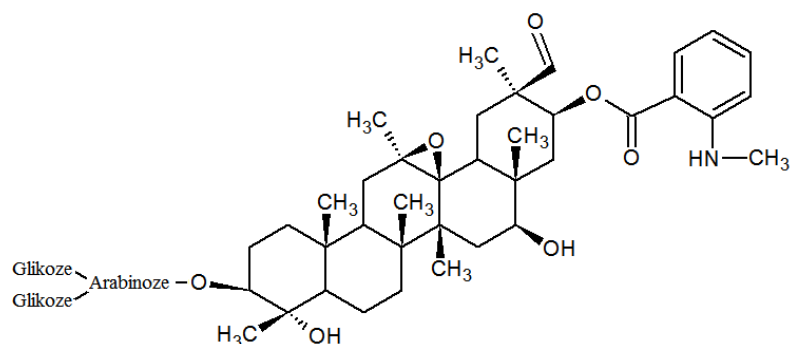
Iespējamās saponīnu aglikona formas

Aglikona veids	Aizvietotājs pie R	Aglikona forma
Triterpenoīda 		Oleanāna (Oleanane)
		Hopāna (Hopane)
		Dammarāna (Dammarane)
		Ursāna (Ursane)
Steroīda 		Spirostāna (Spirostane)
		Glikoalkoloīda (Glycoalcaloid)
		Furostāna (Furostane)

Saponīni graudaugos. Auzas no citiem graudaugiem atšķiras ar to, ka vienīgajām dabiski veidojas gan steroīdo, gan triterpenoīdo saponīnu savienojumi. Pārējos graudaugos un stiebrzālē saponīni nav pētīti.

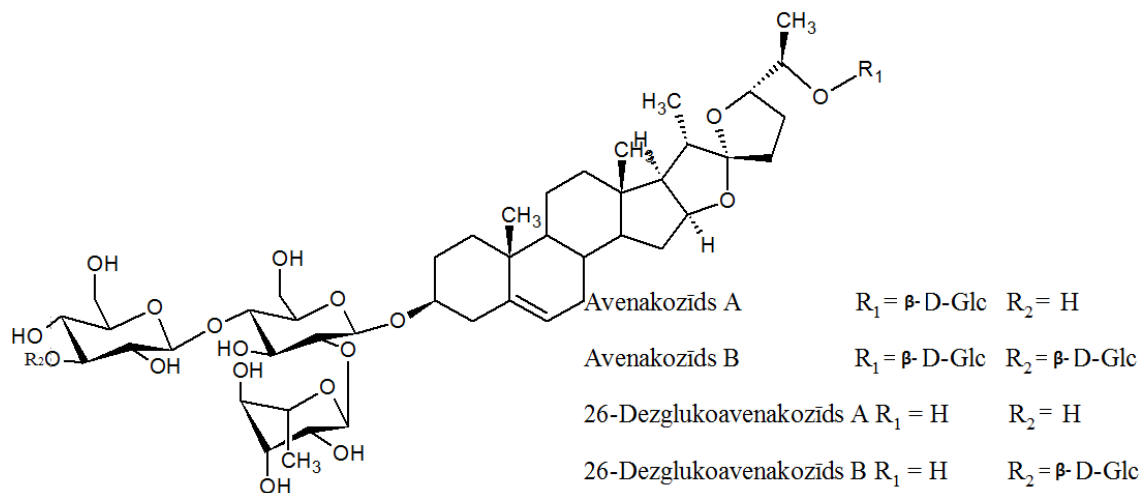
Pēc veiktajiem pētījumiem, ir pierādījies, ka auzas satur divu veidu saponīnus – steroīda avenakozīdu (avenacosides) un oleanāna tipa triterpenoīda avenacīnu (avenacin). Savienojumi atrodami auzu saknēs, lapās un grauda kodola ārējos slāņos [13].

Avenacīns ir avenacīna A-1, A-2, B-1, un B-2 strukturāli saistīti triterpenoīdo saponīnu savienojumi, kuri visvairāk atrodami auzu saknēs, galvenokārt aktivizējas avenacīna A-1 formā (skat. 1.3. att.) [19]. Avenacīns A-1 ir esterificēts ar N-metilantranil skābi, kas fluorescē ultravioletā gaismā. Tie var kavēt sēnīšu un patogēno vīrusu (piemēram, *G.graminis*) veidošanos, kas graudaugiem izraisa lielus ražas zaudējumu [13, 20].



1.3. att. Triterpenoīda saponīna avenacīna A-1 ķīmiskā struktūra

Avenakozīds atrodams auga vakuolās, grauda endospermā un aktivizējas audu bojājumu gadījumā, ko izraisa patogēnie vīrusi, sagraujot auga membrānas. Pēc 1.4. attēla, var redzēt, ka spirostāna tipa aglikona avenakozīda A un B steroīdos saponīnus ir iespējams pārveidot aktīvajās pretsēnīšu 26-dezglukoavenakozīda (26-dezglukoavenacoside) A un B formās [13].



1.4. att. Steroīdālā avenakozīda saponīna iespējamo formu ķīmiskā struktūra

1.3. Saponīnu bioloģiskās un farmakoloģiskās īpašības

Citotoksiskā un pretaudzēju aktivitāte. Veikti daudz zinātniski pētījumi saistībā ar saponīnu citotoksiskajām īpašībām, bet ne vienmēr tie bija veiksmīgi. Saponīnu citotoksiskais mehānisms veidojas nomācot DNA šūnu pārveidošanos, tādējādi izraisot atgriezenisku fenotipisku reakciju audzēja šūnās. Kad pretaudzēja mehānisms norit nomācoši iedarbojoties uz/ap audzēju novietotajām šūnām, tiek mazināta audzēja augšana. Metastāzes nomākšana un imūnsistēmas stimulēšana ir svarīgi faktori. Saponīni tiek bieži izmantoti vēža ārstēšanā, jo gandrīz visi izraisa apoptozi un iznīcina audzēja šūnas. Tiem ir mazi negatīvie blakus efekti, kas neizraisa nekrozi [21].

Pretvīrusu aktivitāte. Daži saponīni (ar oleanāna tipa sapogenīnu) var nomākt DNA sintēzi herpes infekcijas izraisītājā „*Herpes simplex*” vīrusā (HSV), savukārt ursāna tipa sapogenīni nomāc tā paša vīrusa kapsīda proteīnu. Citi saponīni ierobežo otra tipa *poliomielīta* (smaga injekcijas slimība, ko izraisa *poliovīruss*) vīrusa ietekmi. Veikti eksperimentāli pētījumi uz trušiem, kur šie savienojumi spēj samazināt keratītu, ko izraisījis HSV. No lakricas saknes (*Glycyrrhiza glabra*) iegūtajam saponīna savienojumam – glicirizīnam ir vislielākā bioaktivitāte. Tas spēj aizturēt vīrusus (piemēram, HIV–1), kas ietekmē DNA un RNA. Darbības pamatprincips ir nomākt kināzes C proteīnu un enzīma atjaunošanos, kas savieno šos vīrusus ar CD4+ receptoriem, kuri sastopami T šūnās [12; 21].

Preteikaisuma un antialerģiska aktivitāte. Saponīnu preteikaisuma aktivitātes pētīšana ir veikta izraisot iekaisumu ar karaginānu (pārtikā izmanto kā stabilizatoru vai emulgatoru). Oleanāna un ursāna sapogenīniem ir vislielākā preteikaisuma un antialerģiskā aktivitāte. To iedarbība tiek skaidrota ar garozas mimētiskās aktivitātes ierobežojošo iedarbību uz iekaisuma izdalītajiem mediatoriem, kuri degradējoši iedarbojas uz glikokortikoīdu. Tiek nomākta ofenzīmu veidošanās un normalizēta palielināto asinsvadu caurlaidība [21].

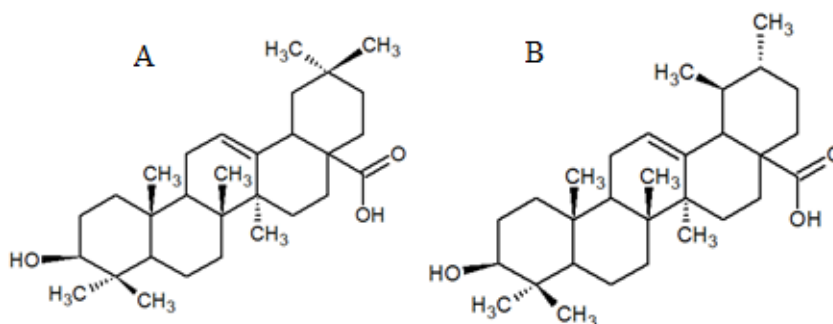
Pretsēnīšu, pretparazītu un antibakteriāla aktivitāte. Pēdējo 20 gadu laikā ir augusi interese par antimikrobālo līdzekļu iegūšanu no augiem, jo tradicionālās antibiotikas (galvenokārt tās, kuras iegūtas no mikroorganismiem) ir nepietiekoši efektīvas, kuras izraisa vairākas blakus parādības, kā arī ar laiku var veidoties noturīgas šūnu slimības [22]. Saponīnu pretsēnīšu, pretparazītu un antibakteriālā aktivitāte ir spēja veidot savienojumus ar holesterīna membrānu, kā rezultātā palielinās to caurlaidība un citoplazmas satura noplūde [23].

Moluscidāla aktivitāte. Dažiem saponīniem piemīt moluscidāla aktivitāte, (spēja atbaidīt vai pat nogalināt gliemežus un moluskus) pret *Biomphalaria glabrata*, starpposma *Schistosoma mansoni* parazītu nēsātāju, kas izraisa šistosomozi. Šistosomoze ietekmē miljoniem cilvēkus Āzijā, Āfrikā un Dienvidamerikā. Monodesmosīdiskajiem saponīniem,

kuri satur oleanolskābes sapogenīnu, ir vislielākā ietekme pret šo slimību, jo tie ar lielāku intensitāti iedarbojas uz parazīta šūnu membrānās esošo holesterīnu. Rezultātā veicinot poru veidošanos, kas nodrošina šķidrums noplūdi. Šādā pašā veidā iedarbojas arī ekotoksiskie spermicīdi (vielas, kas izraisa tiešus vai aizkavētus draudus vienam vai vairākiem vides elementiem), kuri sastopami dažos saponīnos. Vienīgais veids, kā ierobežot šistosomozes attīstību ir iznīcināt starpposma nēsātājus un ķīmijas terapijas pielietošana. Šobrīd izplatītākais molusticīds ir niklosamīds, tiem ir liels potenciāls alternatīvās ķīmijas terapijas izstrādei [23, 24].

1.4. Oleanolskābe un ursolskābe

Oleanolskābe (oleanolic acid: 3 β -hidroksi-olea-12-en-28-oic acid) un tā izomērs ursolskābe (ursolic acid: 3 β -hidroksi-urs-12-en-28-oic acid) ir pentacikliski triterpenoīdu savienojumi ar 30 oglekļa atomiem (skat. 1.5. att.), kuri biosintētiski atvasināti no ciklizēta skvalēna. Skvalēns tiek uzskatīts par kopējo prekursoru gan steroīdu, gan triterpenoīdu biosintēzēm. Šie savienojumi augos sastopami kā brīvas skābes vai kā skābes ar glikona daļu (ar vienu vai vairākām cukura ķēdēm) [25].



1.5. att. Oleanolskābes (A) un ursolskābes (B) ķīmiskā struktūra

Oleanolskābe iegūta no vairāk nekā 1620 augu sugām, kur starp tiem ir daudzi pārtikas un ārstniecības augi. Nekonjugēts triterpenoīds, piemēram, oleanolskābe augos ir vasku veidā, kas augam novērš ūdens zudumu un kalpo kā aizsardzības barjera pret patogēniem vīrusiem. Dažos augos, piemēram, kā olīvu lapām oleanolskābe ir kristālu veidā, kura veido fizisku barjeru pret sēnīšu uzbrukumiem. Viena no svarīgākajām oleanolskābes farmakoloģiskajām īpašībām ir aknu darbību veicinoša aktivitāte. Ir pierādīts, ka oleanolskābe ne tikai efektīvi aizsargā aknas no ķīmiski izraisītajiem bojājumiem, bet arī pasargā no hroniskām aknu slimībām (ciroze un fibroze). Veikti vairāki pētījumi par oleanolskābes antioksidanta, pretvēža un pretiekaisuma īpašībām [26].

Ursolskābe kā hidroksilgrupas pentacikliskā triterpēna skābe ir sastāvdaļa vairākos ārstniecības augos un kā vaskam līdzīgs aizsargslānis ir atrodams dažādos augļos, piemēram, ābolos, bumbieros, olīvās, žāvētās plūmēs, dzērvenēs un vīģēs. Ursolskābei piemīt ievērojamas farmakoloģiskās īpašības, to starp, aknu darbību veicinošas, pretiekaisuma, pretidiabēta, antibakteriālas, pretvīrusu un pretvēža īpašības. Pēdējo desmit gadu laikā zinātnieku uzmanību pievērš skābes daudzfunkcionālai pretvēža aktivitātei. Mehānisma princips ir spēja izraisīt vēža šūnu apoptozi, novērst tumorogenitātes risku un kavēt vēža šūnu proliferāciju [27].

1.5. Ekstrakcijas metodes, to ietekmējošie faktori

Saponīnus no auga matricas var izdalīt ekstraktu veidā. Galvenie efektīvas ekstrakcijas faktori ir šķīdinātājs (ekstrahents), laiks, temperatūra, pH un auga materiāla īpašības (komponentu sastāvs, daļiņu izmērs). Ekstrakcijā visbiežāk lietotie šķīdinātāji ir ūdens, etanols, metanols un spirta ūdens maisījumi. Tas skaidrojams ar to, ka saponīni ir polāri savienojumi, līdz ar to nepieciešams arī polārs šķīdinātājs [28].

Lai palielinātu ekstrakcijas efektivitāti ir jāveic priekšapstrādes posms, kas ietver parauga žāvēšanu, sasmalcināšanu un attaukošanu, lai noņemtu lipofīlās vielas (izmantojot lipofīlu šķīdinātāju, piemēram, n-heksānu, petrolēteri, acetonu vai etilacetātu). Attaukošanu var veikt pirms ekstrakcijas vai ekstrakcijas laikā. Iepriekš tika minēts, ka visbiežāk izmantotie šķīdinātāji ir ūdens, etanols, metanols un spirta ūdens maisījumi. Ekstrakts pēc tam tiek izšķīdināts ūdenī un sajaukts ar n-butanolu (saponīni pāriet n-butanola slānī). Tālāk butanola maisījums tiek ietvaicēts līdz sausam atlikumam. Ir veikti pētījumi, lai iegūtu pēc iespējas tīrāku savienojumu, viens no ierosinājumiem ir apstrādāt ar dietilēteri vai acetonu un veikt dialīzes procesu, lai atdalītu šķīstošās ūdens molekulas un cukurus [29].

Saponīnu ekstrakcija un iegūšana nav viegla, dēļ to sarežģītās struktūras (dažādie aizvietotājie (OH, CH₃ vai COOH) pie aglikona daļas un dažādie monosaharīdi, oligosaharīdi). Saponīni nav gaistoši, ķīmiski un termiski nestabili savienojumi, kuru koncentrācija augos ir zema. Tādējādi jāpievērš lielāka uzmanība veicot ekstrakciju, piemērojot relatīvi vieglus apstākļus. Bieži saponīnu iegūšanai no auga materiāla pielieto paaugstinātas temperatūras ekstrakciju, kur par šķīdinātāju izmanto spirta-ūdens maisījumu, spirts tiek ietvaicēts un ūdens atlikums apstrādāts ar n-butanolu. Lielākās problēmas, kas var rasties šādas ekstrakcijas laikā ir nestabilās molekulas (piemēram, acilētās formas) sadalīšanās, veidojot artefaktus, nevis saponīnus. Ekstrakcijā ar metanolu, īpaši steroīdo saponīnu savienojumiem, var veidoties metil atvasinājumi. Tādējādi, izmantojot metanolu par

šķīdinātāju, ir labāk veikt auksto ekstrakciju. Pie ekstrakcijas problēmām jāatzīmē, ka daži ļoti polāri saponīni, piemēram, bidesmosīdi un tridesmosīdi var palikt ūdens slānī vai arī ekstrakcija var nebūt kvantitatīva [30].

Ekstrakciju metodes iedala divās grupās – klasiskajās un dabai draudzīgākajās metodēs. Klasiskajās metodēs pielieto lielu daudzumu polāro šķīdinātāju, paaugstinātu temperatūru un intensīvi maisa, lai iegūtu analizējamās vielas izdalīšanos no auga matricas. Videi draudzīgākās ekstrakciju metodēs tiek izmantoti drošāki ekstrahenti, kas veido enerģijas efektivitāti un apkārtējās vides piesārņojuma samazināšanu. Par galveno ekstrakcijas šķīdinātāju izmanto ūdeni. Nosakot saponīnu kvantitatīvo saturu konkrētajam augam, pētnieki iesaka izvēlēties dabai draudzīgākus ekstrakciju veidus un tehnoloģijas, piemēram, kā mikroviļņu vai ultraskaņas metodi, kas sniedz lielāku efektivitāti un iznākumus [31]. Visbiežāk lietotās ekstrakciju metodes saponīnu izdalīšanai no auga parauga ir mikroviļņu veicinātā ekstrakcija, ultraskaņas, soksleta un macerācijas ekstrakcijas.

Mikroviļņu veicinātā ekstrakcijas (MAE) metode. Metode pazīstama, kā videi draudzīga un ekonomiska ekstrakcijas metode, kuru plaši izmanto bioloģiski aktīvo savienojumu iegūšanai no dažādiem augiem. Mikroviļņu enerģija galvenokārt karsē materiāla molekulas tās iekšienē. Radītie viļņi var iespiesties auga materiālā un savstarpēji iedarboties ar polārām šķīdinātāja molekulām (piemēram, kā ūdens, etanols u.c.) tā iekšienē ģenerējot siltumu. Rezultātā auga šūnas iekšpusē palielinās spiediens, kas noved pie šūnapvalka pārraušanas [31].

Ir veikti ekstrakciju metožu pētījumi, kur tika savstarpēji salīdzināts reakcijas laiks, temperatūra un ekstrahenta tilpums. Kā piemēru var minēt, kopējo triterpenoīdo saponīnu savienojumu kolorimetrisku noteikšanu plakanpiepē (*Ganoderma atrum*), izmantojot četras ekstrakciju metodes (skat. 1.4. tabulu). Pēc sniegtajiem rezultātiem, šķīdinātāja patēriņa un ekstrakcijas laika, var secināt, ka MAE ir alternatīva metode saponīnu izdalīšanai no parauga [32].

