LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

Jevgenija Ponomarenko

LIELMOLEKULĀRO UN MAZMOLEKULĀRO LIGNĪNAM RADNIECĪGO AUGU POLIFENOLU STRUKTŪRAS UN ANTIOKSIDATĪVAS AKTIVITĀTES IZPĒTE, TO KOPSAKARĪBU RAKSTUROŠANA

Promocijas darbs

Zinātniskie vadītāji:
Dr. chem., prof. Arturs Vīksna
Dr. habil. chem. Tatjana Dižbite

Rīga, 2014

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Valsts Koksnes ķīmijas institūta Lignīna ķīmijas laboratorijā un Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē no 2009.gada līdz 2013.gadam ar iepriekš veiktām iestrādnēm. Darbs veikts ar Eiropas Sociālā fonda projekta ”Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē” Nr.2009/0138/ 1DP/1.1.2.1.2./09/IPIA/VIAA/004 finansiālu atbalstu.

Darba forma:
promocijas darbs ķīmijas zinātnes nozarē, analītiskās ķīmijas apakšnozarē

Darba zinātniskie vadītāji:
Dr. chem., prof. Arturs Vīksna (Latvijas Universitāte)
Dr. habil. chem., vādošā pētniece Tatjana Dižbite (LV Koksnes ķīmijas institūts)

Recenzenti:
Dr. habil. chem., prof. Māris Kļaviņš (Latvijas Universitāte)
Dr.sc.ing., vādošais pētnieks Aivars Žūriņš (LV Koksnes ķīmijas institūts)
Dr. chem. Marija Kuhtinska (Tallinas Tehniskā Universitāte)

Darba aizstāvēšana paredzēta Latvijas Universitātes Ķīmijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2014.gada 20. martā plkst. 17:00 Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē Kr.Valdemāra ielā 48.

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

SATURS

SAĪSINĀJUMI 6
KOPSAVILKUMS 8
1. LITERATŪRAS APSKATS 16
1.1. Fenola antioksidantu izmantošana un to nozīme 16
1.2. Fenola antioksidantu radikāļu dezaktivēšanas mehānismi 22
1.3. Antioksidatīvas aktivitātes pētīšanas metodes 25
1.4. Diarilheptanoīdi 32
1.4.1. Mizas diarilheptanoīdi 33
1.4.2. Diarilheptanoīdu antioksidatīva un bioloģiskā aktivitāte 36
1.5. Lignīns 38
1.5.1. Dabas lignīns 38
1.5.2. Tehniskie lignīni 41
1.5.3. Lignīna struktūras analīzes metodes 44
1.5.4. Lignīna antioksidatīva un bioloģiskā aktivitāte 46
1.6. Literatūras apskata kopsavilkums 49
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA 51
2.1. Pētījuma objekti 51
2.2.Aparatūra 52
2.3.Reaģenti 53
2.4. Diarilheptanoīdu izdalīšana no mizām 55
2.4.1. Etilacetāta ekstrakta iegūšana 55
2.4.2. Oregonīna izdalīšana no baltalkšņa mizas etilacetāta ekstrakta 56
2.4.3. Hidroksioregonīna iegūšana 57
2.4.4. Platifilozīda izdalīšana no bērza mizas etilacetāta ekstrakta 59
2.5. Tehnisko lignīnu izdalīšanas, attīrīšanas un frakcionēšanas metodes 59
2.5.1. Sārma lignīnu izdalīšana no melnalkšņa un oša koksnes 59
2.5.2. Lignīna izdalīšana no etanola ražošanas blakusproduktiem 60
2.5.3. Lignīnu saturošo blakusproduktu frakcionēšana ar organiskajiem šķīdinātājiem 60
2.6. Tehnisko lignīnu struktūras analīze 62
2.6.1. *FTIR* spektroskopija 62
2.6.2. Metoksilgrupu satura noteikšana 63

2.6.3. Hidroksilgrupu satura noteikšana 65
2.6.4. Analītiskā pirolīze - *Py-GC-MS-FID* 67
2.6.5. Elektronu paramagnētiskās rezonanses spektrometrija 68
2.6.6. Molekulmasas novērtēšana 69
2.6.7. Termiskā analīze 70
2.7. Antioksidatīvas aktivitātes raksturošanas analītiskās metodes 72
2.7.1. 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskābes ($ABTS^{\bullet+}$) radikāļu inhibēšanas metode 72
2.7.2. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikāļu ($DFPH^{\bullet}$) inhibēšanas metode 73
2.7.3. Hipoksantīns/ksantīnoksidāze sistēmā ģenerēto $O_2^{\bullet-}$ radikāļu inhibēšanas metode 75
2.7.4. Skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitātes metode 76
2.7.5. Lipīdu oksidēšanas inhibēšanas metode 77
2.7.6. Polimēru materiālu termooksidējošās destrukcijas inhibēšanas metode 78
2.7.7. Polifenolu ietekmes uz asins bioķīmiskajiem rādītājiem (in vitro) pētīšanas metodes 80
2.8. Hemometriskās analīzes metodes 80
2.9. Molekulārās modelēšanas metodes 81
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS 82
3.1. Antioksidatīvas aktivitātes noteikšanas metožu izvēle un pielāgošana pētāmajiem paraugiem 82
3.2. Diarilheptanoīdu struktūras - antioksidatīvas aktivitātes sakarības 83
3.2.1. Diarilheptanoīdu antioksidatīvas aktivitātes raksturošana, izmantojot eksperimentālās analītiskās ķīmijas metodes 84
3.2.2. Diarilheptanoīdu antioksidatīvas aktivitātes racionalizēšana, izmantojot molekulārās modelēšanas metodes 88
3.2.3. Diarilheptanoīdu antioksidatīva un biologiskā aktivitāte bioloģiskajās sistēmās 94
3.3. *Py-GC-MS-FID* metodes pielāgošana tehnisko lignīnu sastāva un dažādu struktūras īpašību raksturošanai 95
3.4. Tehnisko lignīnu struktūras īpašību un antioksidatīvas aktivitātes raksturošana 99
3.4.1. Sārma lignīni, *kraft*- lignīni un laboratorijā izdalītie lignīni 99
3.4.2. Pirolīzes lignīni 115
3.4.3. *LignoBoost kraft* lignīnu frakcijas 120
3.4.4. *Biolignīna*^{TM} frakcijas 132
3.5. Pētāmo lignīnu kopas *SAR* un *QSAR* noteikšana 137

SECINĀJUMI 145
LITERATŪRAS SARAKSTS 147
PIELIKUMI 169

SAĪSINĀJUMI

ABTS	2,2’-azinobis(3-etilbenzotiazolīn-6-sulfonskābes) diamonija sāls
AUC	laukums zem oksidēšanas kinētiskās līknes
BDE	saites disociācijas entalpija
BHA	butilēts hidroksianizols
BHT	butilēts hidroksitoluols
DAD	diožu matricas detektors
DFPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazils
DSK	diferenciālā skenēšanas kalorimetrija
EPR	elektronu paramagnētiskā rezonanse
ET - PT	elektronu pārnese - protonu pārnese
ETE	elektrona pārneses entalpija
FID	liesmas jonizācijas detektors
FPV	fenilpropāna vienība
FTIR	Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija
G-	gvajacilvienības (2-metoksifenola- tipa vienības)
GPC	gēlfiltrācijas hromatogrāfija
HAT	ūdeņraža atoma pārnese
H-	hidroksifenilvienības (fenola-tipa vienības)
HPLC	augsti efektīvā šķidruma hromatogrāfija
IP	jonizācijas potenciāls
KĶI	Koksnes ķīmijas institūts
KL	*kraft* lignīns
PMR	kodolmagnētiskā rezonanse
LDL	zema blīvuma lipoproteīni
LS	lignosulfonāts
MDA	malondialdehīds
M_n	vidējā skaitliskā molekulmasa
MS	masspektrometrija
M_w	masas vidējā molekulmasa
MWL	maltas koksnes lignīns
NET AUC	laukumu starpība zem oksidēšanas kinētiskajām līknēm
ORAC	skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitāte
PBS	fosfāta buferšķīdums

PC	galvenās komponentes (*principal components*)
PCET	protonu saistītā elektronu pārnese
PG	propilgalāts
PU	poliuretāni
Py-GC-MS	analītiskā pirolīze - gāzu hromatogrāfija – masspektometrija
PyL	pirolīzes lignīni
QSAR	kvantitatīvās struktūras – aktivitātes sakarības
RDI	radikāļu dezaktivēšanas indekss
RDK	radikāļu dezaktivēšanas kapacitāte
ROS	aktīvā skābekļa formas
SAR	struktūras aktivitātes sakarība
S-	siringilvienības (2,6-dimetoksifenola tipa vienības)
SL	sārma lignīni
SPLET	secīgā protona zaudēšanas elektronu pārnese
TBHQ	*tert*-butilhidrohinons
TE	troloksa ekvivalenti
TEAC	troloksa ekvivalentā antioksidatīva aktivitāte
TG	termogravimetrija
T_s	stiklošanās temperatūra
UV/VIS	ultraviolētā/redzamā gaisma
CCR	korelējošo komponentu regresija (*corelated components regression*)

KOPSAVILKUMS

Lielmolekulāro un mazmolekulāro lignīnam radniecīgo augu polifenolu struktūras un antioksidatīvas aktivitātes izpēte, to kopsakarību raksturošana. Ponomarenko J., zinātniskie vadītāji: *Dr. chem.* prof. A. Vīksna; *Dr. habil. chem.* T. Dižbite. Promocijas darbs, 187 lappuses, 74 attēli, 41 tabula, 264 literatūras avoti, 6 pielikumi. Latviešu valodā.

DABAS ANTIOKSIDANTI, DIARILHEPTANOĪDI, LIGNĪNS, SAKARĪBAS STARP AUGU POLIFENOLU STRUKTŪRU UN ANTIOKSIDATĪVO AKTIVITĀTI, ANTIOKSIDATĪVAS AKTIVITĀTES NOTEIKŠANAS METODES, HEMOMETRIJAS METODES

Darbā ir izstrādāta metodoloģija augu polifenolu antioksidatīvas aktivitātes novērtēšanai. Ir vispusīgi izpētīta, salīdzināta un savstarpēji izvērtēta radniecīgo mazmolekulāro un lielmolekulāro augu polifenolu antioksidatīva aktivitāte. Noskaidroti faktori, kas to ietekmē, reakciju mehānismi ar dažādiem brīvajiem radikāļiem, kā arī struktūras un antioksidantīvas aktivitātes sakarības. No Latvijā un citur Eiropā izplatīto lapkoku mizām ir izdalīti un izpētīti: 1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-heptān-3-on-5-O-β–D-ksilopiranozīds) (oregonīns), 1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-3-hidroksiheptān-5-O-β-D-ksilopiranozīds (hidroksioregonīns) un 1,7-bis-(4-hidroksifenil)-heptān-3-on-5-O-β-D-glikopiranozīds (platifilozīds). Salīdzināšanai ir izmantots kurkumīns. Apvienotie eksperimentālie (testi ar $DFPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$, $O_2^{\bullet-}$, $ROO^{\bullet}$ radikāļiem) un teorētiskie (kvantu ķīmijas aprēķini) pētījumi parādīja no mizas izdalīto diarilheptanoīdu augsto potenciālu antioksidantu lomā. Aprēķinātie termodinamiskie parametri ļāva noskaidrot diarilheptanoīdu struktūras un aktivitātes sakarības un darbības mehānismus. Ir izpētīti 50 tehnisko lignīnu paraugi, kas ir fitomasas ķīmiskās pārstrādes produkti vai blakusprodukti. Tie atšķiras gan pēc botāniskās izcelsmes (viengadīgi augi, skuju koki, lapkoki), gan pēc izdalīšanas metodes (sārma, *kraft*, *Bjorkmana* metodes, ātra pirolīze, hidrolīze). Izmantojot *Py-GC-MS-FID, FTIR, EPR, DSK, TG, UV/VIS* spektroskopijas, gēlfiltrācijas hromatogrāfijas un titrimetriskās metodes, ir noskaidrota lignīnu struktūra. Ir izpētīta lignīnu antioksidatīva aktivitāte testos ar $DFPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$, $O_2^{\bullet-}$, $ROO^{\bullet}$ radikāļiem, to antioksidatīva darbība eļļā, poliuretānu plēvēs un to ietekme uz cilvēku asins bioķīmiskajiem rādītājiem. Ir parādīts lignīnu kā antioksidantu augsts potenciāls un izstrādātas metodes, kas paplašina to izmantošanas iespējas. Lai racionalizētu lignīnu struktūras un antioksidatīvas aktivitātes kopsakarības, ir izmantotas korelācijas, parciālās korelācijas, daudzfaktoru regresijas analīzes, tai skaitā *CCR* – korelējošo komponentu regresija.

ABSTRACT

Investigation of the structure and antioxidant activity of high-molecular and low-molecular lignin related plant polyphenols and characterization of their structure-activity relationships. Ponomarenko J., supervisors: *Dr. chem.* prof. A. Viksna; *Dr. habil. chem.* T. Dizhbite. PhD thesis, 187 pages, 74 figures, 41 tables, 264 literature references, 6 appendices. In Latvian.