Ekstrakciju metožu salīdzinājums kopējo triterpenoīdo saponīnu savienojumu satura noteikšanai

<i>Ekstrakcijas veidi</i>	<i>Ekstrakcijas laiks</i>	<i>Šķīdinātājs</i>	<i>Šķīdinātāja tilpums, mL/g</i>	<i>Kopējo saponīnu saturs, %</i>
Macerācijas ekstrakcija	12 h	95% etanols	40	2,58
Ultraskaņas ekstrakcija	30 min	95% etanols	60	1,72
Mikroviļņu ekstrakcija	5 min	95% etanols	25	5,11
Soksleta ekstrakcija	2h	95% etanols	40	2,22

Ultraskaņas ekstrakcijas (UE) metode. Atšķirībā no klasiskajām ekstrakciju metodēm (Soksleta un paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcija), ultraskaņas ekstrakcija ir viena no vienkāršākajām, efektīvākajām un trīs reizes ātrākajām ekstrakciju metodēm saponīnu izdalīšanai no dažādiem augu paraugiem [33].

Šīs metodes efektivitāti var raksturot ar tās radītajiem ultraskaņas viļņiem šķīdinātāju sistēmā. Tas palīdz šķīdumam iespieties auga šūnā, kas izraisa šūnu uzpūšanos, membrānu vājināšanu, pārraušanu un izšķīdušo vielu atbrīvošanos no matricas. Ar šo metodi var izdalīt interesējošos savienojumus no dažādām, sarežģītām augu matricām. Ekstrakcijā var izmantot jebkura veida polārus šķīdinātājus, bet viens no visbiežāk lietotajiem ir etanols vai ūdens-etanola maisījums [34].

Zinātnieki ar AEŠH metodi ir pētījuši oleanolskābes un ursolskābes saturu granātābola ziedos (*Punica granatum*), pielietojot dažādus ekstrakciju veidus. Pētījumā abu savienojumu iegūšanai par efektīvāko tika atzīta ultraskaņas ekstrakcija (skat. 1.5. tabulu) [35].

Ekstrakciju efektivitātes salīdzināšana oleanolskābes un ursolskābes iegūšanai no granātābola ziediem (*Punica granatum*)

<i>Ekstrakcijas veids</i>	<i>Ekstrakcijas laiks</i>	<i>90% Etanola tilpums, mL</i>	<i>Oleanolskābes iznākums, mg/g</i>	<i>Ursolskābes iznākums, mg/g</i>
Macerācijas ekstrakcija	24 h	100	2,72±0,01	3,33±0,01
Ultraskaņas ekstrakcija	50 min	20	9,72±0,12	12,59±0,13
Soksleta ekstrakcija	6 h	100	5,31±0,01	8,06±0,03

Soksleta ekstrakcijas metode. Soksleta ekstrakcijas metodē noris destilācijas process (šķīdinātāja uzsildīšana līdz viršanas temperatūrai), kur šķīdinātāja tvaika kondensātu novirza izejas traukos. Plaši pielieto pārtikas un citu industriālo laboratoriju pētījumos. Visbiežāk lietotais šķīdinātājs ir etanols, bet izmanto arī metanolu. Ekstrakcijas trūkumi ir laiks, kas var aizņemt vairākas stundas vai pat dienas [30].

Macerācijas ekstrakcijas metode. Macerācijas ekstrakcijas metodē augs paraugs tiek ievietots noslēgtos traukos un mērcēts noteiktā šķīdinātāja daudzumā, istabas temperatūrā. Saponīnu iegūšanai parasti izmantotie šķīdinātāji ir etanols vai metanols. Metodes trūkumi ir liels šķīdinātāju tilpuma patēriņš un ekstrakcijas ilgums, kas aizņem pat vairākas dienas [35].

1.6. Saponīnu noteikšanas metodes

Pirms saponīnu noteikšanas augu valsts produktos, iesaka veikt vienkāršu procedūru, lai pārbaudītu saponīnu kvalitatīvo saturu. Mēģenē ievieto augs materiālu, to uzpilda ar destilētu ūdeni un sakrata 2 min. Stablu un noturīgu putu parādīšanās šķīdumā vismaz 15 min, norāda par saponīnu klātbūtni augs paraugā [30].

Visbiežāk saponīnu kvantitatīvai noteikšanai izmanto spektrofotometriskās un hromatogrāfiskās metodes. Atšķirība starp šīm divām metodēm ir tāda, ka spektrofotometriskā metode dod iespēju noteikt kopējo saponīnu saturu augā, bet ar hromatogrāfijas metodi ir iespējams identificēt konkrēto saponīna savienojumu un noteikt tā kvantitatīvo saturu augā. Veikti pētījumi, kuros veikta klasiskās AEŠH un UAEŠH savstarpēja salīdzināšana, kur autori pierāda, ka ar UAEŠH metodi var iegūt augstāku izšķirtspēju un ātrākus analīzes rezultātus saponīnu iegūšanai [30].

Kopējos saponīnus ir iespējams noteikt arī izmantojot klasiskās fizikāli ķīmiskās analīžu metodes, piemēram, kā gravimetriju. Konkrēto saponīnu funkcionālo grupu identificēšanai, pielieto infrasarkanās spektroskopijas (IS, FTIS) metodes.

UV/VIS spektrofotometriskā metode. Šo metodi plaši pielieto kopējo saponīnu savienojumu kvantitatīvā satura noteikšanai augu valsts paraugos, jo tā ir vienkārša, ātra un lēta. Kopējos saponīnu savienojumus visbiežāk nosaka izmantojot vanilīna–ledus etiķskābes un perhlorskābes maisījumu. Metodes pamatprincips ir oksidētu triterpenoīdo saponīnu savienojumu reakcija ar vanilīnu (vanilīns viegli oksidējas). Perhlorskābe lietota kā oksidants un šīs reakcijas noteicošā krāsa ir violeta. Kolorimetriskā pārbaude balstīta uz saponīna struktūru vai aglikona savienojumu. Aglikons ar OH grupu pie C-3 stāvokļa reaģē ar vanilīnu skābā vidē, lai veidotu hromogēnu, kuram ir tāda pati absorbcija arī tad, kad aglikons ir brīvs vai saistīts ar oligosaharīdiem. Pirms šīs metodes izmantošanas ir jāizvērtē daži faktori,

piemēram, tādi kā standartviela un absorbcijas maksimuma viļņa garums. Perhlorskābes vietā tiek lietota arī sērskābe, bet pētījumi norāda uz to, ka vanilīna–sērskābes maisījumam ir sliktā stabilitāte, kas var traucēt saponīnu struktūrai nošķelt esošos oligosaharīdus [30, 36, 37].

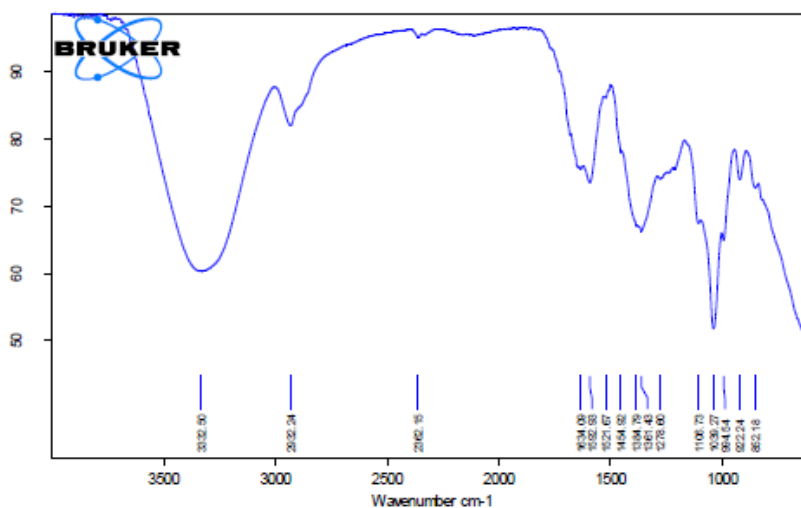
Ķīnas zinātnieki pētījuši kopējo saponīnu savienojumu saturu kukurūzā (*Zea mays*), izmantojot spektrofotometrisko metodi. Kukurūzas ekstraktam tika pievienots 5 % vanilīna–ledus etiķskābes maisījums, perhlorskābe un kārtīgi samaisīts. Sildīts ūdens vannā 15 min pie 60 °C un pēc tam atdzesēts 5 min ledus vannā. Reakcijas beigās pievienota ledus etiķskābe un kārtīgi samaisīts līdz homogēnam šķīdumam. Reakcijas maisījumam mērīta absorbcija pie viļņu garuma 510 nm pret salīdzināšanas šķīdumu (tukšais). Metodē tika izmantota oleanolskābes standartviela, kur pēc uzņemtās kalibrēšana taisnes vienādojuma aprēķināts kopējo saponīnu savienojumu saturs paraugā (mg/100g produkta) [38].

Cita Ķīnas zinātnieku grupa noteikusi kopējo triterpenoīdo saponīnu savienojumu saturu plakanpiepē (*Ganoderma atrum*), izmantojot kolorimetrisko metodi. Analizējamā parauga etanola ekstraktam tika pievienots 5% vanilīna–etiķskābes šķīdums un perhlorskābe. Viss kārtīgi samaisīts un sildīts 15 min pie 70 °C un pēc tam atdzesēts 2 min ledus vannā. Ar etilacetātu tika uzpildīts līdz 5 mL kopējā tilpuma. Sagatavotie paraugi atdzesēti līdz istabas temperatūrai. Vienam no paraugiem tika mērīts absorbcijas maksimums diapazonā no 200 līdz 700 nm. Paraugiem mērīta absorbcija pie viļņa garuma 550 nm. Metodē kā standartviela tika izmantota oleanolskābe, kur pēc uzņemtās kalibrēšana taisnes vienādojuma aprēķināts kopējo triterpenoīdo saponīnu savienojumu saturs paraugā (%) [31].

Infrasarkanās spektroskopijas (FTIS) metode. FTIS metodi izmanto iegūtās vielas funkcionālo grupu identificēšanai un tās tīrības noteikšanai. Šo metodi plaši pielieto farmācijā, galvenokārt, kvalitatīviem raksturojumiem.

Veikti pētījumi triterpēnu saponīnu funkcionālo grupu identificēšanai ārējā bērza tāsī. Metodē izmantota izžāvēta bērza tāss ekstrakta frakcija un standartvielas (betulīnskābe, betulīns un lupeols), kurām uzņemti IS standartspektri. Paraugi sasmalcināti smalkā, viendabīgā pulverī. Tabletes pagatavošanā tika izmantota nesējviela KBr. Uzņemti infrasarkanie spektri diapazonā no 4000 līdz 400 cm^{-1} ar spēcīgiem funkcionālo grupu signāliem - *betulīnskābe*: 3484 cm^{-1} (OH), 2870 cm^{-1} (CH_2), 1686 cm^{-1} (C–O), 1432 cm^{-1} (OH), 1362 cm^{-1} ($\text{CH}_2\text{--CH--CH}_3$), 1156 cm^{-1} (C–O); *betulīns*: 3448 cm^{-1} (OH), 2868 cm^{-1} ($\text{CH}_2\text{--CH}_3$), 1638 cm^{-1} (C–C), 1432 cm^{-1} (OH), 1388 cm^{-1} ($\text{CH}_2\text{--CH--CH}_3$); *lupeols*: 3308 cm^{-1} (OH), 2872 cm^{-1} (CH_2), 1630 cm^{-1} (C=C), 1468 cm^{-1} (CH), 1380 cm^{-1} (CH_3), 920 cm^{-1} (CH). Uzņemtā parauga IS spektra raksturīgie funkcionālo grupu signāli un absorbcija sakrīt ar standartvielu spektriem, pēc tā var secināt, ka bērzu tāss satur triterpēnu vielas – betulīnskābi, betulīnu un lupeolu [39].

Zinātnieki no Indijas, izmantojot FTIS metodi Spraišļu lantāna (*Lantana camara*) auga saknē identificējuši oleanolskābes funkcionālās grupas. Pulverī sasmalcināts augs trīs reizes tika attaukots ar petrolēteri. Pēc tam izmantojot macerācijas ekstrakciju, četras reizes ekstraģēts ar etanolu istabas temperatūrā. Savāktais šķīdinātājs tika ietvaicēts un neattīrītās nogulsnes šķīdinātas hloroformā, ļaujot pa nakti izgulsnēties. Nogulsnes četras reizes tika kristalizētas ar metanolu, kas iznākumā deva oleanolskābes kristālus. Iegūtajai tabletei uzņēmti IS spektri, diapazonā no 4000 līdz 400 cm^{-1} . 1.6. attēlā redzami spēcīgi funkcionālo grupu signāli – 3333 cm^{-1} (OH), 2932 cm^{-1} (CH_2), 1455 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), 1361 cm^{-1} (CH_3), 1107 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$), kuri sakrīt ar oleanolskābes references standarta spektru. Iegūtie rezultāti liecina par efektīvas macerācijas ekstrakcijas un FTIS metodes pielietošanu oleanolskābes iegūšanai un pierādīšanai no Spraišļu lantāna auga saknes [25].



1.6. att. IS spektrs oleanolskābes pierādīšanai Spraišļu lantāna (*Lantana camara*) auga saknē

Hromatogrāfiskās metodes. Attiecībā uz saponīnu kvantitatīvo analīzi, bieži lietotā metode ir *augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfijas (AEŠH)* metode. Saponīnu molekulārā struktūra maz satur hromoforus, kā rezultātā tiem ir zema UV absorbcija, kas ierobežo iespēju paraugu analizēšanai izmantot UV detektorus. Lielākā daļa no veiktajiem pētījumiem saponīnu UV absorbcijas maksimums ir no 200 līdz 210 nm. Tikai 2,3–dihidro–2,5–dihidroksi–6-metil–4-pirona (DDMP) konjugētā sojas saponīna, glicerīnretīnskābes glikozīda un kukurbitacīna UV absorbcijas maksimums ir pie 295 nm, kur to noteikšana ar UV–VIS detektoru varētu būt veiksmīga [40]. Neskatoties uz šo ierobežojumu, ir veikti pētījumi matē tējā (*Ilex paraguariensis*), kurā noteikta oleanolskābe un ursolskābe pie zema viļņa garuma, 203 nm. Metodē tika veikta ūdens ekstrakcija un hidrolīze ar sālsskābes šķīdumu (1,5 M), lai no saponīna aglikona daļas (sapogenīna) nošķeltu oligosaharīdus. Sagatavotā parauga

izdalīšanas laikus salīdzināja ar oleanolskābes un ursolskābes standartvielu izdalīšanas laikiem [41].

Izstrādātas analītiskās metodes dažādiem augu paraugiem, lai novērstu iepriekš minētās problēmas. Saponīnu noteikšanai izmanto *augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfijas (AEŠH)* metodi ar *iztvaikošanas gaismas izkliedes (ELSD) detektoru*, kas ļauj atdalīt sojas sapogenolu A un B (soyasapogenol) ar C-18 kolonnu un kustīgo fāzi – acetoniitrils:1-propanols:ūdens:etiķskābe (80:6:13,9:0,1). Žeņšeņa augos ar ELSD detektoru, tika veiksmīgi atdalīti saponīni ar SpHerisorb ODS2, C18 kolonnu un kustīgo fāzi – etiķskābe:ūdens, kur savienojumu kvantitatīvais saturs aprēķināts pēc kalibrēšanas taisnes, saskaņā ar kuru noteikšanas robeža ir 50 ng [40].

Veikti pētījumi saponīnu savienojumu – avenakozīda A (avenacosides A), avenakozīda B (avenacosides B), un 26-dezglukoavenakozīda (desglucoavenacoside) noteikšanai ar *ultra augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfijas (UAEŠH)* metodi. Mērķis bija izstrādāt ātru pierādīšanas metodi, ar kuru iespējams noteikt saponīnu kvantitatīvo saturu 16 dažādās Polijā audzētās auzu graudu šķirnēs. Pēc literatūras salīdzinot UAEŠH ar klasisko AEŠH metodi, tai ir ātrāks analizējamā komponenta izdalīšanās laiks, tā sniedz labāku izšķirtspēju, kā arī samazina organisko šķīdinātāju daudzumu. Metodē izmantotais masas detektors jonu monitoringa režīmā (SIM), skaidri attēloja maksimuma punktus, ļāva veikt to vieglu integrāciju. Ekstrakta matrica netraucēja saponīnu izdalīšanai, kas parasti ir problēma AEŠH metodē izmantojot UV detektoru. Labus rezultātus uzrādīja auzu graudu šķirne „Nagus”, kur noteikto triterpenoīdo saponīnu savienojumu saturs bija - avenakozīds A $550,9 \pm 11,9$ $\mu\text{g/g}$, avenakozīds B $325,2 \pm 3,1$ $\mu\text{g/g}$ un 26-dezglukoavenakozīds $32,7 \pm 0,2$ $\mu\text{g/g}$. [13].

Atsevišķu komponentu identificēšanai no dabīgām vielām, izmanto arī *plānslāņa hromatogrāfijas (PSH)* metodi. Tā ir ātra, vienkārša un kvalitatīva metode un tās priekšrocība ir vairāku paraugu vienlaicīga salīdzināšana. Veikti pētījumi saponīnu noteikšanai sojas pupās (*Glycine max*) ar PSH analīzi. Paraugu uzņemšanai izmantotas alumīnija plāksnītes ar silikagēla pārklājumu. Par kustīgo fāzi tika lietots šķīdinātāju maisījums – dihlorometāns:metanols (9:1). Pēc tam plāksnīte apsmidzināta ar kālija dihromāta un sērskābes maisījumu. Plāksnītes tika žāvētas, līdz kamēr UV gaismā attēlojās sarkanīgi violeti plankumi, kas liecināja par saponīnu klātbūtni sojas pupu paraugā [42].

Gravimetriskā metode. Ar gravimetrisko metodi ir iespējams noteikt kopējo saponīnu kvantitatīvo saturu analizējamam paraugam. Tās pamatā ir iegūtās vielas masas mērīšana. Gravimetrija vairs nav plaši pielietota analītikā metode, jo ir neprecīza, laikietilpīga, patērē daudz reagentus, nesniedz daudz informācijas par analizējamo vielu, bet neskatoties uz to, ir metodes un nozares kur to pielieto pat šodien.