NATURAL ANTIOXIDANTS, DIARYLHEPTANOIDS, LIGNIN, STRUCTURE-ANTIOXIDANT ACTIVITY RELATIONSHIPS OF PLANT POLYPHENOLS, METHODS FOR THE DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY, CHEMOMETRICS

A methodology for the evaluation of the antioxidant activity of plant polyphenols was developed. The antioxidant activity of related monomer and polymer plant polyphenols was thoroughly investigated, compared and evaluated. The mechanisms of the reactions with different free radicals, as well as factors, which influence the antioxidant activity were found. 1,7- bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptan-3-one-5-O-D-xylopyranoside (oregonin); 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-hydroxyheptane-5-O-β-D-xylopyranoside (hydroxyoregonin) and 1,7-bis-(4-hydroxyphenyl)-heptane-3-one-5-O-β-D-glucopyranoside (platyphylloside) were isolated from the bark of deciduous trees, widely spread in Latvia and elsewhere in Europe. Curcumin was used as a reference antioxidant. The joined experimental (tests with $DFPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$, $O_2^{\bullet-}$, $ROO^{\bullet}$ radicals) and theoretical (quantum chemistry calculations) studies showed a high potential of bark diarylheptanoids as antioxidants. The calculated thermodynamic descriptors allowed establishing the structure-activity relationships and elucidating the mechanisms of antioxidant action. 50 lignin samples were obtained as by-products/products of the chemical processing of phytomass. They differ by botanical origin (annual plants, coniferous trees, deciduous trees) and by the isolation technique (delignification by alkali, *kraft* process, *Bjorkma*n method, fast pyrolysis, hydrolysis). The structure of lignins was characterized, using *Py-GC-MS-FID*, *FTIR*, *EPR*, *DSC*, *TG*, *UV/VIS* spectroscopy, *SEC*, titrimetric methods. The antioxidant activity of lignins in tests with $DFPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$, $O_2^{\bullet-}$, $ROO^{\bullet}$ radicals was characterized. The antioxidant action of lignins in oil, polymeric materials (polyurethane films), as well as their influence on blood's biomarkers *in vitro,* was studied. The high potential of lignins as antioxidants was shown, and methods, which alow broadening the application area of lignin products, were developed. To rationalize the structure and antioxidant activity properties of lignins, pair correlation, partial correlation and multivariate regression analyses were used, including correlated components regression.

IEVADS

Pētījuma aktualitāte

Daudzi materiāli, pārtikas produkti, cilvēku veselības aprūpes līdzekļi, kosmētika u.c. ir pakļauti oksidatīvai degradācijai. Gandrīz visiem oksidējošamies organiskajiem substrātiem ir nepieciešams pievienot antioksidantus, lai aizsargātu to īpašības un pagarinātu izmantošanas laiku. 2013. g. jūnijā antioksidantu tirgus sastādīja 1,5 miljardus (mlrd) USD. Tradicionālo sintētisko antioksidantu izmantošana ir ekoloģiski nedroša, kā arī var apdraudēt cilvēku veselību. Piemēram, antioksidanti var izskaloties no iepakojuma un nonākt pārtikas produktos. Strauji pieaug sabiedrības neapmierinātība ar sintētiskajiem pārtikas antioksidantiem, kuru drošība ir apšaubāma. Pateicoties daudz zemākai toksicitātei un biodegradējamībai, dabīgie antioksidanti varētu būt laba alternatīva sintētiskajiem. Interese par dabīgajiem antioksidantiem strauji pieaug veselības aprūpes jomā. Ir parādīts, ka vesela rinda nopietnu cilvēku slimību, tādu kā vēzis, ateroskleroze, sirds slimības, neirodeģeneratīvas slimības, kā arī Parkinsona slimība, Alcheimera slimība un priekšlaicīga novecošana ir saistītas ar organisma oksidatīvo stresu.

No 2010. līdz 2012. gadam raksti par dabas antioksidantiem bija visvairāk lasīto zinātnisko publikāciju topā dažādās ķīmijas nozarēs (pēc *ScienceDirect* datiem). Dabas metabolītu sintētiska transformācija ir viens no perspektīvākajiem mūsdienu medicīnas virzieniem. Visizplatītākie dabas antioksidanti ir polifenoli. Līdz šīm brīdim kā antioksidanti labi ir raksturoti flavanoīdi, lignāni, stilbēni, fenolskābes u.c. Diarilheptanoīdu un lignīnu sistēmatiskie pētījumi šajā aspektā ir veikti ievērojami retāk. Uzkrājoties informācijai par augu fenola savienojumu antioksidatīvo aktivitāti, rodas nepieciešamība izveidot datu bāzes, noskaidrot kvantitatīvās struktūras un antioksidatīvas aktivitātes sakarības (*QSAR*). Lignīna un vispār dabas polimēro polifenolu struktūras un aktivitātes sakarību noskaidrošanu apgrūtina to struktūras raksturošanas grūtības, kā arī neiespējamība izteikt antioksidatīvo aktivitāti uz savienojuma 1 molu.

Lignīns ir otrais izplatītākais fotosintezētais dabas polimērs pēc celulozes. Katru gadu celulozes ražošanas procesos no augu biomasas tiek izdalīti apmēram 50 - 100 miljoni tonnu tehnisko lignīnu. Degvielas etanola ražošana no lignocelulozes izejvielām, ko nosaka Eiropas Savienības direktīvas, palielinās lignīnu saturošo hidrolīzes blakusproduktu daudzumu. Pašlaik tehniskie lignīni tiek izmantoti galvenokārt kā kurināmais, kas ir neadekvāti to potenciālajai vērtībai, kuru nosaka šī polimēra polifenola daba. Pētot rūpniecisko

antioksidantu izmantošanas vēsturi, var novērot tendenci pāriet no mazmolekulārajiem uz lielmolekulārajiem antioksidantiem.

Latvijas meži un tajos esošie augu resursi ir viena no galvenajām valsts bagātībām. Pašlaik koku mizu kā mežizstrādes un kokapstrādes atliekas sadedzina, kaut gan tā var kļūt par izejvielu augstvērtīgu produktu iegūšanai. Augu evolūcijas rezultātā kā atbildes reakcija uz dažādiem, tai skaitā oksidatīvajiem stresiem, to mizā tiek uzkrāti bioloģiski aktīvi polifenoli. Starp mizas polifenoliem ir arī diarilheptanoīdi.

Lineārie diarilheptanoīdi un lignīns ir radniecīgi polifenoli. Tie satur ar aromātisko gredzenu savienotas alifātiskās ķēdes, tiem ir līdzīgas funkcionālās grupas. Gan izdalītie lignīni, gan diarilheptanoīdi bieži ir savienoti ar cukuru atlikumiem.

Darba mērķis

Promocijas **darba mērķis** ir diarilheptanoīdu, kas ir izdalīti no Latvijas lapkoku mizas, un lignīnu, kas ir dažādu lignocelulozes izejvielu pārstrādes procesu blakusprodukti, struktūras un antioksidatīvo īpašību sistemātiska un vispusīga izpētīšana, kas ļautu izveidot teorētisko pamatu šo augu polifenolu efektīvai izmantošanai par antioksidantiem dažādās jomās. Šī mērķa realizācija var palielināt Latvijas meža industrijas sektora ekonomisko potenciālu, radot no atkritumiem produktus ar augstu pievienoto vērtību.

Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

- ✓ Pašlaik neracionāli izmantojamie fitomasas mehāniskās un ķīmiskās parstrādes blakusprodukti ir perspektīvs efektīvu, videi draudzīgu, cilvēkiem drošu antioksidantu avots.
- ✓ Augu polifenolu antioksidatīvas aktivitātes noteikšanai ir jāizmanto vispusīga analītiska pieeja. Apvienojot analītiskās ķīmijas metodes (eksperimentālās un hemometrijas) ar molekulārās modelēšanas metodēm, var iegūt ievērojami vairāk informācijas par augu polifenolu darbības mehānismiem, kā arī struktūras un aktivitātes sakarībām.
- ✓ Neskatoties uz to, ka polimēriem antioksidantiem tiek pievērsta mazāka uzmanība, salīdzinot ar monomēriem, tiem ir liels potenciāls dažādās jomās. Radniecīgajiem monomēriem un polimērajiem polifenoliem ir līdzīgas struktūras un antioksidatīvas aktivitātes sakarības un darbības mehānismi.
- ✓ Izstrādājot piemērotu antioksidatīvas aktivitātes izteikšanas veidu un izvēloties to struktūras sarežģītībai, dažādībai un heterogenitātei adekvātu paraugu skaitu, ir iespējams

aprakstīt lignīnu kvalitatīvās (*SAR*) un kvantitatīvās (*QSAR*) struktūras un aktivitātes sakarības.

Darba uzdevumi

1. Pamatojoties uz KĶI iegūtajiem datiem par Latvijas lapkoku mizu ķīmisko sastāvu, izdalīt dažādas struktūras diarilheptanoīdus no baltalkšņa (*Alnus incana*) un bērza (*Betula pendula*) mizām.
2. Pielāgot un optimizēt dažādas analītiskās metodes, lai analizētu tehnisko lignīnu (fitomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu vai produktu) struktūras īpašības, kuras var ietekmēt antioksidatīvo aktivitāti.
3. Izstrādāt metodoloģiju mazmolekulāro un lielmolekulāro augu polifenolu antioksidatīvas aktivitātes noteikšanai, kā arī struktūras un aktivitātes sakarību noteikšanai.
4. Vispusīgi izpētīt mazmolekulāro diarilheptanoīdu un lielmolekulāro lignīnu antioksidatīvo aktivitāti. Savstarpēji salīdzināt un izvērtēt šos radniecīgos polifenolus. Atrast struktūras un aktivitātes sakarības un aprakstīt pētāmo polifenolu darbības mehānismus.
5. Izpētīt optimālākās frakcionēšanas metodes lignīnu antioksidatīvas aktivitātes regulēšanai.
6. Atlasīt perspektīvākos antioksidantus un pārbaudīt to efektivitāti, izmantojot dažādas ķīmiskās un bioloģiskās sistēmas, kā arī izvērtēt mazmolekulāro un lielmolekulāro polifenolu praktiskās izmantošanas iespējas.

Rezultātu praktiskā nozīmība

Pētījumu rezultāti deva iespēju piedāvāt produktus ar augstu pievienoto vērtību, kuri iegūti no mizas un dažādas izcelsmes lignīniem. Lignīni ir pieejami rūpnieciski nozīmīgos daudzumos kā lignocelulozes biomasas mehāniskās, ķīmiskās un biotehnoloģiskās pārstrādes atkritumi vai blakusprodukti. Šie pētījumi sniegs ieguldījumu Eiropas Savienības stratēģisko uzdevumu risinājumā, kas dotajā brīdī ir aktuāls arī Latvijas sabiedrībai – uz maksimālu atjaunojamo izejvielu izmantošanu orientētas ekonomikas radīšana („*Bioeconomy*”).

Lietišķajā aspektā – iegūtie rezultāti ļaus piedāvāt jaunus polimēru kompozītu stabilizatorus, pārtikas piedevas, bioloģiski aktīvus savienojumus higiēnai, nosakot mērķa produktu izmantošanas jomu, un uz mazmolekulāro (diarilheptanoīdi) un oligomēro/lielmolekulāro (lignīni) polifenolu bāzes radīt alternatīvu sintētiskajiem antioksidantiem. Darba gaitā iegūtie rezultāti ir izmantoti, izstrādājot pārtikas piedevu „Orvitals” (tiek ražots no 2012. gada, ražo SIA FIDE) un krēmu „Pēc sauļošanās” (tiek ražots

no 2011. gada, SIA FIDE). Iegūtie rezultāti par pētāmo polifenolu antioksidatīvo aktivitāti ir ieinteresējuši pārtikas produktu ražošanas uzņēmumu (EDPOL, Polija).

Pētījumu rezultāti par lignīnu antioksidatīvo darbību uz modeļu poliuretānu termooksidēšanos, parāda, ka uz to bāzes ir iespējams radīt efektīvus kompozītmateriālu stabilizatorus.

Pētījumu rezultāti ir izmantoti RSU Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedrā, lai iekļautu mācību programmā diarilheptanoīdu un lignīna bioķīmiskās izpētes darbus.

Iegūto rezultātu zinātniskā novitāte

- ✓ Ir izstrādāta metodoloģija augu mazmolekulāro un lielmolekulāro polifenolu antioksidatīvas aktivitātes vispusīgai raksturošanai, kura apvieno eksperimentālās analītiskās ķīmijas, hemometrijas un molekulārās modelēšanas metodes.
- ✓ Pierādīts, ka, izsakot lignīnu (kā arī dažādu polifenolu ekstraktu) antioksidatīvo aktivitāti testā ar stabilajiem brīvajiem radikāļiem kā dezaktivēto radikāļu skaitu uz 1 fenola hidroksilgrupu, struktūras un aktivitātes sakarības var aprakstīt vislabāk.
- ✓ Pirmo reizi ir vispusīgi raksturota Eiropas lapkoku mizas diarilheptanoīdu antioksidatīva aktivitāte un parādīta to potenciālā izmantošana dažādās jomās. Ir aprakstīti šo savienojumu darbības mehānismi reakcijās ar dažādiem brīviem radikāļiem - oksidētājiem. Molekulārās modelēšanas metodes diarilheptanoīdu struktūras un aktivitātes savstarpējās atkarības racionalizēšanai līdz šim nav izmantotas.
- ✓ Ir izstrādāta *Py-GC-MS-FID* rezultātu apstrādes metode, kas ļauj raksturot tādas lignīna struktūras īpašības kā: skābekli saturošas grupas fenilpropāna vienību sānķēdēs; CH_2-grupas fenilpropāna vienību sānķēžu α–stāvoklī; lignīna makromolekulas destrukcija fitomasas ķīmiskās pārstrādes gaitā.
- ✓ Izmantojot izstrādāto antioksidatīvas aktivitātes analīzes metodoloģiju, ir atklāts, ka visas lignīna modeļvielu antioksidatīvo aktivitāti ietekmējošās struktūras īpašības nosaka arī lielmolekulāro lignīnu antioksidatīvas īpašības, un parādītas kopīgas struktūras un antioksidatīvas aktivitātes sakarības radniecīgajiem dabas mazmolekulārajiem un lielmolekulārajiem polifenoliem, kā arī to līdzīgie darbības mehānismi. Pirmo reizi ir vispusīgi raksturota lignīnu antioksidatīva aktivitāte.
- ✓ Ir parādīts, ka hemometrijas metožu ieviešana lignīna analītiskajā ķīmijā var būtiski veicināt tās attīstību un lignīna racionālu izmantošanu. Izmantojot hemometrijas metodes, tai skaitā *CCR*-korelējošo komponentu daudzfaktoru regresijas analīzi (pirmo reizi), ir kvantitatīvi aprakstītas lignīna struktūras un antioksidatīvas aktivitātes sakarības.