Zinātnieki no Nigērijas noteica kopējo saponīnu saturu Āfrikas bērza lapās (*Anogeissus leiocarpus*) ar dubulto šķīdinātāju ekstrakcijas gravimetrisko metodi. 20 g sasmalcinātam paraugam tika pievienots 200 mL 20 % etanola šķīdums un maisījums sildīts 4h pie 55 °C. Atdzesēts aukstā ūdens vannā un filtrēts. Atlikums ekstrahēts divas reizes ar 200 mL 20 % ūdens–etanola šķīdumu un ekstrakti apvienoti. Kombinētais ekstrakts samazināts līdz ~ 40 mL pie 90 °C. Ekstrakts pārvietots 250 mL dalāmajā piltuvē, kur ekstrahēja ar 20 mL dietilēteri. Pēc divu slāņu noslāņošanās saglabāts ūdens slānis. Attīrīšana ar dietilēteri tika atkārtota. Ūdens slānis ekstrahēts ar 60 mL n–butanolu un n–butanola frakcija divas reizes skalota ar 5 % NaCl šķīdumu. Maisījums ietvaicēts līdz sausam atlikumam iepriekš nosvērtā kolbā un tālāk žāvēts žāvskapī pie 60 °C. Eksperiments atkārtots divas reizes, lai iegūtu vidējo vērtību. Saponīnu saturs paraugos aprēķināts procentos (%). Saponīnu saturošo sauso atlikumu izmantoja kopējo saponīnu satura spektrofotometriskai noteikšanai [423].

Citu zinātnieku grupa no Nigērijas kopējo saponīnu noteikšanai dažādās garšvielās (ingverā, sīpolos, ķiplokos, piparos) izmantoja divus šķīdinātājus – acetonu, lai lipīdi pārietu šķīdinātājā un metanolu, lai izekstrahētu saponīnus. 2 g garšvielu paraugs tika ievietots Soksleta aparātā un pievienots 250 mL acetona. Ekstrakcija tika veikta 3 h. Pēc tam pievienota 150 mL apaļkolba ar 100 mL metanolu un ekstrakcija tika turpināta vēl 3 h. Metanols pēc ekstrakcijas atdestilēts un saponīnu saturošais sausais atlikums žāvēts iepriekš nosvērtā apaļkolbā. Saponīnu saturs aprēķināts g/100 g garšvielu parauga (ingverā 3,99±0,05; ķiplokos 13,93±0,01; sīpolos 48,35±0,05; piparos 9,92 ±0,02) [44].

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Izmantotā aparatūra

- Analītiskie sviri *PRECISA* ($\pm 0,0001\text{g}$);
- Centrifūga *TY 5.375 – 4261 – 76* (max. $10000\text{ apgr. min}^{-1}$);
- Centrifūga *JOUAN B4 i* (max. $4000\text{ apgr. min}^{-1}$);
- Kafijas dzirnaviņas *CLATRONIC*;
- Laboratorijas sviri *KERN* ($\pm 0,01\text{g}$);
- Plītiņa *WISESTIR* (ar maisītāju un temperatūras sensoru);
- Rotācijas ietvaicētājs *LABOROTO 4001 HEIDOLPH*;
- Šķidrums hromatogrāfs *Waters 600E* (UV detektors *waters 2895* (203 nm), kolonna C-18, 4,6 mm ID x 150 mm (5 μm), kustīgā fāze acetnitrils:ūdens (75:25), kolonnas termostata temperatūra 35 °C, plūsmas ātrums 1 ml/min, parauga tilpums 5 μL).
- UV/VIS spektrofotometrs *Lambda 25* (*PerkinElmer Instruments*) ($\pm 0,1\text{ nm}$);
- Žāvskapis *Memmert* ($\pm 1^\circ\text{C}$).

2.2. Reāģenti

- Acetonitrils (CH_3CN) $\geq 99,9\%$ (*Sigma-Aldrich*, CAS numurs 75-05-8) (H225, H302+H312+H332, H319; P210, P261, P280, P305+P351+P338, P370+P378, P403+P235);
- Dietilēteris ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$) (*Chempur*, CAS numurs 60-29-7) (H224, H302, H336; P210, P261);
- Etanols ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 96% (CAS numurs 64-17-5) (H225, H319; P210, P280, P305+P351, P337+P313, P403+P235);
- Heksāns (C_6H_{14}) (*SIA Enola*, CAS numurs 110-54-3) (H225, H304, H315, H336, H361f, H373, H411; P201, P210, P273, P301+P310, P308+P313, P331);
- Hloroforms (CHCl_3) (*Chempur*, CAS numurs 67-66-3) (H302, H315, H319, H332, H336, H351, H361, H373; P261, P281, P305+P351+P338);

- Ledus etiķskābe (CH₃COOH) (*SIA Enola*, CAS numurs 64-19-7) (H226, H314; P280, P305+P351+P338, P310);
- Metanols (CH₃OH) ≥ 99,5% (*SIA Enola*, CAS numurs 67-56-1) (H225, H301+H311+H331, H370; P210, P280, P302+P352+P312, P304+P340+P312, P370+P378, P403+P235);
- n-butanols (C₄H₉OH) (*SIA Enola*, CAS numurs 71-36-3) (H226, H302, H315, H318, H335, H336; P210, P280, P301+P312+P330, P304+P340+P312, P305+P351+P338+P310, P403+P235);
- Nātrija hlorīds (NaCl) (*Chempur*, CAS numurs 7647-14-5);
- Oleanolskābe (Oleanolic acid C₃₀H₄₈O₃) ≥ 97% (*Sigma-Aldrich*, CAS numurs 508-02-1);
- Perhlorskābe (HClO₄) 70% (*SIA Enola*, CAS numurs 7601-90-3) (H271, H290, H302, H314, H373; P210, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P310, P305+P351+P338, P371+P380+P375);
- Sālsskābe (HCl) 35-38% (*Chempur*, CAS numurs 7647-01-0) (H290, H314, H335; P260, P280, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338);
- Ursolskābe (Ursolic acid C₃₀H₄₈O₃) ≥ 90% (*Sigma-Aldrich*, CAS numurs 77-52-1);
- Vanilīns (C₈H₈O₃) ≥ 99% (*Sigma-Aldrich*, CAS numurs 121-33-5) (H319; P305+P351+P338).

2.3. Analizējamo paraugu raksturojums

Darbā tika analizēti dažādu labības šķirņu auzu graudu, miežu graudu un miežu grūbu paraugi, kas selekcionēti Latvijas Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūtā. Analizēti arī uzturā plaši lietojamo divu auzu pārslu paraugi – pilngraudu „Valdo” un ātri vārāmās „Herkules” auzu pārslas. Kopā 18 paraugi. Analizējamo paraugu raksturojums redzams 2.1. tabulā.

Uzskaitītajām graudu šķirnēm ir piešķirti reģistrācijas numuri, jo notiek attiecīgās jaunās šķirnes kvalitātes novērtējums. Graudi ir audzēti vienādos apstākļos – konvencionālās audzēšanas sistēmas laukos un tie tiek nodrošināti ar pamatmēslojumu (80 kg/ha).

Tika izmantoti veseli, neskaldīti auzu graudi un to pārstrādes produkts – auzu pārslas (pārstrādes procesā tiek placinātas, saspīestas un noņemts ārējais apvalks). Izmantoti veseli, neskaldīti miežu graudi un to pārstrādes produkts – skrotētas miežu grūbas (pārstrādes procesā tiek noņemts daļa no ārējā apvalka).

Analizējamo graudu un to pārstrādes produktu raksturojums

<i>N.pk.</i>	<i>Parauga nosaukums</i>	<i>Parauga numurs</i>	<i>Šķirnes numurs vai nosaukums / Piezīmes*</i>
1.	Auzu graudi	A-1	33027/+80
2.		A-2	33926/+80
3.		A-3	34241/+80
4.		A-4	34588/+80
5.		A-5	IL 3587/+80
6.		A-6	SW Betania/+80
7.		A-7	Lizeta/+80
7.	Miežu graudi	G-1	12902/P,+80
8.		G-2	13083/P,+80
9.		G-3	13074/P,+80
10.		G-4	12924/P,+80
11.		G-5	12835/P,+80
12.	Miežu grūbas	S-1	12902/P,+80
13.		S-2	13083/P,+80
14.		S-3	13074/P,+80
15.		S-4	12924/P,+80
16.		S-5	12835/P,+80
17.	Auzu pārslas	AP	„Valdo” pilngraudu
18.		AV	„Herkules” ātri vārāmās

*Apzīmējumi: P – plēkšņainie mieži; +80 – pamatmēslojums, kg/ha (NO₃⁻ un NH₄⁺ attiecībā 1:1).

2.4. Saponīnu satura gravimetriska noteikšana

Šķīdumu pagatavošana:

- 20% ūdens–etanola šķīdums: 1 L vārglāzē iemērīja 208 mL 96% etanola un pievienoja 792 mL destilēta ūdens;
- 5% nātrija hlorīda šķīdums: 100 mL vārglāzē iesvēra 5,00 g nātrija hlorīda un izšķīdināja ar 95 mL destilēta ūdens.

Analizējamie paraugi. Latvijas Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūtā selekcionēti auzu graudu (A-4 un A-5), miežu graudu (G-3), miežu grūbu (S-3) un uzturā plaši lietojamo auzu pārslu (AP un AV) paraugi (skat. 2.1. tabulu).

Paraugu sagatavošana. Saskaņā ar Nigērijas zinātnieku literatūrā sniegto gravimetrisko metodi [42], tika veikta metodes modifikācija. 6 g (ar precizitāti $\pm 0,01$ g) samaltu grauda paraugu iesvēra 100 mL cilindrā, pievienoja 60 mL heksāna un maisot sildīja 2 h pie 45 °C. Maisījumu atstāja uz diennakti. Heksānu dekantēja un attaukošanu atkārtoja. Paraugu žāvēja gaisā, ļaujot heksānam iztvaikot. 5 g (ar precizitāti $\pm 0,01$ g) attaukotā parauga iesvēra 100 mL Erlenmeijera kolbā, pievienoja 50 mL 20% ūdens–etanola šķīdumu, nepārtraukti maisot 4 h sildīja ūdens vannā pie 45 – 50 °C. Paraugu atdzesēja ledus vannā un centrifugēja 10 min pie 5000 apgr./min. Iegūto ūdens–etanola ekstraktu uzmanīgi ielēja 100 mL cilindrā. Graudu atlikumam pievienoja 50 mL 20% ūdens-etanola šķīdumu un ekstrakciju atkārtoja pie tādiem pašiem apstākļiem. Savākto ūdens-etanola ekstraktu (~ 80 ml) samazināja ar rotācijas ietvaicētāju līdz ~ 20 mL tilpumam. Ūdens vannas temperatūra 48 °C. Sakoncentrēto ekstraktu pārvietoja dalāmajā piltuvē un ekstrahēja ar dietilēteri (3 x 15 mL). Savākto dietilētera frakciju izlēja ārā, bet ūdens slāni ekstrahēja ar n–butanolu (3 x 30 mL). Apvienoto n–butanola frakciju (~ 90 mL) mazgāja ar 5% NaCl šķīdumu (2 x 10 mL). Iepriekš nosvērtā kolbā, n–butanola frakciju ietvaicēja līdz sausam atlikumam ar rotācijas ietvaicētāju. Ūdens vannas temperatūra 55 °C. Sauso atlikumu žāvēja žāvskapī pie 60 °C līdz nemainīgam svaram un uzglabāja eksikatorā. Gravimetrisko metodi atkārtoja trīs reizes.

Kopējo saponīnu saturu aprēķināja pēc 2.1. vienādojuma.

$$w_{\%} = \frac{m_{atl}}{m_{iesv}} \cdot 100, \quad (2.1.)$$

kur $w_{\%}$ – saponīnu saturošais sausais atlikums, %;

m_{atl} – iegūtā saponīnu saturošā sausā atlikuma masa, mg;

m_{iesv} – sausu graudu parauga iesvara masa, mg;

100 – reizinātājs, lai saponīnu saturu izteiktu %.

Eksperimentāli iegūtie rezultāti apkopoti 3.1. nodaļas 3.1. tabulā.

Sagatavoto sauso paraugu izmantoja kopējo saponīnu savienojumu noteikšanai ar spektrofotometrisko metodi un triterpenoīdo saponīnu savienojumu (oleanolskābes un ursolskābes) noteikšanai ar AEŠH metodi (skat. 2.5. un 2.6. nodaļu).

2.5. Kopējo saponīnu savienojumu satura spektrofotometriska noteikšana

Šķīdumu pagatavošana:

- 50% etanola–ūdens šķīdums: 1 L vārglāzē iemērīja 520 mL 96% etanola un pievienoja 480 mL destilēta ūdens;
- oleanolskābes standartšķīdums ($\gamma=7,2$ mg/mL): iesvēra 72 mg (ar precizitāti $\pm 0,1$ mg) oleanolskābes standartvielas 10 mL mērkolbā, izšķīdināja un uzpildīja līdz atzīmei ar metanolu;
- 5% vanilīna–ledus etiķskābes šķīdums: 100 mL vārglāzē iesvēra 5,00 g vanilīna un izšķīdināja ar 95 g ledus etiķskābes.

Analizējamie paraugi. Latvijas Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūta selekcionēti auzu graudu (A-4 un A-5), miežu graudu (G-1 un G-3), miežu grūbu (S-1 un S-3) un uzturā plaši lietojamo auzu pārslu (AP un AV) paraugi (skat. 2.1. tabulu).

Paraugu sagatavošana:

1. metode

Saskaņā ar Ķīnas zinātnieku literatūrā sniegto spektrofotometrisko kopējo saponīnu savienojumu satura noteikšanu kukurūzā (*Zea mays*) [37], tika veikta metodes modifikācija. 4 g (ar precizitāti $\pm 0,01$ g) samaltu analizējamo grauda paraugu iesvēra 100 mL cilindrā, pievienoja 50 mL heksāna un maisot sildīja 2 h pie 45 °C. Maisījumu atstāja uz diennakti. Heksānu dekantēja un attaukošanu atkārtoja. Paraugu žāvēja gaisā, ļaujot heksānam iztvaikot. 100 mL Erlenmeijera kolbā iesvēra 2 g (ar precizitāti $\pm 0,01$ g) attaukotā parauga, pievienoja 60 mL 50% etanola–ūdens šķīdumu un 2 h ekstrahēja ultraskaņas vannā pie 40 °C. Paraugu atdzesēja ledus vannā un centrifugēja 10 min pie 5000 apgr./min. Augšējo spirta–ūdens ekstraktu (~ 50 mL) uzmanīgi ielēja 50 mL cilindrā. Etanolu ietvaicēja ar rotācijas ietvaicētāju līdz 20 mL tilpumam. Ūdens vannas temperatūra 60 °C. Sakoncentrēto ekstraktu pārvietoja dalāmajā piltuvē un ekstrahēja ar n–butanolu (3 x 35 mL). Savāktās butanola frakcijas (~ 100 mL) ietvaicēja ar rotācijas ietvaicētāju līdz sausam atlikumam. Ūdens vannas temperatūra 55 °C. Saponīnu saturošo sauso atlikumu žāvēja žāvskapī pie 60 °C līdz nemainīgam svaram un uzglabāja eksikatorā. Saponīnu saturošo sauso atlikumu šķīdināja 4 mL metanola, ko izmantoja kopējo saponīnu savienojumu spektrofotometriskai noteikšanai.

2. metode

No saponīnu saturošā sausā atlikuma, kurš iegūts saskaņā ar gravimetriskās noteikšanas metodi (skat. 2.4. nodaļu), iesvēra attiecīgo daudzumu un šķīdināja 4 mL metanola, ko izmantoja kopējo saponīnu savienojumu spektrofotometriskai noteikšanai (skat. 2.2. tabulu).

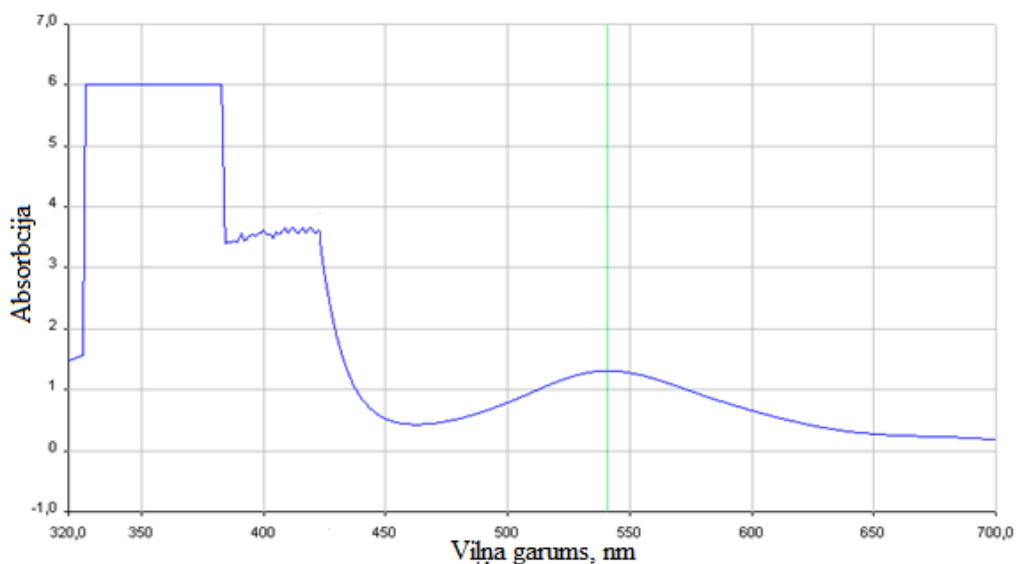
2.2. tabula

Spektrofotometriskās analīzes metodei izmantotais saponīnu saturošā sausā atlikuma iesvars

<i>Parauga Nr.*</i>	<i>Saponīnu saturošais sausais atlikums m_1^{**}, mg</i>	<i>Analīzei izmantotais saponīnu saturošais sausais iesvars m, mg</i>
A-4	98,7	5,0
A-5	94,4	5,8
G-3	84,4	5,2
S-3	14,7	5,8
AP	87,5	3,7
AV	38,9	2,2

Apzīmējumi: * skat. 2.1. tabulu; ** skat. 2.4. nodaļu

Kalibrēšanas taisnes iegūšana. Kalibrēšanas grafika uzņemšanai 25 mL mērkolbās iemērīja 0,1 mL; 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; 1,00 mL; 1,2 mL; 1,4 mL; 1,6 mL; 1,8 mL; 2,00 mL oleanolskābes standartšķīdumu ($\gamma=7,2$ mg/mL) un uzpildīja visas mērkolbas ar metanolu līdz atzīmei. 1 mL zināmas koncentrācijas oleanolskābes standartšķīdumam pievienoja 2 mL 5 % vanilīna–ledus etiķskābes maisījumu un 8 mL perhlorskābes. Reakcijas maisījumu maisot sildīja 15 min pie 60 °C. Atdzesēja 5 min ledus vannā un pievienoja 5 mL ledus etiķskābes. Reakcijas maisījumu kārtīgi samaisīja līdz homogēnam šķīdumam. Sagatavotos kalibrēšanas šķīdumus atdzesēja līdz istabas temperatūrai un mērīja absorbciju pie 540 nm 1 cm kivetēs pret salīdzināšanas šķīdumu, kurš tika pagatavots tāpat kā šķīdumi kalibrēšanas grafika iegūšanai, bet nepievienoja oleanolskābes standartšķīdumu. Iepriekš oleanolskābes kalibrēšanas šķīdumam ar koncentrāciju 0,288 mg/mL, noteikts maksimālās absorbcijas viļņa garums (540 nm), mērot no 700 līdz 320 nm (skat. 2.1. att).