✓ Darba izpildes gaitā pirmo reizi ir parādīts, ka, frakcionējot lignīnu ar organiskajiem šķīdinātājiem, var iegūt antioksidantu virkni, mainot to īpašības (T_s, polidispersitāte, molekulmasas sadalījums) un dažādu lignīna struktūras vienību proporcijas, tādā veidā regulējot to efektivitāti dažādas polaritātes sistēmās un materiālos, un rezultātā paplašinot iespējas lignīnu izmantošanai par antioksidantiem.

Pētījuma rezultātu aprobācija

Promocijas darba rezultāti ir apspriesti un atspoguļoti 13 zinātniskajās publikācijās, 13 starptautiskās zinātniskās konferencēs un 8 Latvijas mēroga konferencēs (6. pielikums). Ir iegūti 2 Latvijas Republikas patenti.

Iegūtajiem rezultātiem ir svarīgs ieguldījums šādu projektu realizācijā:

- LZP projekts 1054 „Videi draudzīgo funkcionālo produktu un hibrīdo materiālu dizains uz koksnes polifenolu bāzes" (2009. - 2012.g.)
- LZP projekts 564/2012 "Koksnes biomasas frakcionēšana, izmantojot jonu šķidrumus un izdalot vērtīgus polifenolu un celulozes produktus" (2013. - 2016.g.)
- VPP-5 projekta Nr. 2 „Jaunu produktu un inovatīvas meža apsaimniekošanas, meža koksnes un nekoksnes produktu ražošanas tehnoloģijas, racionāli izmantojot meža resursus un būtiski palielinot produkcijas pievienoto vērtību" 2.4. apakšprojekts „Maztonnāžas produkti ar augstu pievienoto vērtību no koksnes ar biorafinērijas tehnoloģijām, materiāli ar uzlabotām ilgizturības īpašībām" (2010. - 2013.g.)
- FP7-241566 "*Biocommodity refinery*" ("Produkti biorafinēšanai") (2010. - 2014.g.)

Pateicības

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā «*Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē*».

Promocijas darba autore izsaka dziļu pateicību zinātniskajiem vadītājiem – LV KĶI vadošai pētnieces *Dr. habil. chem.* Tatjanai Dižbitei un *Dr. chem.* profesoram Arturam Vīksnam par sniegtajām konsultācijām un padomiem, kas veicināja darba izstrādi.

Autore pateicas Limožas Universitātes prof. *Dr. phys.* Patrikam Trouillas par nenovērtējamu palīdzību kvantu ķīmijas aprēķinos, kā arī CALI (*CAlcul en LImousin*) par piedāvātajiem datorresursiem.

Autore pateicas visiem, kas palīdzējuši sasniegt darba rezultātus, īpaši LV KĶI vadošajai pētniecei Lignīna ķīmijas laboratorijas vadītājai prof., *Dr. habil. chem.* Gaļinai Teliševai, kā arī LV KĶI vadošajai pētniecei *Dr. habil. chem.* Gaļinai Dobelei, Johana von Thunena vārdā nosauktā Koksnes tehnoloģijas un koksnes bioloģijas institūta prof. Dr. *chem.* Dītriham Meieram, Kauņas Tehniskās Universitātes Ķīmiskās tehnoloģijas fakultātes prof. *Dr. chem.* Rimantam Venskutonim un RSU prof. *Dr. med.* Jeļenai Krasiļņikovai.

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

Īpaši sirsnīgi par atbalstu, pacietību un sapratni autore pateicas savam vīram, dēlam un vecākiem.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Fenola antioksidantu izmantošana un to nozīme

Daudzi rūpniecības produkti, piemēram, plastmasas, elastomēri, smērvielas, naftas produkti (benzīns, aviācijas degvielas un dzinēja eļļas), cepamās eļļas, kosmētika, kā arī pārtikas produkti, ir pakļauti degradācijai, ko izraisa oksidatīvie, mehāniskie, siltuma un gaismas stresi. Par degradācijas galveno iemeslu uzskata autokatalītisko procesu, kuru izraisa iepriekšminēto stresu iedarbībā radušies brīvie radikāļi. Piemēram, polimēru termooksidēšanās destrukcijas apstākļos, kad ir pietiekami daudz skābekļa, notiek saskaņā ar vienādojumiem (1.1.) - (1.5.) [1-3].

Iniciācija:

$$RH \xrightarrow{\Delta T} R^{\bullet} \qquad RR \xrightarrow{\Delta T} R^{\bullet} \tag{1.1.}$$

Ķēdes turpināšana:

$$R^{*} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet} \qquad ROO^{*} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet} \tag{1.2.}$$

Ķēdes sazarošana:

$$ROOH \rightarrow RO^{\bullet} + HO^{\bullet} \quad RO^{*} + RH \rightarrow ROH + R^{*} \quad HO^{\bullet} + RH \rightarrow H_2O + R^{\bullet} \tag{1.3.}$$

Ķēdes pārraušana:

$$RO^{*} \xrightarrow{\beta} R' = O + R'' \tag{1.4.}$$

Reakcijas pārtraukšana:

$$2\,ROO^{\bullet} \rightarrow R = O + O_2 + ROH \qquad RO^{\bullet} + RO^{\bullet} \rightarrow ROOR \tag{1.5.}$$

Lai novērstu šo procesu, gandrīz visiem oksidējošamies organiskajiem materiāliem tiek pievienoti antioksidanti, kas dezaktivē brīvos radikāļus, tādā veidā aizsargājot materiālu īpašības un pagarinot izmantošanas laiku [3, 6]. Piemēram, (1.6.) – (1.8.) vienādojumi parāda fenola antioksidantu reakcijas ar (1.1.) - (1.3.) reakcijās izveidojušamies skābekli saturošajiem radikāļiem:

$$ROO^{\bullet} + ArOH \rightarrow ROOH + ArO^{\bullet} \tag{1.6.}$$

$$RO^{\bullet} + ArOH \rightarrow ROH + ArO^{\bullet} \tag{1.7.}$$

$$HO^{\bullet} + ArOH \rightarrow H_2O + ArO^{\bullet} \tag{1.8.}$$

Reakcijas rezultātā izveidojušies $ArO^{\bullet}$ (fenoksilradikāļi) ir mazaktīvi vai tie savienojas ar brīvajiem radikāļiem, veidojot molekulārus produktus, piemēram, saskaņā ar vienādojumiem (1.9.) - (1.10.) [1, 2, 4].

$ArO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ArOOR$ (hinolīdie peroksīdi) (1.9.)