2.1. att. Oleanolskābes kalibrēšanas šķīduma (0,288 mg/mL) absorbcijas grafiks ($\lambda_{\max}=540$ nm)

Kopējo saponīnu savienojumu saturs noteikšana. 1 mL sagatavotajam metanola ekstraktam pievienoja 2 mL 5 % vanilīna–ledus etiķskābes maisījumu un 8 mL perhlorskābes. Reakcijas maisījumu maisot sildīja 15 min pie 60 °C. Atdzesēja 5 min tekošā aukstā ūdenī un pievienoja 5 mL ledus etiķskābes. Reakcijas maisījumu kārtīgi samaisīja līdz homogēnam šķīdumam. Sagatavoto šķīdumu atdzesēja līdz istabas temperatūrai un pret salīdzināšanas šķīdumu mērīja absorbciju pie 540 nm 1 cm kivetē. Katru sagatavoto graudauga paraugu analizēja trīs reizes.

Ievērojot secīgu 1. paraugu sagatavošanas metodi, kopējo saponīnu savienojumu saturu aprēķināja pēc 2.2. vienādojuma.

$$w = \gamma \cdot V_1 \cdot \frac{V_2}{V_3} \cdot \frac{V_4}{V_5 \cdot m_{iesv}} \cdot 100, \quad (2.2.)$$

kur w – kopējo saponīnu savienojumu masas daļa paraugā, mg/100g parauga;

γ – kopējo saponīnu savienojumu masas koncentrācija, mg/mL (pēc kalibrēšanas taisnes);

V_1 – pievienotais metanola tilpums, mL;

V_2 – pievienotā n–butanola tilpums, mL;

V_3 – atgūtā n–butanola frakcijas tilpums, mL;

V_4 – pievienotais etanola–ūdens šķīduma tilpums, mL;

V_5 – atgūtā etanola–ūdens ekstrakta tilpums, mL;

m_{iesv} – sausu graudu parauga iesvara masa, g;

100 – reizinātājs, lai kopējo saponīnu savienojumu saturu izteiktu mg/100 g produkta.

Ievērojot secīgu 2. paraugu sagatavošanas metodi, kopējo saponīnu savienojumu saturu aprēķināja pēc 2.3. vienādojuma.

$$w = \gamma \cdot V_1 \cdot \frac{m_1}{m_2} \cdot \frac{V_2}{V_3} \cdot \frac{V_4}{V_5 \cdot m_{iesv}} \cdot 100, \quad (2.3.)$$

kur w – kopējo saponīnu savienojumu masas daļa paraugā, mg/100g parauga;

γ – kopējo saponīnu savienojumu masas koncentrācija, mg/mL (pēc kalibrēšanas taisnes);

V_1 – pievienotais metanola tilpums, mL;

m_1 – saponīnu saturošais sausais atlikums, mg;

m_2 – analīzei izmantotais saponīnu saturošais sausais atlikums, mg;

V_2 – pievienotā n–butanola tilpums, mL;

V_3 – atgūtā n–butanola frakcijas tilpums, mL;

V_4 – pievienotais etanola–ūdens šķīduma tilpums, mL;

V_5 – atgūtā etanola–ūdens ekstrakta tilpums, mL;

m_{iesv} – sausu graudu parauga iesvara masa, g;

100 - reizinātājs, lai kopējo saponīnu savienojumu saturu izteiktu mg/100 g produkta.

Eksperimentāli iegūtie rezultāti apkopoti 3.2. nodaļas 3.2. attēlā un 1. pielikumā.

2.6. Oleanolskābes un ursolskābes noteikšana ar AEŠH metodi

Analizējamie paraugi. Latvijas Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūta selekcionēti auzu graudu (no A-1 līdz A-7), miežu graudu (no G-1 līdz G-5), miežu grūbu (no S-1 līdz S-5) un uzturā plaši lietojamo auzu pārslu (AP un AV) paraugi (skat. 2.1. tabulu).

Paraugu sagatavošana:

Saskaņā ar Brazīlijas zinātnieku literatūrā sniegto oleanolskābes un ursolskābes noteikšanu matē tējā (*Ilex paraguariensis*) ar AEŠH metodi [40], tika veikta metodes modifikācija.

1. metode

Grauda paraugu samala kafijas dzirnaviņās. Nosvēra 4,5 g (ar precizitāti $\pm 0,01$ g) samaltā parauga un pārnesa 200 mL Erlenmeijera kolbā. Paraugam pievienoja 100 mL destilēta ūdens, uzlika deflegmatoru un maisot sildīja 10 min vārošā ūdens vannā. Paraugu atdzesēja un centrifugēja 10 min pie 5000 apgr./min. Iegūto augšējo ūdens slāni uzmanīgi nolēja 100 mL mērcilindrā. Atgūtajam (~ 50 mL) ūdens ekstraktam pievienoja 7,5 mL koncentrētas sālsskābes (ieguva 1,5 N) un maisot hidrolizēja 2h pie 60 – 70 °C. Maisījumu

atdzesēja aukstā ūdens vannā un pārvietoja dalāmajā piltuvē. Ūdens ekstraktu ekstrahēja ar 50 mL hloroformu. Savākto hloroforma frakciju (~ 50 mL) ietvaicēja ar rotācijas ietvaicētāju līdz eļļainam atlikumam. Ūdens vannas temperatūra 45 °C. Sagatavoto paraugu šķīdināja 10 mL acetonitrila un izmantoja oleanolskābes un ursolskābes noteikšanai ar AEŠH metodi.

2. metode

Grauda paraugu samala kafijas dzirnaviņās. Nosvēra 4,5 g (ar precizitāti $\pm 0,01$ g) samaltā parauga un pārnesa 200 mL Erlenmeijera kolbā. Paraugam pievienoja 100 mL 50% etanola-ūdens šķīdumu, uzlika deflagmatoru un maisot sildīja ūdens vannā 10 min pie 40 – 50 °C. Paraugu atdzesēja un centrifugēja 10 min pie 5000 apgr./min. Iegūto augšējo etanola-ūdens slāni uzmanīgi nolēja 100 mL mērcilindrā. Etanolu ietvaicēja ar rotācijas ietvaicētāju līdz ~ 40 mL kopējam tilpumam. Ūdens vannas temperatūra 60 °C. Ūdens ekstraktam pievienoja 6 mL koncentrētas sālskābes (ieguva 1,5 N) un maisot hidrolizēja 2h pie 60 – 70 °C. Maisījumu atdzesēja aukstā ūdens vannā un pārvietoja dalāmajā piltuvē. Ūdens ekstraktu ekstrahēja ar 50 mL hloroforma. Savākto hloroforma frakciju (~ 50 mL) ietvaicēja ar rotācijas ietvaicētāju līdz eļļainam atlikumam. Ūdens vannas temperatūra 45 °C. Sagatavoto paraugu šķīdināja 10 mL acetonitrila un izmantoja oleanolskābes un ursolskābes noteikšanai ar AEŠH metodi.

3. metode

5 g (ar precizitāti $\pm 0,01$ g) samaltu grauda paraugu iesvēra 100 mL cilindrā, pievienoja 60 mL heksāna un maisot sildīja 2 h pie 40 °C. Maisījumu atstāja uz diennakti. Heksānu dekantēja un attaukošanu atkārtoja. Paraugu žāvēja gaisā, ļaujot heksānam iztvaikot. Nosvēra 4 g (ar precizitāti $\pm 0,01$ g) attaukotā grauda parauga un kvantitatīvi pārnesa 200 mL Erlenmeijera kolbā. Paraugam pievienoja 100 mL destilēta ūdens un ultraskaņas vannā ekstrahēja 2 h. Paraugu atdzesēja aukstā ūdens vannā un centrifugēja 10 min pie 5000 apgr. min⁻¹. Iegūto augšējo ūdens slāni uzmanīgi nolēja 100 mL mērcilindrā. Atgūtajam 80 mL ūdens ekstraktam pievienoja 12 mL koncentrētas sālskābes (ieguva 1,5 N), un maisot hidrolizēja 2h pie 60 – 70 °C. Maisījumu atdzesēja aukstā ūdens vannā un pārvietoja dalāmajā piltuvē. Ūdens ekstraktu ekstrahēja ar hloroforma (3 x 50 mL). Savāktās hloroforma frakcijas apvienoja (~ 140 mL) un ietvaicēja ar rotācijas ietvaicētāju līdz eļļainam atlikumam. Ūdens vannas temperatūra 45 °C. Sagatavoto paraugu šķīdināja 2 mL acetonitrila un sakoncentrēja slāpekļa plūsmā līdz sausam atlikumam. Sagatavoto paraugu šķīdināja 200 µL acetonitrila, centrifugēja 5 min pie 4000 apgr. min⁻¹ un izmantoja oleanolskābes un ursolskābes noteikšanai ar AEŠH metodi.

4. metode

Iegūto sauso frakciju pēc apstrādes ar n–butanolu (skat. 2.2. nodaļu), šķīdināja 30 mL destilēta ūdens un 4,4 mL koncentrētas sālsskābes (ieguva 1,5 N), lai veicinātu oligosaharīdu nošķelšanu. Paraugu maisot hidrolizēja 2 h pie 60 – 70 °C. Maisījumu atdzesēja aukstā ūdens vannā un pārvietoja dalāmajā piltuvē. Ūdens ekstraktu ekstrahēja ar hloroforma (3 x 30 mL). Savāktās hloroforma frakcijas apvienoja (~ 80 mL) un ietvaicēja ar rotācijas ietvaicētāju līdz eļļainam atlikumam. Ūdens vannas temperatūra 45 °C. Sagatavoto paraugu šķīdināja 2 mL acetonitrila un sakoncentrēja slāpekļa plūsmā līdz sausam atlikumam. Sauso atlikumu šķīdināja 200 µL acetonitrila un centrifugēja 5 min pie 4000 apgr. min⁻¹. Sagatavoto paraugu izmantoja oleanolskābes un ursolskābes noteikšanai ar AEŠH metodi.

Hromatogrammu uzņemšana. Pēc aprakstītās AEŠH aparatūras parametriem, uzņēma hromatogrammas oleanolskābes (25 µg/mL), ursolskābes (25 µg/mL) standartvielu šķīdumiem un sakoncentrētiem analizējamiem paraugiem acetonitrilā (1.–4. paraugu sagatavošanas metodes). Savstarpēji salīdzināja signālu izdalīšanas laikus.

Linearitāte, noteikšanas robeža (LOD) un kvantificēšanas robeža (LQD). Pielietotās metodes jutības novērtēšanai noteica trīs kritērijus – linearitāti, LOD un LQD.

Linearitāti noteica tos izmērot ursolskābes standartvielas šķīdumiem diapazonā no 3 līdz 11 µg/mL, kur katru punkta posmu atkārtoja trīs reizes, lai pēc lineārās regresijas taisnes slīpuma varētu aprēķināt LOD un LQD.

Metodes noteikšanas robeža (LOD) ir viszemākā analizējamā koncentrācija paraugā, kuru var noteikt ar šo analīzes metodi, bet nav iespējams vērtību kvantificēt. LOD pārbaudīja ar ursolskābes standartvielas izejas šķīdumu (25 µg/mL), to atšķaidot līdz koncentrācijai, kura ir trīs reizes lielāka (S/N=3) par bāzes līnijas signālu (troksni) [45].

LOD aprēķināja pēc 2.4. vienādojuma.

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{S'}, \quad (2.4.)$$

kur *LOD* – noteikšanas robeža, µg/mL;

σ – signāla laukuma standartnovirze (n=3), µg/mL;

S' – regresijas taisnes slīpums.

Metodes kvantificēšanas robeža (LQD) ir viszemākā analizējamā koncentrācija paraugā, kuru var kvantitatīvi noteikt ar šo analīzes metodi. LQD pārbaudīja ar ursolskābes standartvielas izejas šķīdumu (25 µg/mL), to atšķaidot līdz koncentrācijai, kura ir 10 reizes lielāka (S/N=10) par bāzes līnijas signālu (troksni) [45].

LQD aprēķināja pēc 2.5. vienādojuma.

$$LQD = \frac{10 \cdot \sigma}{S'}, \quad (2.5.)$$

kur LQD – kvantificēšanas robeža, $\mu\text{g/mL}$;

σ – signāla laukuma standartnovirze ($n=3$), $\mu\text{g/mL}$;

S' – regresijas taisnes slīpums.

Kalibrēšanas taisnes iegūšana. Kalibrēšanas taisni ieguva no signālu laukumiem, tos izmērot šķīdumiem ar zināmu koncentrāciju, kur katru punkta posmu atkārtoja trīs reizes. 11,0 mg ursolskābes standartvielu izšķīdināja 20 mL acetonitrilā, ieguva precīzas koncentrācijas šķīdumus 11,0; 22,0; 55,0 un 110,0 $\mu\text{g/mL}$. Pēc iegūtās kalibrēšanas taisnes vienādojuma aprēķināja oleanolskābes/ursolskābes masas koncentrāciju analizējamos ekstraktu paraugos acetonitrila maisījumā.

Savukārt zinot masas koncentrāciju un ievērojot secīgu 1. paraugu sagatavošanu metodi, oleanolskābes/ursolskābes saturu graudaugos un to pārstrādes produktos aprēķināja pēc 2.6. vienādojuma.

$$w = \gamma \cdot V_1 \cdot \frac{V_2}{V_3} \cdot \frac{V_4}{V_5 \cdot m_{iesv}} \cdot 100, \quad (2.6.)$$

kur w – oleanolskābes/ursolskābes masas daļa paraugā, mg/100g parauga;

γ – oleanolskābes/ursolskābes masas koncentrācija paraugā, $\mu\text{g/mL}$ (pēc kalibrēšanas taisnes);

V_1 – pievienotais acetonitrila tilpums, mL;

V_2 – pievienotais hloroforma tilpums, mL;

V_3 – atgūtais hloroforma frakcijas tilpums, mL;

V_4 – pievienotais ūdens tilpums, mL;

V_5 – atgūtais ūdens ekstrakta tilpums, mL;

m_{iesv} – sausu graudu parauga iesvara masa, g;

100 – reizinātājs, lai konkrētā saponīna savienojuma saturu izteiktu mg/100 g produkta.

Ievērojot secīgu 3. paraugu sagatavošanas metodi, oleanolskābes/ursolskābes saturu graudaugos un to pārstrādes produktos aprēķināja pēc 2.6. vienādojuma.

$$w = \gamma \cdot V_1 \cdot \frac{V_2}{V_3} \cdot \frac{V_4}{V_5 \cdot m_{iesv}} \cdot 100, \quad (2.7.)$$

kur w – oleanolskābes/ursolskābes masas daļa paraugā, mg/100g parauga;

γ – oleanolskābes/ursolskābes masas koncentrācija paraugā, $\mu\text{g/mL}$ (pēc kalibrēšanas taisnes);

V_1 – sakoncentrētais acetonitrila tilpums, mL;

V_2 – pievienotais hloroforma tilpums, mL;

V_3 – atgūtais hloroforma frakcijas tilpums, mL;

V_4 – pievienotais ūdens tilpums, mL;

V_5 – atgūtais ūdens ekstrakta tilpums, mL;

m_{iesv} – sausu graudu parauga iesvara masa, g;

100 – reizinātājs, lai konkrētā saponīna savienojuma saturu izteiktu mg/100 g produkta.

Oleanolskābei un ursolskābei absorbcijas maksimuma punkts ir pie 203 nm, abas triterpenoīdu skābes ir izomēri un to signālu izdalīšanas laiki ir līdzīgi, tāpēc linearitātes, LOD, LQD noteikšanai un kalibrēšanas taisnes iegūšanai izmantoja ursolskābes standartvielu.

Eksperimentāli iegūtie rezultāti apkopoti 3.3. nodaļas 3.3.; 3.4.; 3.5.; 3.8. tabulās, 3.3.; 3.4. attēlos un 2. pielikuma 1.-12.attēlos.

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Darba gaitā rezultātu statistiskajai apstrādei - kalibrēšanas taisņu konstruēšanai, veikto mērījumu standartnoviržu un drošības intervālu aprēķināšanai ($p = 0,95$), tika izmantota datorprogramma *Microsoft Excel*.

3.1. Saponīnu satura gravimetriska noteikšana

Zinot analizējamā parauga iesvaru un iegūto saponīnu saturošo sauso masu, aprēķināja saponīnu saturu analizējamos graudaugos un to pārstrādes produktos. Iegūto saponīnu satura (%) rezultāti apkopoti 3.1. tabulā. Aprēķina piemērs auzu pārslu paraugam Nr. AP:

$$w_{\%} = \frac{m_{atl}}{m_{iesv}} = \frac{81,4 \text{ mg}}{5000 \text{ mg}} \cdot 100\% = 1,63\%$$

3.1. tabula

Saponīnu saturs dažādos graudaugos un to pārstrādes produktos pēc gravimetriskās noteikšanas metodes

Parauga Nr.*	Parauga iesvars, g	Sausais atlikums m_1 , mg	Sausais atlikums m_2 , mg	Sausais atlikums m_3 , mg	Sausais atlikums m_{vid} , mg	Saponīnu saturs $w_{vid} \pm DI$, mg/100g	Saponīnu saturs $w_{vid} \pm DI$, %
A-4	5,00	98,7	98,6	93,1	96,8	1936±159	1,94±0,16
A-5	5,00	94,4	103,9	96,8	98,4	1967±245	1,97±0,25
G-3	5,00	84,4	80,9	74,6	80,0	1559±247	1,60±0,25
S-3	5,00	14,7	16,4	12,9	14,7	293±87	0,29±0,09
AP	5,00	87,5	76,3	80,5	81,4	1629±281	1,63±0,28
AV	5,00	38,9	66,1	48,7	51,2	1025±684	1,03±0,68

* skat. 2.1. tabulu

Gravimetriskā metode paredz saponīnu noteikšanu glikozīdu veidā. Gravimetrija ir atkārtota trīs reizes, lai noteiktu vidējo saponīnu saturu dotajiem paraugiem. Pēc paralēli iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka metode nav precīza un patiesais kopējo saponīnu daudzums varētu būt lielāks. Rezultātu neprecizitāti ietekmē paraugu sagatavošana, jo tika veiktas vairākas paraugu sagatavošanas stadijas – attaukošana, centrifugēšana, ekstrakcija,

attīrīšana ar dietilēteri, n–butanolu, nātrija hlorīda šķīdumu un ietvaicēšana, kuras rada saponīnu savienojumu zudumus.

No katras graudaugu sērijas tika izvēlēti divi paraugi, lai novērtētu kopējo saponīnu saturību starp auzu graudiem, miežu graudiem, miežu grūbām, kas selekcionēti Latvijas Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūtā un uzturā plaši lietotajām auzu pārslām. Rezultāti parāda, ka auzu graudu, miežu graudu un pilngraudu auzu pārslu kopējo saponīnu saturs ir lielāks nekā miežu grūbām un ātri vārāmām auzu pārslām, kurām ir noņemta daļa no apvalka, placinātas un sasmalcinātas. Šo metodi var izmantot, kad ir nepieciešams noteikt aptuveno saponīnu saturu analizējamā paraugā vai analizēt saponīnu saturošā sausā atlikuma sastāvu ar citām metodēm. Jāpiemin, ka sausais atlikums var saturēt kādus citus polārus savienojumus.

3.2. Kopējo saponīnu savienojumu satura spektrofotometriska noteikšana

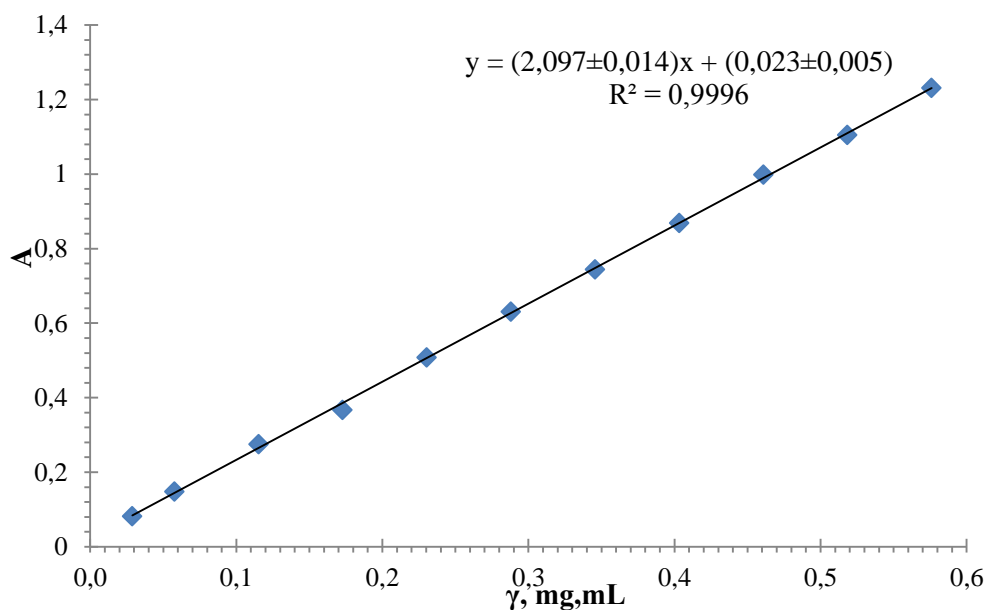
Kopējo saponīnu savienojumu saturs auzu graudu (A-4 un A-5), miežu graudu (G-1 un G-3), miežu grūbu (S-1 un S-3) un auzu pārslu (AP un AV) paraugos, noteikts ar spektrofotometrisko metodi, izmantojot vanilīna–ledus etiķskābes un perhlorskābes reaģentus. Šīs reakcijas noteicošā krāsa ir violela.

Iegūtie dati kalibrēšanas taisnes konstruēšanai ir redzami 3.2. tabulā un attiecīgi kalibrēšanas taisne attēlota 3.1. attēlā.

3.2. tabula

Dati kalibrēšanas taisnes iegūšanai

<i>Oleanolskābes šķīduma koncentrācija γ, mg/mL</i>	<i>Absorbciija, A ($\lambda=540$ nm, $b=1$ cm)</i>
0,029	0,0821
0,058	0,1483
0,115	0,2755
0,173	0,3667
0,230	0,5077
0,288	0,6309
0,346	0,7445
0,403	0,8690
0,461	0,9989
0,518	1,1047
0,576	1,2312



3.1. att. Kalibrēšanas taisne kopējo saponīnu savienojumu noteikšanai ($\lambda=540$, $b=1\text{cm}$)

Kopējo saponīnu savienojumu satura noteikšanai tiek izmantots iegūtās taisnes vienādojums $y = 2,097x + 0,023$, $R^2 = 0,9996$, kur x – masas koncentrācija γ , mg/mL un y – absorbcija. Zinot analizējamā parauga absorbciju A , iespējams aprēķināt saponīnu masas koncentrāciju γ , mg/mL.

Aprēķina piemērs auzu pārslu paraugam (Nr. AP), pēc 1. paraugu sagatavošanas metodes:

$$y = 2,097x + 0,023$$

$$0,5786 = 2,097x + 0,023$$

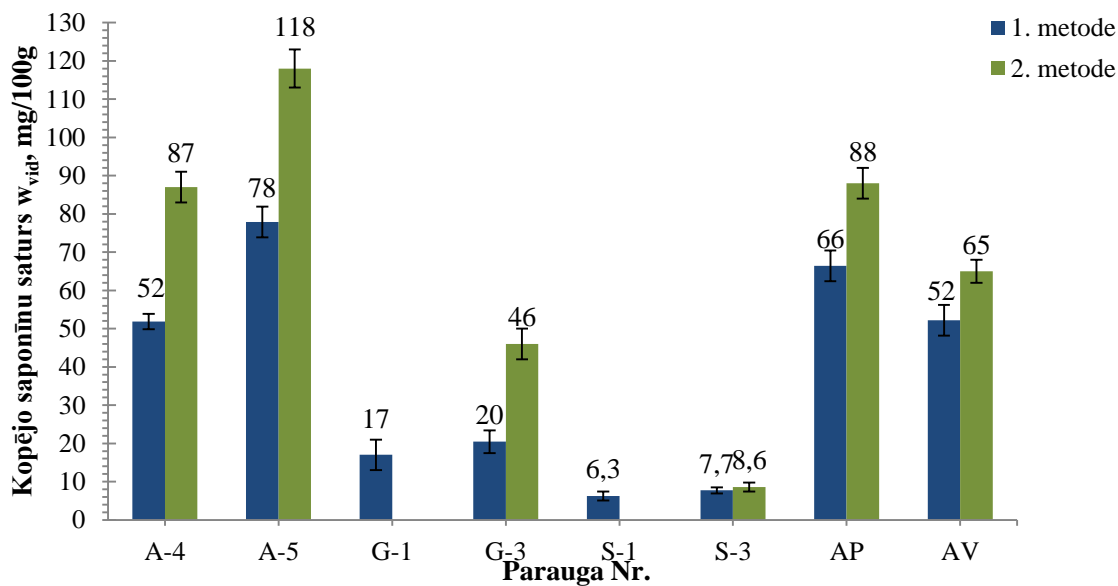
$$x = \frac{0,5786 - 0,023}{2,097} = 0,265 \text{ mg/mL}$$

Savukārt, zinot masas koncentrāciju γ un izmantojot darba gaitā secīgu parauga sagatavošanu, iespējams noteikt kopējo saponīnu savienojumu saturu, mg/100g produkta.

Aprēķina piemērs auzu graudu paraugam (Nr. AP), pēc 1. paraugu sagatavošanas metodes:

$$w = \gamma \cdot V_1 \cdot \frac{V_2}{V_3} \cdot \frac{V_4}{V_5 \cdot m_{iesv}} \cdot 100 = 0,265 \text{ mg/mL} \cdot 4 \text{ mL} \cdot \frac{105 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \cdot \frac{60 \text{ mL}}{50 \text{ mL} \cdot 2 \text{ g}} \cdot 100 = 67 \text{ mg/100g}$$

Iegūtie rezultāti apkopoti 1. pielikumā.



3.2. att. Kopējo saponīnu savienojumu saturs graudaugos un to pārstrādes produktos

Ar spektrofotometrisko metodi salīdzināti divi paraugu sagatavošanas (ekstrakciju) veidi, kur 2. paraugu sagatavošanas metode (skat. 2.5. nodaļu), kas paredzēta gravimetriskai saponīnu noteikšanai, paredz lielāku kopējo saponīnu savienojumu saturu analizējamajos paraugos (skat. 3.2. att.). Paraugu sagatavošanas metodē tiek pievērsta uzmanība ekstrakcijas posmam, kur divas reizes paraugs ekstrahēts ar ūdens–etanola šķīdumu, iegūtais ekstrakts attīrīts trīs reizes ar dietilēteri, trīs reizes ekstrahēts ar n - butanolu un n - butanola frakcija attīrīta ar 5% NaCl šķīdumu. Šādi paraugu sagatavošanas posmi palīdz vēlamu savienojumu labāku izdalīšanu no parauga matricas un atbrīvoties no citiem traucējošiem savienojumiem. Jāpiemin, ka arī lielāks parauga iesvars ekstrakta pagatavošanā nodrošina lielāku saponīnu savienojumu daudzumu.

Pēc vidēji iegūtajiem rezultātiem (skat. 3.2. att. un 1. pielikumu), kopējo saponīnu savienojumu saturs visvairāk novērojams auzu graudu (A-4 un A-5) un auzu pārslu (AP un AV) paraugiem. Miežiem un miežu grūbām, kur rūpnieciski graudiem noņemts daļa apvalka, kopējo saponīnu savienojumu saturs ir mazāks, kā arī literatūrā pieminēts, ka viendīgļlapju augu sugas maz satur vai vispār nesatur triterpenoīdo saponīnu savienojumus (skat. 1.2. nodaļu).

Metode ir atkārojama, bet rezultātu standartnovirzes lielas. Svarīgākais eksperimenta laikā ir ievērot secīgu reaģentu pievienošanu, nodrošināt šķīdumu sildīšanas temperatūru pie 60 °C, nepārsniegt sildīšanas laiku (silda 15 min) un nodrošināt kārtīgu samaisīšanu līdz homogēnam šķīdumam, kas ietekmēja darba gaitā radītās kļūdas starp paralēliem paraugiem.

3.3. Oleanolskābes un ursolskābes noteikšana ar AEŠH metodi

Oleanolskābe un ursolskābe auzu graudu, miežu graudu, miežu grūbu, kuri selekcionēti Latvijas Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūtā un uzturā plaši lietojamo auzu pārslu paraugos, noteiktas ar AEŠH metodi, izmantojot oleanolskābes un ursolskābes standartvielu.

Piemeklējot atbilstošos apstākļus triterpenoīdo saponīnu savienojumu izdalīšanai no grauda parauga matricas, pielietoja četras paraugu sagatavošanas metodes, kurās tika iekļauti vairāki pirms apstrādes posmi (žāvēšana, attaukošana un attīrīšana), ekstrakcija ar polāru šķīdinātāju un hidrolīze, lai nošķeltu saponīna struktūrai esošos cukurus (monosaharīdi un oligosaharīdi).

1. Metode (skat. 2.6. nodaļu)

Ar šo paraugu sagatavošanas metodi analizēja auzu graudu (A-7), miežu graudu (no G-1 līdz G-5), miežu grūbu (no S-1 līdz S-5) un auzu pārslu (AP un AV) paraugus.

Pēc oleanolskābes (25 µg/mL) un ursolskābes (25 µg/mL) standartvielu šķīdumiem un sakoncentrēto paraugu hromatogrammām, tika salīdzināti signāla izdalīšanas laiki, lai pārliecinātos par oleanolskābes un ursolskābes klātbūtni graudu un to pārstrādes produktu paraugā.

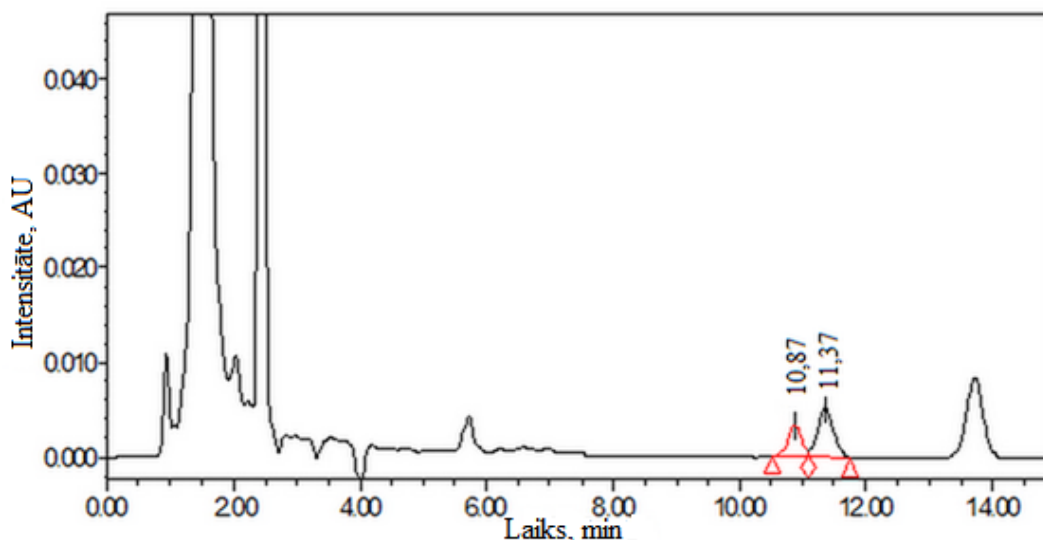
Oleanolskābes standartvielas un analizējamā auzu graudu parauga (A-7) vidējie signāla izdalīšanas laiki ir vienādi pie 10,95 min, turpretim ursolskābes standartvielas izdalīšanas laiks ir vēlāks (skat. 3.3. tabulu), pēc kā var secināt, ka auzu graudu (A-7) paraugs satur oleanolskābi.

3.3. tabula

Standartvielu un auzu grauda (A-7) parauga izdalīšanas laiku salīdzināšana

<i>Nr.p.k.</i>	<i>Oleanolskābes standartvielas izdalīšanas laiks, min</i>	<i>Ursolskābes standartvielas izdalīšanas laiks, min</i>	<i>A-7 parauga signāla izdalīšanas laiks, min</i>
1.	11,06	11,50	10,97
2.	10,87	11,52	11,01
3.	10,92	11,57	10,87
Vidējais laiks, min±DI	10,95±0,24	11,53±0,09	10,95±0,18

Lai pārbaudītu, ka auzu graudu paraugs satur oleanolskābi, paraugam pievienoja ursolskābes standartvielas piedevu. Pierādījās, ka auzu graudu paraugs (A-7) nesatur ursolskābi (skat. 3.3. att.), jo to signālu izdalīšanas laiki ir atšķirīgi 10,87 min un 11,37 min.



3.3. att. Analizējamā auzu graudu (A-7) parauga un ursolskābes standartvielas piedevas hromatogramma

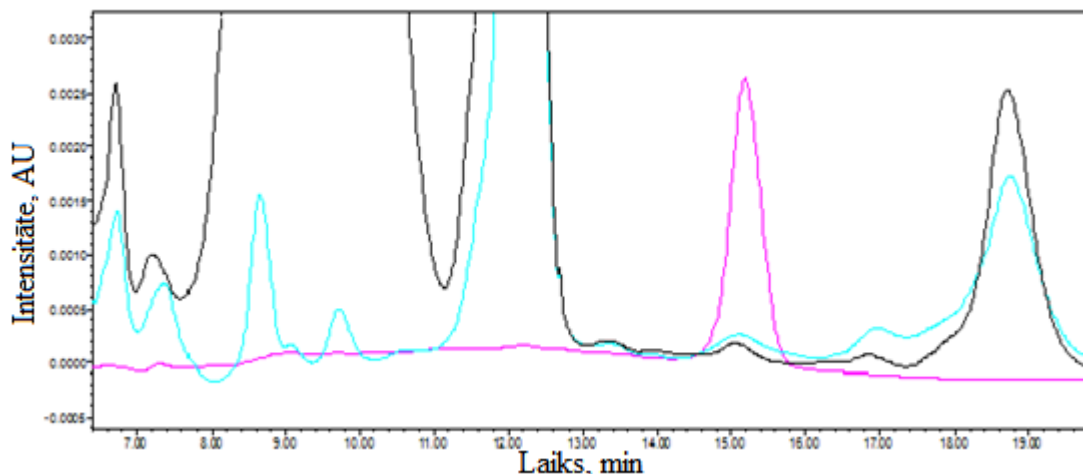
Iegūtajām miežu graudu (no G-1 līdz G-5) un miežu grūbu (no S-1 līdz S-5) paraugu hromatogrammām (skat. 2. pielikuma 3. un 4.att.), nenovēro signāla veidošanos pie standartvielu izdalīšanas laika apgabala. Lai pārliecinātos, ka miežu graudi un miežu grūbas nesatur triterpenoīdo saponīnu savienojumus – oleanolskābi un ursolskābi, paraugi tika atkārtoti analizēti pēc 3. un 4. paraugu sagatavošanas metodes.

Iegūtajām auzu pārslu paraugu (AP un AV) hromatogrammām (skat. 2. pielikuma 5.; 6.; un 7. att.) novēro signālu pie ursolskābes standartvielas izdalīšanas laika apgabala. 3.4. tabula attēlo to vidējos izdalīšanas laikus, kuri savstarpēji ir stipri līdzīgi. 3.4. attēlā salīdzināšanas hromatogramma pierāda, ka auzu pārslu paraugi satur ursolskābi.