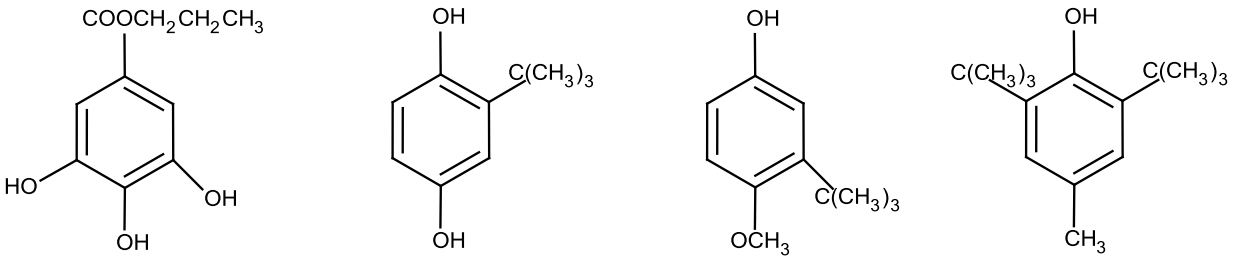
$ArO^{\bullet} + ArO^{\bullet} \rightarrow$ molekulārie produkti (1.10.)

Vēsturiski par antioksidantiem sauca vielas, kas kavēja nevēlamas reakcijas ar skābekli. Intensīvie pētījumi, kas tika veikti 19. gadsimta beigās un 20. gadsimta sākumā, paplašināja antioksidantu definīciju [5-6]. Saskaņā ar to antioksidants ir jebkura viela, kura mazos daudzumos salīdzinājumā ar oksidējamo substrātu ievērojami aizkavē vai novērš šī substrāta oksidēšanos [7].

Jau 20 gs. sākumā bija pazīstami vairāk nekā 500 dabīgo un sintētisko antioksidantu. Pašlaik pasaulē ir izveidojies dažādu antioksidantu tirgus, kurā fenola savienojumiem ir īpaši svarīga nozīme [1, 5-12].

Vairāk nekā 90% no pasaules antioksidantiem patērē Ziemeļamerika, Rietumeiropa un Āzijas Klusā okeāna reģions. 2011. gadā antioksidantu izmantošana pa nozarēm atšķīrās dažādos reģionos, bet kopumā tā sadalījās sekojoši: gumija (un latekss) - 53%; plastmasas - 36%; pārtika un barība - 8%; naftas degvielas - 3% [13]. Bija prognozēts, ka piecu gadu patēriņa pieauguma temps antioksidantiem (līdz 2016. g.) būs robežās no 2% līdz 4% gadā. Pašlaik (2013. g. jūnijs), antioksidantu tirgus sastāda 1,5 miljardi (mlrd) ASV dolāru [14].

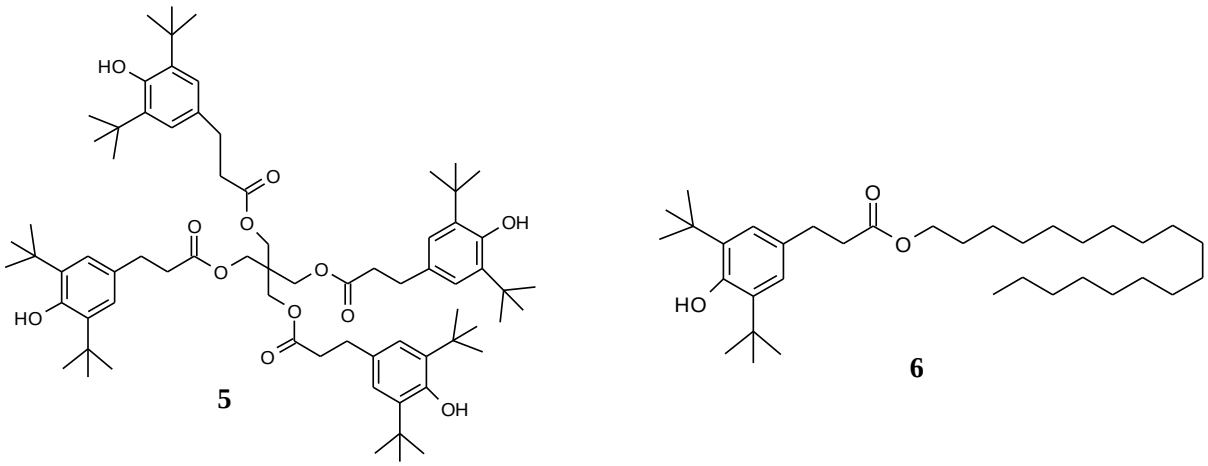
Starp plašāk izmantojamiem sintētiskajiem antioksidantiem ir aizvietotie fenoli: propilgalāts (*PG*) **(1)**, tert-butilhidrohinons (*TBHQ*) **(2)**, butilēts hidroksianizols (*BHA*) **(3)** un butilēts hidroksitoluols (*BHT*) **(4)** (1.1. att.). Tos jau vairāk nekā 50 gadus izmanto pārtikas rūpniecībā, lai novērstu vai aizkavētu tauku oksidēšanos eļļās, taukos un taukus saturošos pārtikas produktos. Tomēr šo sintētisko antioksidantu drošība ir apšaubāma, tāpēc to pievienošana pārtikai tiek stingri regulēta. Atļautās pieļaujamās koncentrācijas atšķiras dažādās valstīs. Piemēram, ASV *TBHQ* ir atļauts izmantot kā pārtikas piedevu, bet Eiropas Savienībā tas ir pilnīgi aizliegts [15]. Parasti sintētisko antioksidantu atļautās koncentrācijas eļļās un taukos ir 100 - 200 $\mu g \cdot g^{-1}$ (0,01 - 0,02%), un vispār antioksidantu saturs pārtikā nepārsniedz 0,5% [15-17]. 1.1. attēlā redzamos fenola antioksidantus izmanto arī kosmētikā, gumijās, adhezīvos, lubrikantos, hidrauliskajos šķidrumos, turbīnu un tehniskajās eļļās, degvielās.



1.1. att. **Plaši izmantojamo fenola antioksidantu *PG* (1), *TBHQ* (2), *BHA* (3), *BHT* (4) struktūrformulas**

Pētot rūpniecisko antioksidantu izmantošanas vēsturi, vērojama tendence pāriet no zemas molekulmasas antioksidantiem uz antioksidantiem ar lielāku molekulmasu, pat līdz polimēriem antioksidantiem [18].

Sintētiskie polimēru antioksidanti bieži ir polifenolu atvasinājumi ar garu alkilķēdi, kas uzlabo antioksidanta šķīdību polimērā, jo mazmolekulārie mobilie antioksidanti ar ierobežotu šķīdību polimērā noteiktos apstākļos var no tā atdalīties. Komerciālu polimērmateriālu antioksidantu piemēri ir *Irganox 1010* **(5)** un *Irganox 1076* **(6)** (1.2. att.) [19-20]. Tomēr literatūrā ir dati par *Irganox 1010* izskalošanos no polimēru matricas noteiktos apstākļos [21].



1.2. att. ***Irganox 1010*** **(IN1010) (5) un *Irganox 1076* (IN1076) (6) struktūrformulas**

Antioksidantu saturs polimēros parasti ir 0,5 - 1% pēc masas un nepārsniedz 2% [10, 18, 22-23].

Tradicionālo sintētisko antioksidantu izmantošana polimēros ir ekoloģiski nedroša. Tie var apdraudēt arī cilvēku veselību, piemēram, ja tie no pārtikas iepakojuma nonāk pārtikas produktos. Pateicoties daudz zemākai toksicitātei un biodegradējamībai, dabīgie antioksidanti varētu būt laba alternatīva sintētiskajiem [21-22].