3.4. tabula

Standartvielas un auzu pārslu (AP un AV) paraugu izdalīšanas laiku salīdzināšana

Nr.p.k.	Ursolskābes standartvielas izdalīšanas laiks, min	AP parauga signāla izdalīšanas laiks, min	AV parauga signāla izdalīšanas laiks, min
1.	15,18	15,08	15,05
2.	15,16	15,10	15,09
3.	15,16	15,10	15,07
Vidējais laiks, min±DI	15,17±0,03	15,09±0,03	15,07±0,05



3.4. att. Analizējamo auzu pārslu PA (zils), AV (melns) paraugu un ursolskābes standartvielas (rozā) salīdzināšanas hromatogramma

2. Metode (skat. 2.6. nodaļu)

Ar šo paraugu sagatavošanas metodi analizēja auzu pārslu (AP un AV) paraugus.

Lai pārliecinātos par cita polāra šķīdinātāja efektīvu pielietojumu ekstrakcijas laikā, auzu pārslu paraugiem ūdens vietā tika izmantots 50% etanola-ūdens šķīdums. Iegūtajās analizējamo paraugu hromatogrammās (skat. 2. pielikuma 8. att.), standartvielu izdalīšanas apgalā nenovēro nekādu signālu. Iemesls varētu būt izskaidrojams ar to, ka ekstrakcijas laikā paaugstinātā temperatūra un ķīmiskā apstrāde ietekmē nestabilo molekulu sadalīšanos un citu savienojumu veidošanos.

3. Metode (skat. 2.6. nodaļu)

Ar šo paraugu sagatavošanas metodi analizēja auzu graudu (no A-1 līdz A-6), miežu graudu (no G-1 līdz G-5), miežu grūbu (no S-1 līdz S-5) un auzu pārslu (AP un AV) paraugus. Metodē vairāk pievērsa uzmanību analizējamo paraugu priekšapstrādes un ekstrakcijas posmam. Pēc parauga žāvēšanas un sasmalcināšanas, veica attaukošanu ar n - heksānu, lai atbrīvotos no lipofilām vielām (taukiem), kuras var būtiski traucēt ekstrakcijas laikā. Ekstrakciju veica ultraskaņas vannā, lai veicinātu interesējošo savienojumu izdalīšanu no sarežģītās graudauga matricas. Atlikumu pēc apstrādes ar hloroformu šķīdināja acetonitrilā un maisījumu sakoncentrēja slāpekļa plūsmā līdz sausam atlikumam.

Oleanolskābes (25 µg/mL), ursolskābes (25 µg/mL) standartšķīdumu un auzu pārslu (AP un AV) paraugu hromatogrammu signālu izdalīšanas laiki attēloti 3.5. tabulā un 2. pielikuma 9.; 10.; 11.; un 12. attēlos.

Standartvielu un auzu pārslu (AP un AV) paraugu izdalīšanas laiku salīdzināšana

<i>Nr.p.k.</i>	<i>Ursolskābes standartvielas izdalīšanas laiks, min</i>	<i>Oleanolskābes standartvielas izdalīšanas laiks, min</i>	<i>AP parauga signāla izdalīšanas laiks, min</i>	<i>AV parauga signāla izdalīšanas laiks, min</i>
1.	14,37	14,18	14,31	14,29
2.	14,34	14,20	14,36	14,32
3.	14,35	14,18	14,34	14,30
Vidējais laiks, min±DI	14,35±0,04	14,19±0,03	14,34±0,06	14,30±0,04

Pēc to signālu vidējiem izdalīšanas laikiem var secināt, ka auzu pārslu paraugi satur ursolskābi, jo pēc pirmās paraugu sagatavošanas metodes arī izdalītā signāla laiks ir tuvs ursolskābes standartam. Jāpiebilst, ka slāpekļa plūsmā sakoncentrētajiem paraugiem ir novērojamas signāli/smailes ar lielāku intensitāti.

Auzu graudu (A-4 un A-5) paraugu hromatogrammas uzrāda signālu veidošanos pie 14,32 min un 14,29 min. To intensitāte bija ļoti zema, tāpēc atkārtoti netika uzņemtas hromatogrammas.

Auzu graudu (A-1, A-2, A-3 un A-6) paraugu hromatogrammas neuzrāda signālu veidošanos pie standartvielu izdalīšanas laika.

Miežu graudu (no G-1 līdz G-5), miežu grūbu (no S-1 līdz S-5) paraugu hromatogrammas neuzrāda signālu veidošanos pie standartvielu izdalīšanas laika, pēc kā var secināt, ka miežu graudi un miežu grūbas nesatur triterpenoīdo saponīnu savienojumus – oleanolskābi un ursolskābi. Tas pats pierādās arī analizējot paraugus pēc pirmās paraugu sagatavošanas (ekstrakcijas) metodes.

4. metode (skat. 2.6. nodaļu)

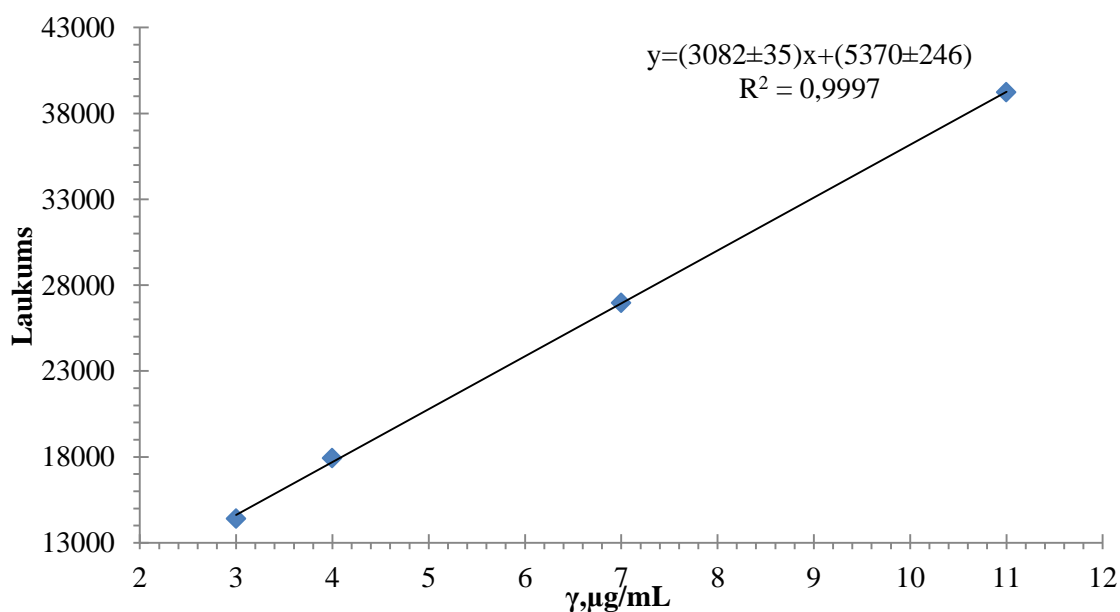
Ar šo paraugu sagatavošanas metodi analizēja auzu graudu (A-4 un A-5), miežu graudu (G-5), miežu grūbu (S-5) un auzu pārslu (AP un AV) paraugus.

Gravimetriskās metodes iegūto saponīnu saturošo sauso atlikumu pēc apstrādes ar n-butanolu (skat. 2.2. nodaļu), šķīdināja ūdenī un hidrolizēja ar koncentrētu HCl, lai iegūto saponīnu struktūrai nošķeltu monosaharīdus un oligosaharīdus. Pēc šāda veida ekstrakcijas un vairāku stadiju apstrādes, saponīnu struktūra tika samocīta un ķīmiski, termiski sagrauta, jo attēlotajām paraugu hromatogrammām nenovēro signālu veidošanos pie standartvielu izdalīšanas laika. Iepriekš pēc 1. un 3. ekstrakciju metodes, auzu graudu un auzu pārslu

paraugu hromatogrammām bija novērojams signālu veidošanās pie standartvielu izdalīšanas laika apgabala, pēc tā var secināt, ka šī paraugu sagatavošanas metode ir neefektīva.

3.3.1. Linearitāte, noteikšanas robeža (LOD) un kvantificēšanas robeža (LQD)

Lai noteiktu analīzes metodes jutību, pēc lineārās regresijas taisnes slīpuma ($S' = 3082$) (skat. 3.5. att.) un zināmo koncentrāciju šķīdumu signālu laukumu (S) standartnovirzēm (σ) (skat. 3.6. tabulu), aprēķināja LOD un LQD.



3.5. att. Lineārās taisnes grafiks LOD un LOD aprēķināšanai

3.6. tabula

Dati LOD un LQD aprēķināšanai

Ursolskābes masas koncentrācija γ , $\mu\text{g/mL}$	S_1	S_2	S_3	$S_{\text{vid}} \pm \sigma_3$
3	14394	13837	14985	14405 ± 574
4	18322	17338	18100	17920 ± 516
7	26457	28644	25805	26969 ± 1487
11	42840	37038	37801	39226 ± 3153

Aprēķinātā metodes noteikšanas robeža (LOD) $0,56 \mu\text{g/mL}$, ir viszemākā analizējamā koncentrācija paraugā, kuru var noteikt ar šo analīzes metodi, bet nav iespējams vērtību

kvantificēt. LOD pārbaudīja ar ursolskābes standartvielas izejas šķīdumu (25 µg/mL), to atšķaidot līdz koncentrācijai 3 µg/mL, kura ir trīs reizes lielāka (S/N=3) par bāzes līnijas signālu (troksni).

LOD prēķina piemērs:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{S'} = \frac{3,3 \cdot 574 \mu g/mL}{3082} = 0,56 \mu g/mL$$

Metodes kvantificēšanas robeža (LQD) 4,82 µg/mL ir viszemākā analizējamā koncentrācija paraugā, kuru var kvantitatīvi noteikt ar šo analīzes metodi. LQD pārbaudīja ar ursolskābes standartvielas izejas šķīdumu (25 µg/mL), to atšķaidot līdz koncentrācijai 7 µg/mL, kura ir 10 reizes lielāka (S/N=10) par bāzes līnijas signālu (troksni).

LQD prēķina piemērs:

$$LQD = \frac{10 \cdot \sigma}{S'} = \frac{10 \cdot 1487 \mu g/mL}{3082} = 4,82 \mu g/mL$$

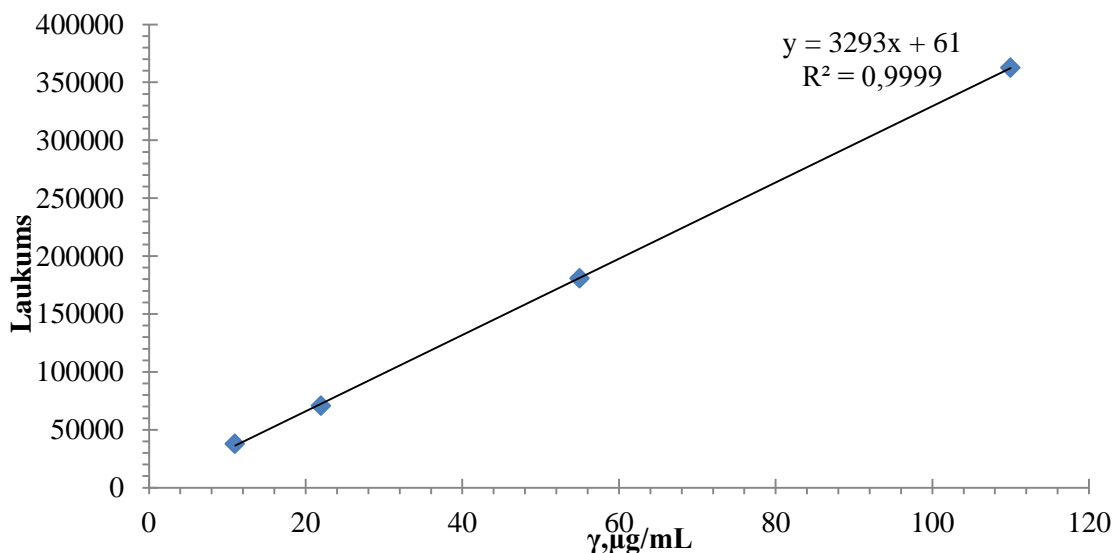
3.3.2. Oleanolskābes un ursolskābes kvantitatīva noteikšana paraugos

Pēc ursolskābes kalibrēšanas grafika vienādojuma, var aprēķināt triterpenoīdo saponīnu savienojumu koncentrāciju analizējamiem paraugiem acetnitrila maisījumā. Eksperimentāli iegūtie dati kalibrēšanas taisnes konstruēšanai ir redzami 3.7. tabulā, attiecīgā kalibrēšanas taisne 3.6. attēlā.

3.7. tabula

Dati kalibrēšanas taisnes iegūšanai

<i>Ursolskābes šķīduma koncentrācija γ, µg/ml</i>	S_1	S_2	S_3	$S_{vid} \pm DI$
11	38021	37801	37987	379336±294
22	70873	71049	70543	70822±638
55	182380	180068	180234	180894±3204
110	362788	362459	362546	362598±424



3.6. att. Ursolskābes standartvielas kalibrēšanas taisne

Koncentrācijas aprēķināšanai tiek izmantots iegūtais taisnes vienādojums $y=3293x + 61$; $R^2=0,9999$, kur x – masas koncentrācija γ , $\mu\text{g/mL}$ un y – signāla laukums ursolskābes standartvielai (skat. 3.7. tabulu). Zinot analizējamā parauga signāla vidējo laukumu (skat. 3.5. tabulu), iespējams aprēķināt masas koncentrāciju γ , mg/mL .

Aprēķina piemērs auzu graudu paraugam (Nr. A-7), pēc 1. paraugu sagatavošanas metodes:

$$\gamma = 3293x + 61$$

$$52004 = 3293x + 61$$

$$x = \frac{52004-61}{3293} = 15,8 \mu\text{g/mL}$$

Savukārt, zinot parauga masas koncentrāciju γ un izmantojot darba gaitā secīgu parauga sagatavošanu, iespējams aprēķināt oleanolskābes/ursolskābes saturu $\text{mg}/100\text{g}$ graudauga vai to pārstrādes produkta.

Aprēķina piemērs auzu graudu paraugam (Nr. A-7), pēc 1. paraugu sagatavošanas metodes:

$$w = \gamma \cdot V_1 \cdot \frac{V_2}{V_3} \cdot \frac{V_4}{V_5 \cdot m_{iesv}} \cdot 100 = 15,8 \mu\text{g/mL} \cdot 10 \text{ mL} \cdot \frac{50 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} \cdot \frac{100 \text{ mL}}{50 \text{ mL} \cdot 4,5 \text{ g}} \cdot 100 = 7022$$

$$\mu\text{g}/100\text{g} \text{ vai } 7,0 \text{ mg}/100\text{g}$$

Iegūtie rezultāti redzami 3.8. tabulā.

Analizējamo graudaugu un to pārstrādes produktu rezultāti

Metodes Nr.*	Parauga Nr.**	Signāla laukums	Parauga masas koncentrācija $\gamma, \mu\text{g/mL}$	OS/US*** saturs $w, \text{mg/100g}$	$S_n (n=3), \text{mg/100g}$	OS/US saturs $w_{\text{vid}} \pm \text{DI}, \text{mg/100g}$
1.	A-7	52004	15,8	7,0	0,102	6,9±0,3
		50793	15,4	6,8		
		50613	15,4	6,8		
	AP	7318	< LOD	-	-	-
		8615	< LOD	-	-	-
		8506	< LOD	-	-	-
	AV	4120	< LOD	-	-	-
		3969	< LOD	-	-	-
		4056	< LOD	-	-	-
3.	AP	48760	14,8	0,099	0,007	0,11 ± 0,02
		56025	17,0	0,11		
		52380	15,9	0,11		
	AV	23657	7,17	0,05	0,007	0,05 ± 0,02
		29951	9,08	0,06		
		25438	7,71	0,05		
	A-4	1156 (n=1)	< LOD	-	-	-
A-5	1007 (n=1)	< LOD	-	-	-	

Apzīmējumi: * skat. 2.6. nodaļu; ** skat. 2.1. tabulu; *** OS - oleanolskābe, US - ursolskābe; < LOD mazāks par metodes noteikšanas robežu; n=1 veikts viens mērījums.

Oleanolskābes/ursolskābes kvantitatīvo saturu aprēķināja tikai A-7, AP un AP paraugiem, jo auzu graudu A-4 un A-5 un auzu pārslu AP un AV (ar 1. paraugu sagatavošanas metodi) paraugu masas koncentrācija ir zem metodes noteikšanas robežas.

Darbā izmantotie graudi ir audzēti vienādos apstākļos, tāpēc to atšķirība var būt tikai starp graudu veidiem, šķirnēm un pielietotām paraugu sagatavošanas metodēm (ekstrakcijām). Pēc 3.3. tabulas, auzu graudu parauga A-7 (ar 1. paraugu sagatavošanas metodi, skat. 2.6. nodaļu) vidējie signālu izdalīšanas laiki sakrīt ar oleanolskābes standartvielas izdalīšanas laikiem, pēc kā var secināt, ka A-7 satur $6,9 \pm 0,3$ mg oleanolskābi uz 100 g auzu graudu.

Pēc 3.5. tabulas, auzu pārslu paraugu AP un AV (ar 3. paraugu sagatavošanas metodi, skat. 2.6. nodaļu) vidējie signālu izdalīšanas laiki ir tuvu ursolskābes standartvielas izdalīšanas laikiem, pēc kā var secināt, ka AP un AV satur $0,11 \pm 0,02$ mg un $0,05 \pm 0,02$ mg ursolskābi uz 100 g auzu pārslu. Pilngraudu un ātri vārāmo auzu pārslu paraugu rezultāti uzrāda likumsakarības, jo pilngraudu pārslas satur divreiz vairāk ursolskābes.

Literatūrā nav veikta šo savienojumu noteikšana graudaugos, tāpēc tika apspēlētas četras paraugu sagatavošanas (ekstrakciju) metodes, lai atrastu nepieciešamos apstākļus triterpenoīdo savienojumu izdalīšanai no sarežģītās graudaugu matricas. Labāku rezultātu iegūšanai vajadzīga aparatūra ar augstāku izšķirtspēju un citas standartvielas, jo saskaņā ar literatūru (skat. 1.2. nodaļu), auzu graudiem raksturīgi steroīda avenakozīda un oleanāna tipa triterpenoīda avenacīna saponīnu savienojumi.

SECINĀJUMI

1. Gravimetriskās metodes iegūtie rezultāti parāda, ka metodi var izmantot aptuvenai saponīnu satura izvērtēšanai dažādu šķirņu graudaugos un to pārstrādes produktos, kā arī saponīnu saturošā sausā atlikuma sastāva analizēšanai ar citām saponīnu noteikšanas metodēm.
2. Spektrofotometrisko metodi var izmantot kopējo saponīnu savienojumu satura noteikšanai graudaugos un to pārstrādes produktos, kur vislielāko rezultātu uzrāda auzu graudu (A-4 un A-5) un auzu pārslu (AP) paraugi.
3. Darba gaitā pierādīts, ka ar AEŠH metodi ir iespējams noteikt *oleanolskābi* un *ursolskābi* un aprēķināt tās kvantitatīvo saturu analizējamo auzu graudu (A-7), auzu pārslu (AP un AV) paraugos.
4. Analizējamo miežu graudu (no G1 līdz G5) un miežu grūbu (no S-1 līdz S-5) paraugos, ar AEŠH metodi netiek pierādīta *oleanolskābe* un *ursolskābe*.
5. Gravimetriskā, spektrofotometriskā un AEŠH saponīnu savienojumu noteikšanas metodes ir savstarpēji salīdzināmas, jo iegūtajos rezultātos ir novērojamas vienas un tās pašas tendences starp graudu veidiem, šķirnēm un to pārstrādes produktiem.
6. Uzmanība jāpievērš graudu paraugu sagatavošanai, jo saponīni ir termiski, ķīmiski nestabili un hidrofilī savienojumi, kas var būtiski ietekmēt gala rezultātu.
7. Lai auzu graudos identificētu triterpenoīda avenacīna un steroīda avenakozīda tipa saponīnus, nepieciešams lietot citas hromatogrāfijas aparatūras (piemēram, literatūrā pieminēto UAEŠH metodi) un paraugu sagatavošanas metodes [13].

PATEICĪBA

Vēlos izteikt pateicību Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes asoc. prof Idai Jākobsonei, fizikālās ķīmijas katedras hromatogrāfijas asoc. prof. P. Mekšam, vad. pēt. Antonam Podjavam un studentam Svjatoslovam Kiskinam par sadarbību maģistra daba izstrādes procesā.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Koehler, P.; Wieser, H. Chemistry of Cereal Grains. Handbook on Sourdough Biotechnology. *Media New York*, **2013**, 11-45.
2. Rakicka. M.; Strudik, E.; Marko, A. Health - promoting substances contained in cereals (review). *Acta Chemica Slovaca*, **2013**, 6, 256-268.
3. Cereal processing. Encyclopaedia Britannica. <http://www.britannica.com/topic/cereal-processing> (skatīts 24.02.2016.).
4. Zielinski, H.; Ceglinska, A.; Michalska, A. Antioxidant contents and properties as quality indices of rye cultivars. *Food Chemistry*, **2007**, 104, 980–988.
5. Andersson, A. A. M; Börjesdotter, D. Effects of environment and variety on content and molecular weight of β -glucan in oats. *Journal of Cereal Science*, **2011**, 54, 122-128.
6. Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūts. <http://www.stendeselekcija.lv/jaunumi/data/augsuplades/files/Kas%20graudos%20v%C4%93rt%C4%ABg%C4%81kais.pdf> (skatīts 16.01.2016.).
7. Bernstein, A. M .; Titgemeier, B.; Kirkpatrick, K.; Golubic, M.; Roizen, M. F. Major Cereal Grain Fibers and Psyllium in Relation to Cardiovascular Health. *Nutrients*, **2013**, 5, 1471-1487.
8. Board, N. Wheat, Rice, Corn, Oat, Barley and Sorghum Processing Handbook. In: *Cereal Food Technology*; Asia Pacific Business Press Inc., 2006, pp 4-5.
9. BrindZova, L; Čertik, M., Rapta, P.; Zalibera, M. Antioxidant Activity, β – Glucan and Lipid Contents of Oat Varieties. *Czech J. Food Sci*, **2008**, 26, 163-173.
10. Shewry, P. R.; Halford, N.G. Cereal seed stronge proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, **2001**, 53, 947-958.
11. Saponins. <http://www.fao.org/3/a-i4042e/i4042e16.pdf> (skatīts 16.01.2016.).
12. Sparg, S.G.; Light, J.; Staden, V. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 94, 219-243.
13. Pecio, L.; Wawrzyniak – Szolkowska, A; Oleszek, W.; Stochmal, A. Rapid analysis of avenacosides in grain and husks of oats by UPLC-TQ-MS. *Food Chem*, **2013**, 141, 2300-2304.
14. Moghimipour, E.; Handali, S. Saponin: Properties, Methods of Evaluation and Applications. *Annual Research & Review in Biology*, **2015**, 5, 207-220.
15. Abid Ali Khan, M. M.; Naqvi, T. S.; Naqvi, M. S. Identification of phyto saponins as novel biodynamic agents: an updated overview. *Asian J. Exp.Biol.Sci*, **2012**, 3, 459-467.

16. Chaieb, I. Saponins as Insecticides: a Review. *Tunisian Journal of Plant Protection*, **2010**,5, 39-50.
17. Almutairi, M. S.; Ali, M. Direct detection of saponins in crude extracts of soapnuts by FTIR, *Natural Product Research*, **2014**, 29, 1-5.
18. George, F.; Zohar, K.; Harinder, P.S.; Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, **2002**, 88, 587-605.
19. Townsend, B.; Jenner, H.; Osbourn, A. Saponin glycosylation in cereals, *Phytochemistry Reviews*, **2006**, 5, 109-114
20. Osbourn, E. A. Saponins cereals, *Phytochemistry*, **2003**, 62, 1-4.
21. Barbosa, A. P. An Overview on the Biological and Pharmacological Activities of Saponins. *Int J of Pharm Sci*, **2014**, 6, 47-50.
22. Escalante, M. A.; Santecchia, C. B.; Lopez, S. N.; Gattuso, M. A.; Ravelo, A. G.; Monache, F. D.; Sierra, M. G.; Zacchino, S. A. Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an Argentinean species in critic risk, *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**, 82, 29-34.
23. Lanzotti, V.; Romano, A.; Lanzuise, S.; Bonanomi, G.; Scala, F. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa L.*, *Phytochemistry*, **2012**, 74, 133-139.
24. Lacaille-Dubois, M. A.; Wagner, H. Areview of the biological and pharmacological activities of saponins, *Phytomedicine*, **1996**, 2, 363-386.
25. Vyas, N.; Argal, A. Isolation and characterization of oleanolic acid from roots of *Lantana Camara*. *Asian J Pharm Clin Res*, **2014**, 7, 189-191.
26. Pollier, J.; Goossens, A. Oleanolic acid. *Phytochemistry*, **2012**, 77, 10-15.
27. Chen, H.; Gao, Y.; Wang, A.; Zhou, X.; Zheng, Y.; Zhou, J. Evaluation in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, 92, 648-655.
28. Osbourn, A.; Goss, R. J.; Field, R. A. The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Nat Prod Rep*, **2011**, 28, 1261-1268.
29. Runner, R.T. Extraction and Isolation of Saponins. *Natural products Isolation, Methods in Molecular Biology*, **2012**, 415-426.
30. Cheok, C. Y.; Salman, H. A. K.; Sulaiman, R. Extraction and Quantification of Saponins: Areview. *Food Research International*, **2014**, 59, 16-40.
31. Reddy, P.; Muhammad, S. B. Z.; Iqbal, A.; Duduku, K. Kinetic Study of Microwave Assisted Extraction of Hypoglycemic Active Compounds from *Ceriops Decandra* sp. Leaves using Ethanol: Comparison with the Soxhlet Extraction. *Journal of Applied Sciences*, **2011**, 11, 2364-2369.

32. YI, C.; Ming-Yong, X.; Xiao-Feng, G. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Journal of Food Engineering*, **2007**, *81*, 162-170.
33. Vilkhū, K.; Mawso, R.; Simons, L.; Bates, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **2008**, *9*, 161-169.
34. Bimark, M.; Rahman, R. A.; Saleena Taip, F.; Adzahan, N. M.; Islam Sarker, Z.; Ganjloo, A. Ultrasound-assisted extraction of valuable compounds from winter melon (*Benincasa hispida*) seeds. *International Food Research Journal*, **2013**, *20*, 331-338.
35. Quajuan, F.; Lihua, Z.; Nini, C.; Ming, J.; Yuanhu, Z. Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum L.*) flowers. *Food and Bioproducts processing*, **2014**, *92*, 321-327.
36. Bondoc, K. G.V.; Hyeyoung, L.; Cruz, L. J.; Lebrilla, C. B.; Juinio-Menez, A. J. Chemical fingerprinting and phylogenetic mapping of saponin congeners from three tropical holothurian sea cucumbers, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **2013**, *166*, 182-193.
37. Colorimetric determination of total saponin content of licorice. *Medicine pharmacy papers*.
http://eng.hi138.com/medicine-papers/pharmacypapers/200805/135403_colorimetric-determination-of-total-saponin-content-of-licorice.asp#.V0BudUQ2WfU (skatīts 21.05.2016.).
38. Xiao-yan, L.; Ging, Su.; Honh-wei, Hu.; Meng, T. Comparison among Extraction Process of Total Saponin from Cornsilk. *Journal of Convergence Information Technology*, **2013**, *8*.
39. Kovač-Bešovič, E. E.; Durič, K.; Kalodera, Z.; Sofič, E. Identification and isolation of pharmacologically active triterpenes in Betulae Cortex, *Betula pendula roth.*, Betulaceae. *Bosnian Journal of Basic Medical*, **2009**, *9*, 31-38.
40. Oleszek, W.; Bialy, Z. Chromatographic determination of plant saponins – An update (2002 – 2005). *J. Chromatogr. A.*, **2006**, *1112*, 78-91.
41. Gnoatto, S. C. B.; Schenkel, E. P.; Bassani, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2005**, *16*, 723-726.
42. Berhow, M. A.; Cantrell, C. L.; Duval, S. M.; Dobbins, T. A.; Maynes, J.; aughn, S. F. Analysis and Quantitative Determination of Group B saponins in Processed Soybean Products. *Phytochemical Analysis*, **2002**, *13*, 343-348.

43. Edewor, T. I.; Akpor, O. B.; Owa, S. O. Determination of antibacterial activity, total phenolic, flavonoid and saponin contents in leaves *Anogeissus leicoarpus* (DC.) Guil and Perr, *Journal of Coastal Life Medicine*, **2016**, *4*, 310-314.
44. Nwinuka, N. M.; Ibeh, G. O.; Ekeke, G. I. Proximate Composition And Levels Of Some Toxicants In Four Commonly Consumed Spices. *J. Appl. Sci. Enviromen. Mgt.*, **2005**, *9*, 150-155.
45. Snyder, R. S; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. Introduction to modern liquid chromatography; JohnWiley & Sons, Inc., Hoboken: New Jersey, 2010, pp 509-515.

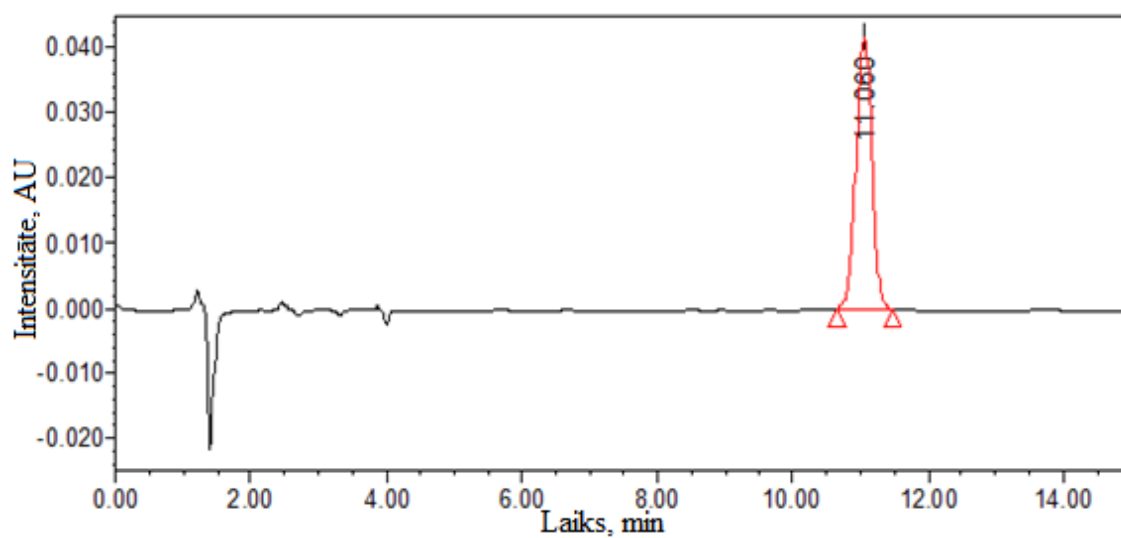
Par pētījuma darba procesu ziņots 2016. gada 17. februārī, Latvijas Universitātes 74. konferences sekcijas sēdē „Pārtikas ķīmija”.

PIELIKUMI

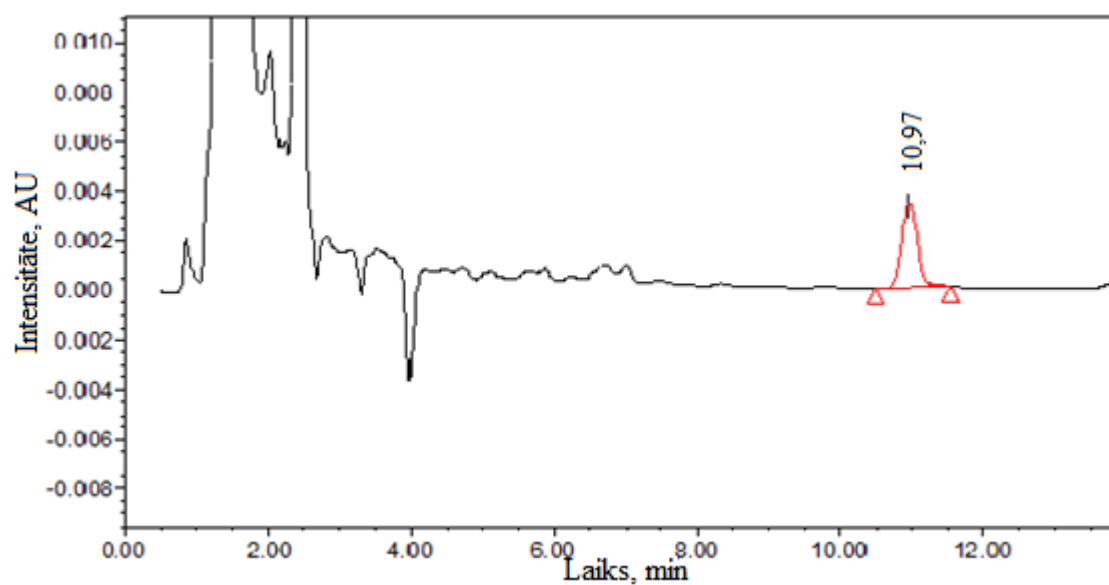
Spektrofotometriskās metodes rezultātu apkopojums

Parauga Nr.	A	γ , mg/mL	w, mg/100g	w_{vid} , mg/100g	S_n (n=3), mg/100g	DI, mg/100g
1. paraugu sagatavošanas metode						
A-4	0,4490	0,203	51	52	0,90	2
	0,4514	0,204	51			
	0,4632	0,210	53			
A-5	0,6722	0,310	78	78	1,48	4
	0,6832	0,315	79			
	0,6587	0,303	76			
G-1	0,1511	0,061	15	17	1,41	4
	0,1698	0,070	18			
	0,1734	0,072	18			
G-3	0,2033	0,086	22	20	1,12	3
	0,1855	0,077	19			
	0,1912	0,080	20			
S-1	0,0785	0,026	6,7	6,2	0,47	1,2
	0,0760	0,025	6,3			
	0,0712	0,023	5,7			
S-3	0,0894	0,032	8,0	7,7	0,31	0,8
	0,0848	0,029	7,4			
	0,0885	0,031	7,8			
AP	0,5786	0,265	67	66	1,78	4
	0,5894	0,270	68			
	0,5602	0,256	65			

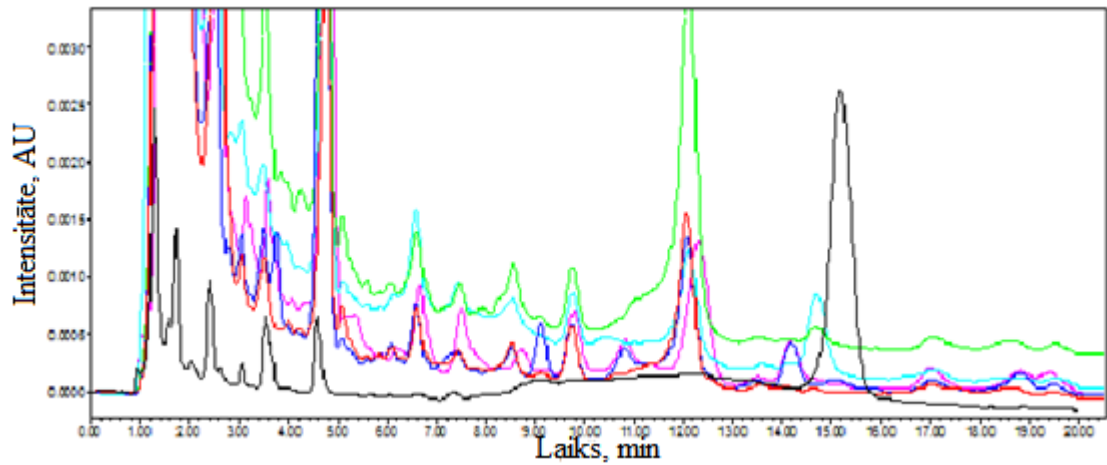
AV	0,4705	0,213	54	52	1,63	4
	0,4588	0,208	52			
	0,4438	0,195	51			
2. paraugu sagatavošanas metode						
A-4	0,1154	0,044	87	87	1,41	4
	0,1133	0,043	85			
	0,1162	0,044	88			
A-5	0,1775	0,074	120	118	1,81	5
	0,1759	0,073	119			
	0,1729	0,071	116			
S-3	0,0975	0,036	9,0	8,6	0,47	1,2
	0,0956	0,035	8,8			
	0,0900	0,032	8,1			
G-3	0,0834	0,029	47	46	1,43	4
	0,0845	0,029	47			
	0,0809	0,028	45			
AP	0,1016	0,037	89	88	1,56	4
	0,0997	0,037	86			
	0,1024	0,038	90			
AV	0,1006	0,037	65	65	1,18	3
	0,0984	0,036	64			
	0,1010	0,037	66			