Svarīgākie komerciāli izmantojamie dabīgie antioksidanti ir tokoferoli un askorbīnskābe, pēdējā laikā tiek izmantoti arī daži augu ekstrakti. Šo ekstraktu aktīvās vielas, galvenokārt, ir polifenolu savienojumi [2, 20, 24-26].

Interese par dabīgajiem antioksidantiem strauji pieaug arī veselības aprūpes jomā. Ir parādīts, ka vesela rinda nopietnu cilvēku slimību, tādu kā vēzis, ateroskleroze, sirds slimības, neirodeģeneratīvās slimības, kā arī Parkinsona un Alcheimera slimības un priekšlaicīga novecošana ir saistīti ar brīvo radikāļu-oksidētāju darbību [26-28].

Īpaši svarīgi cilvēku fizioloģijas ziņā ir $OH^{\bullet}$ (hidroksil-), $O_2^{\bullet}$ (superoksīd-) un $ROO^{\bullet}$ (peroksil-) radikāļi. Tos sauc arī par aktīvā skābekļa formām (vai *ROS – reactive oxygen spieces*) [29]. Brīvie radikāļi ir svarīgi dzīvo šūnu metabolisma starpprodukti [30]. Viens no pašu šūnu superoksīdradikāļa avotiem ir enzīms ksantīnoksidāze, kas ir plaši izplatīts dzīvajos organismos (no baktērijām līdz cilvēkam) un ir sastopams dažādos zīdītāju audos. Ksantīnoksidāze ir molibdēna - dzelzs - sēra flavīngrupas enzīmu pārstāvis un katalizē purīnu hidroksilēšanu. Organismā darbojas aizsargsistēma, kas dezaktivē brīvos radikāļus vai novērš to veidošanos. Tā sastāv no specifiskiem enzīmiem, metālu helatoriem un nespecifiskiem antioksidantiem [31-32]. Piemēram, enzimātiskais antioksidants superoksīddismutāze pārvērš skābekļa anjonradikāļus ūdeņraža peroksīdā, katalāze un glutationperoksidāze reducē ūdeņraža peroksīdu par ūdeni un skābekli un tādā veidā novērš radikāļu veidošanos. Metālu helatori saista pārejas metālu jonus un tādā veidā novērš reakcijas, kurās veidojas reaktīvie oksidanti. Piemēram, dzelzs jonu saistīšana novērš hidroksilradikāļu ($OH^{\bullet}$) veidošanos sekojošā reakcijā [33-37].

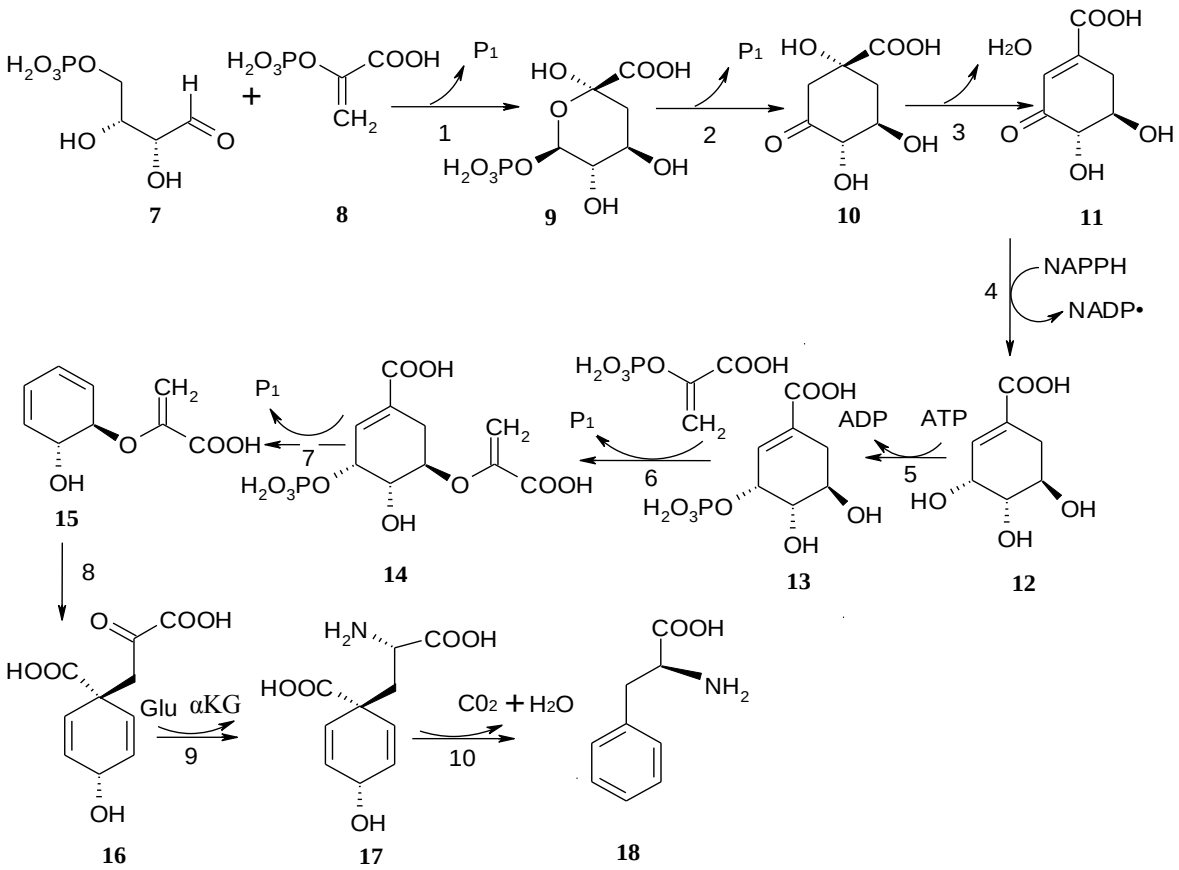
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-} \qquad (1.11.)$$

Ja oksidēšanas reakcijas sākas, neskatoties uz enzīmu un metālu helatoru darbību, sāk darboties nespecifiskie brīvo radikāļu saistīšanas antioksidanti, kurus bieži sauc vienkārši par antioksidantiem. Tie ietver sevī vitamīnu C, vitamīnu E, karotenoīdus, tiola grupu saturošus savienojumus, amīnogrupu saturošus savienojumus, kā arī daudzus dažādus fenola antioksidantus [31, 34].

Nelabvēlīgos apstākļos, tādos kā atmosfēras, augsnes un ūdenstilpņu piesārņojums, tehnogēno elektromagnētisko lauku pārmērība, radiācija, nesabalansēts uzturs, slikta pārtikas kvalitāte, ievērojami pastiprinās oksidēšanās reakcijas organismā, un endogēno (iekšējo)

antioksidantu aizsargsistēma nespēj novērst brīvo radikāļu veidošanos bīstami lielās koncentrācijās. Viens no veidiem, kā samazināt ar brīvajiem radikāļiem izraisītu slimību risku, ir eksogēno (ārējo) aģentu - antioksidantu izmantošana [35-40].