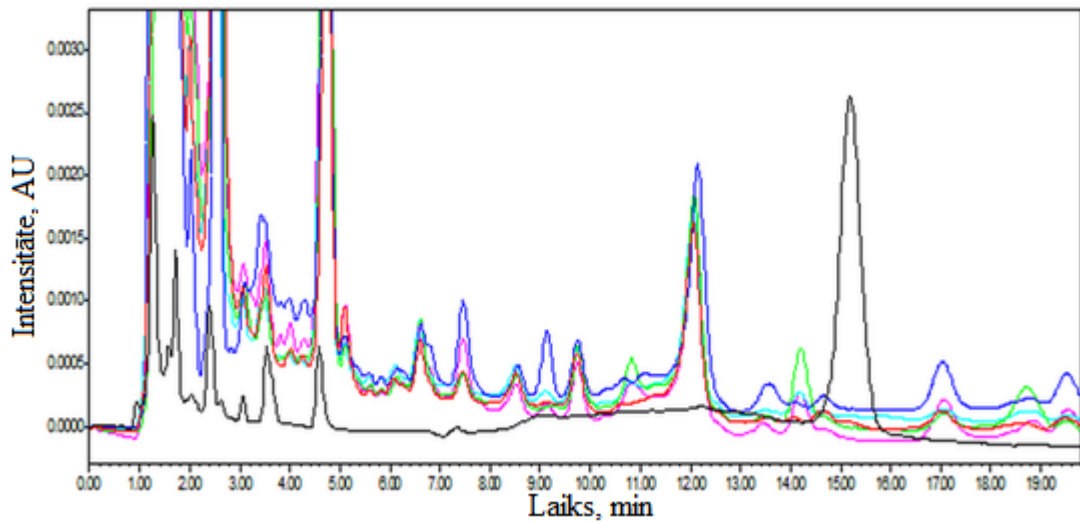
1. att. Oleanolskābes standartvielas hromatogramma, signāla izdalīšanas laiks pie 11,06 min



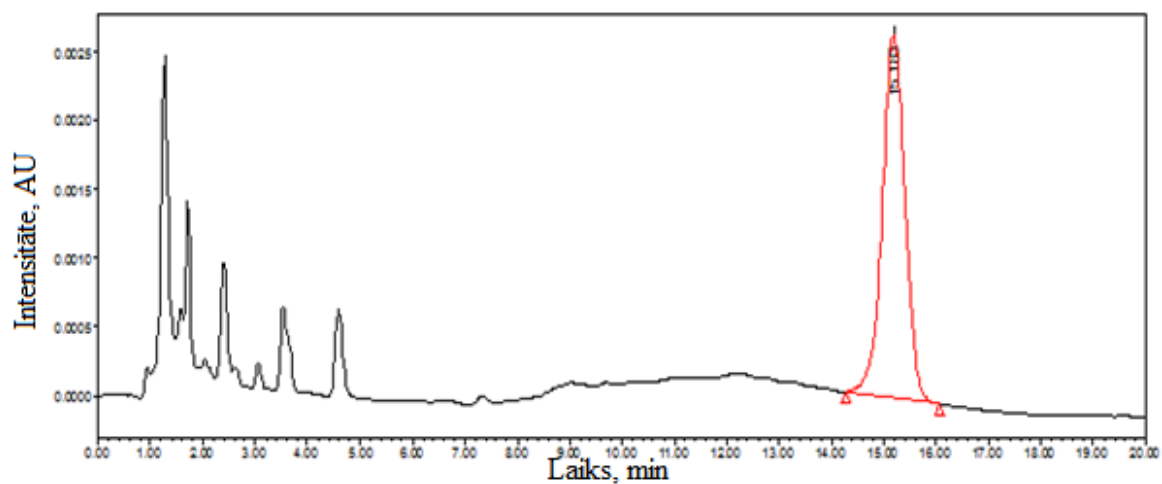
2. att. Analizējamā auzu graudu (Nr. A-7) parauga hromatogramma, signāla izdalīšanas laiks pie 10,97min



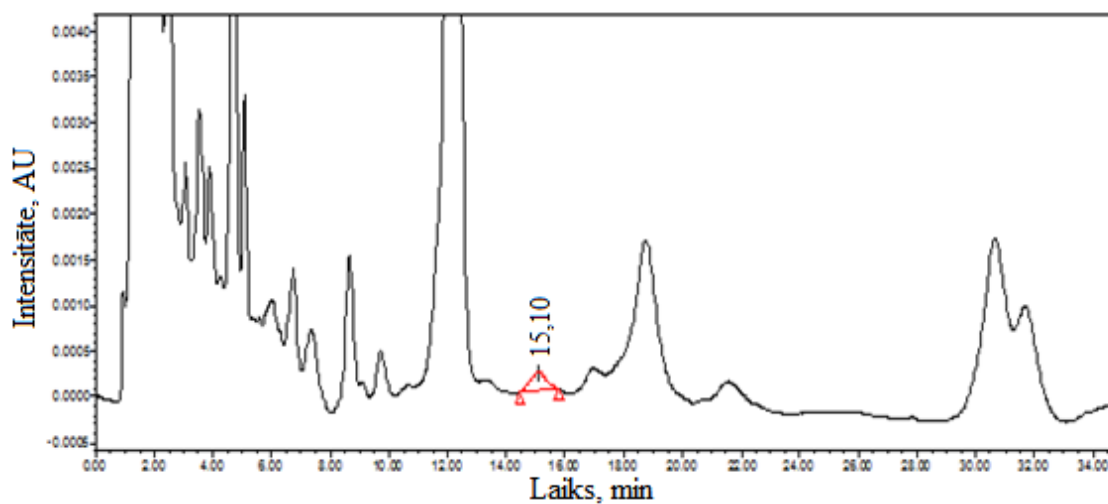
3. att. Analizējamo miežu graudu G-1 (sarkans), G-2 (gaiši zils), G-3 (zaļš), G-4 (zils), G-5 (rozā) paraugu un ursolskābes standartvielas (melns) salīdzināšanas hromatogramma



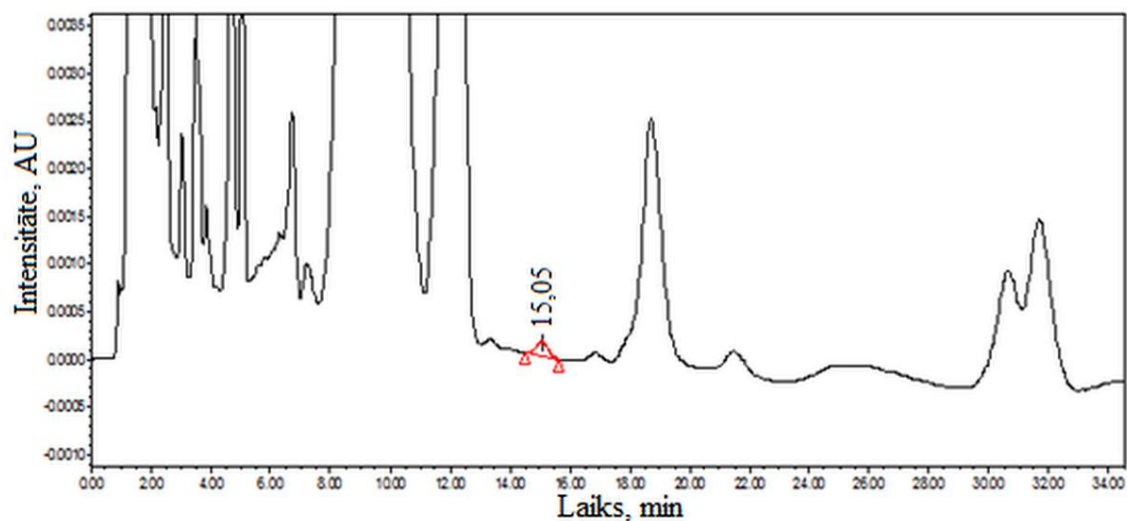
4. att. Analizējamo miežu grūbu S-1 (rozā), S-2 (gaiši zils), S-3 (zaļš), S-4 (zils), S-5 (sarkans) paraugu un ursolskābes standartvielas (melns) salīdzināšanas hromatogramma



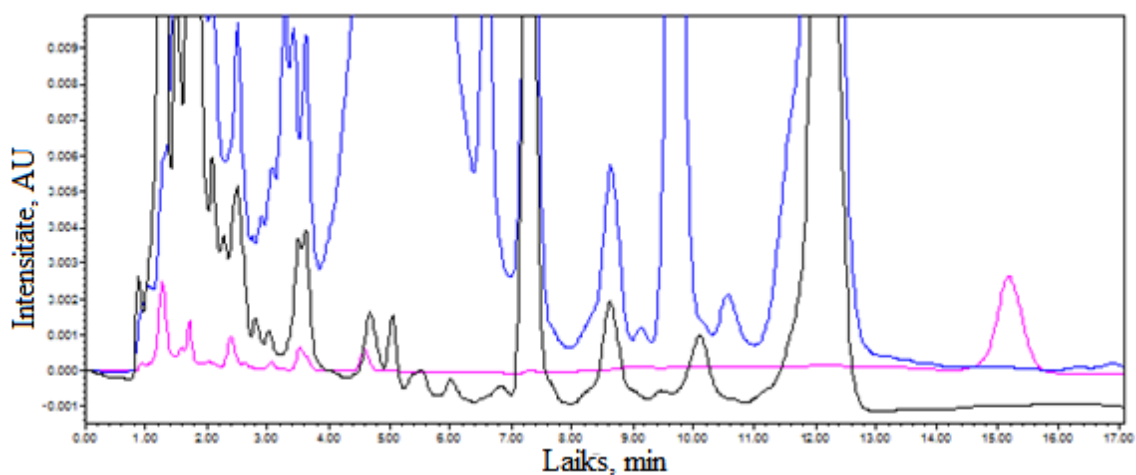
5. att. Ursolskābes standartvielas hromatogramma (25 ,0 µg/mL), signāla izdalīšanas laiks pie 15,18 min



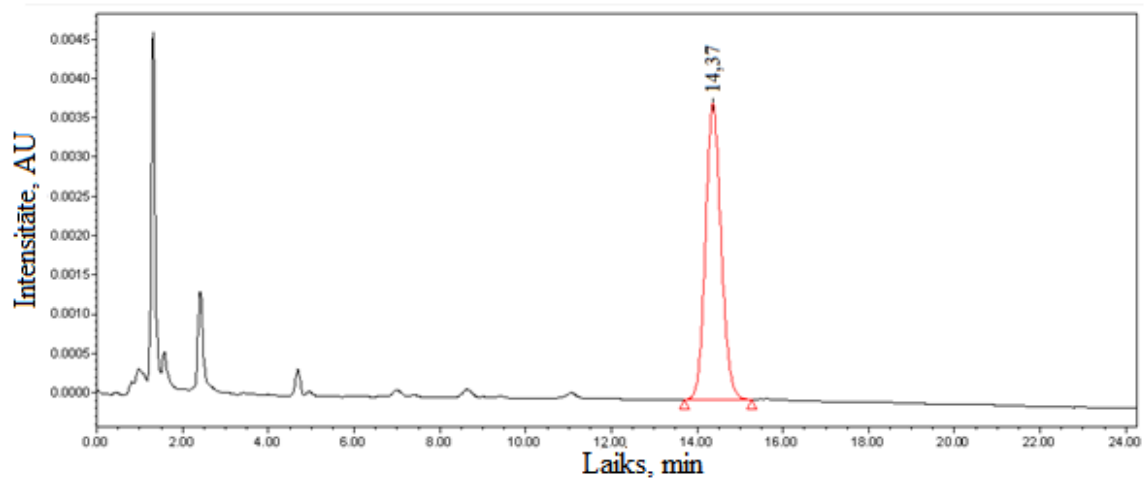
6. att. Analizējamā auzu pārslu (AP) parauga hromatogramma, signāla izdalīšanas laiks pie 15,10 min



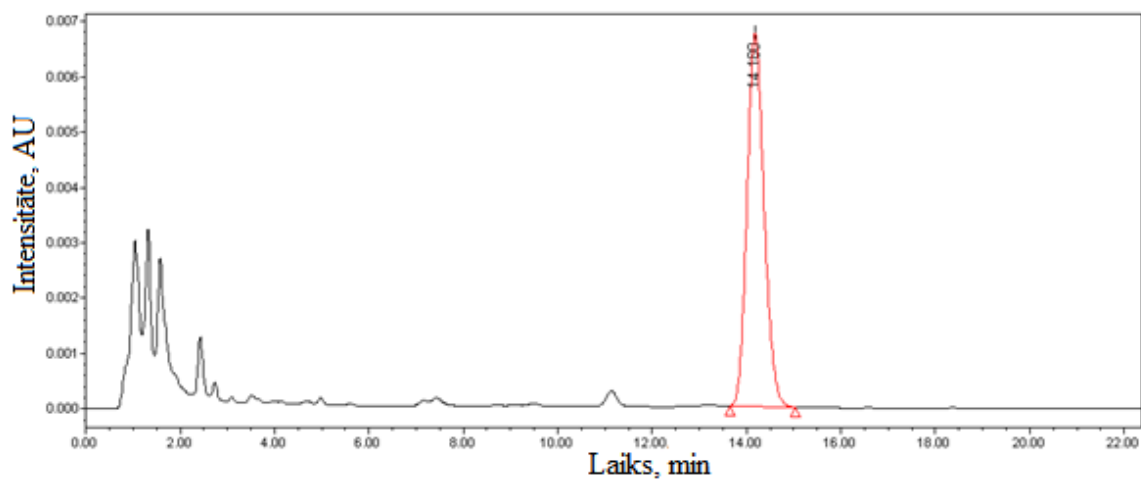
7. att. Analizējamā auzu pārslu (AV) parauga hromatogramma, signāla izdalīšanas laiks pie 15,05 min



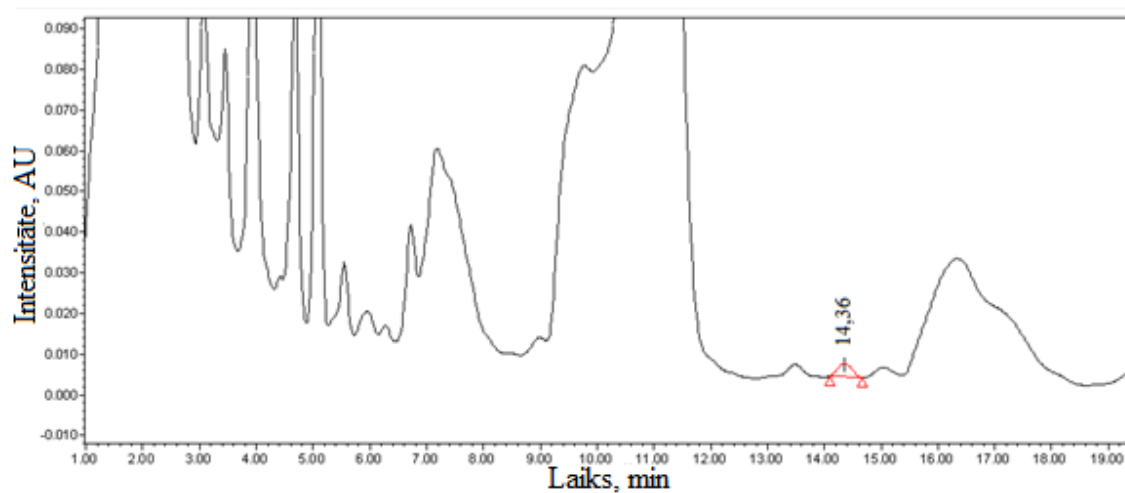
8. att. Analizējamo auzu pārslu AP (melns), AV (zils) spirta-ūdens ekstraktu paraugu un ursolskābes standartvielas (rozā) salīdzināšanas hromatogramma



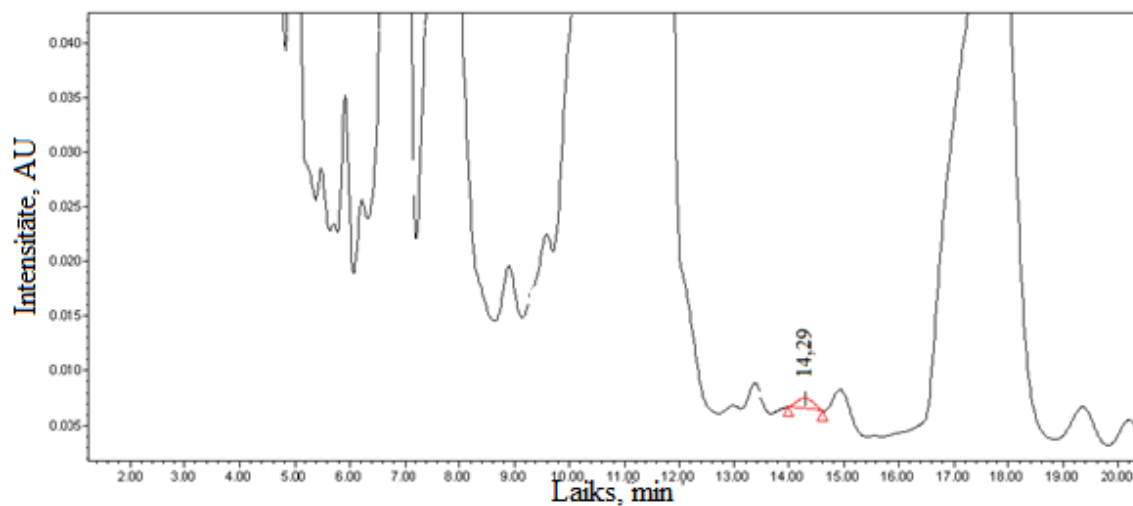
9. att. Ursolskābes standartvielas hromatogramma (25 ,0 µg/mL), signāla izdalīšanas laiks pie 14,37 min



10. att. Oleanolskābes standartvielas hromatogramma, signāla izdalīšanas laiks pie 14,18 min



11. att. Analizējamā auzu pārslu (AP) parauga hromatogramma, signāla izdalīšanas laiks pie 14,36 min



12. att. Analizējamā auzu pārslu (AV) parauga hromatogramma, signāla izdalīšanas laiks pie 14,29 min

Maģistra darbs „ Saponīnu satura izvērtējums graudaugos un to pārstrādes produktos”
izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē.

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

Autors: _____ Rūta Spruksta
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Dr. Ķīm., asoc. prof. Ida Jākobsone _____
(personiskais paraksts) (datums)

Recenzents: Dr. Ķīm. Dzintars Začs _____
(personiskais paraksts) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____ (datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: _____ Vija Gutāne
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

_____ protokols Nr. _____ (ieraksta sekretārs)
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre, lektore: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)