Fenola savienojumi ir pirmās no augu ekstraktiem izdalītās bioloģiski aktīvās vielas [38]. Šīs vielas satur vismaz vienu aromātisku gredzenu, kas ir saistīts ar vienu vai vairākām hidroksilgrupām un citiem aizvietotājiem. Savienojumus ar vairākām fenola hidroksilgrupām sauc par polifenoliem. Augu fenolu benzola gredzens ir veidojies saskaņā ar 1.3. attēlā parādīto shēmu.



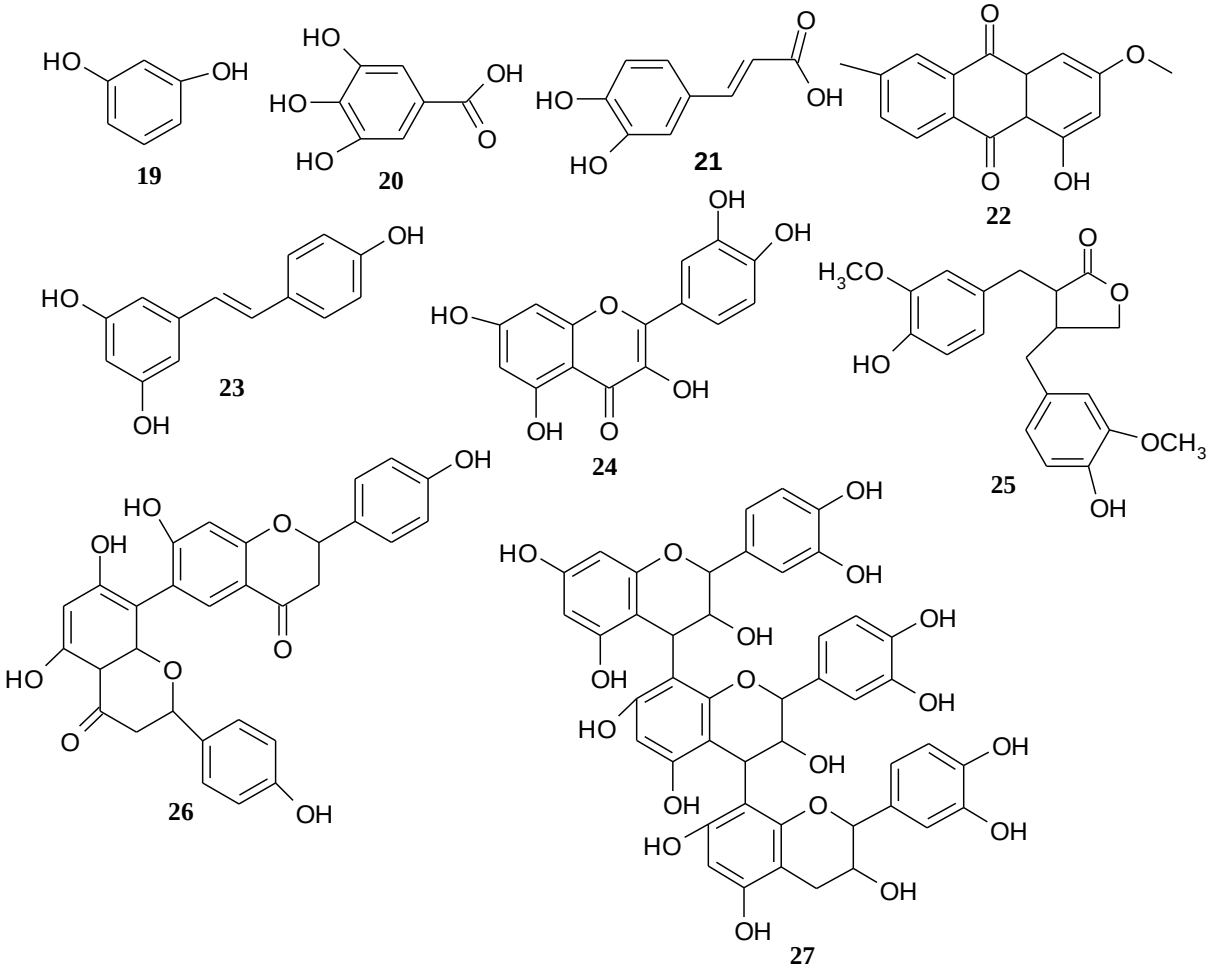
1.3. att. **Fenilalanīna (18) biosintēzes reakciju shēma**

7 - eritrozes 4-fosfāts; **8** - fosfoenolpiruvāts; **9** - 3-deoksi-D-arabino heptulosonāta 7-fosfāts; **10** - 3-dehidrohināts; **11** – 3-dehidrošikimāts; **12** – šikimāts; **13** - šikimāta-3-fosfāts; **14** - 5-enolpiruvilšikimāta-3-fosfāts; **15** - horizmāts; **16** - prefenāts; **17** - arogenāts; **18**- fenilalanīns

Aromātiskā gredzena biosintēzes izejvielas ir fosfoenolpiruvāts **(8)**, kas veidojas glikozes glikolītiskās sadalīšanās procesā, un eritrozo-4-fosfāts **(7)**, kas ir glikozes oksidēšanas starpprodukts. Benzola gredzena biosintēzes galvenais starpprodukts ir šikimskābe **(12)** (1.3. att.). Parādīto reakciju secību rezultātā izveidotais L-fenilalanīns **(18)** ir visu augu fenolu tālākās biosintēzes izejas savienojums [38, 40]. **(9) - (18)** produktu

veidošanā piedalās enzīmi: 3-deoksi-D-arabino-heptulosonāta-7-fosfāta sintetāze; 3-dehidrohināta sintetāze; 3-dehidrohināta dehidratāze; šikimāta-NADP oksireduktāze; šikimāta kināze; 5-enolpiruvilšikimāta-3-fosfāta sintetāze; horizmāta sintetāze; horizmāta mutāze; prefenāta aminotransferāze; arogenāta dehidratāze. Pēc L-fenilalanīna **(18)** sintēzes sākas specifiskās otrējās pārvērtības, kuru rezultātā veidojas dažādi fenola savienojumi [40-41]. Ir tikai ļoti neliels skaits augu fenolu, kuru aromātiskais gredzens neveidojas reakcijās ar šikimātu **(12)** kā galveno starpproduktu [40].

Galvenās augu fenolu klases ir: C_6, vienkārši fenoli (piemēram, rezorcinols **(19)**); C_6-C_1, fenolskābes (piemēram, galluskābe **(20)**); C_6-C_2, acetofenoni un fenilacetoskābes; C_6-C_3, hidroksikanēļskābes (piemēram, kafijas skābe **(21)**); C_6-C_4, hidroksiantrahinoni (piemēram fizcions **(22)**); C_6-C_1-C_6, ksantoni, C_6-C_2-C_6, stilbēni (piemēram rezveratrols **(23)**); C_6-C_3-C_6, flavanoīdi (piemēram, kvercetīns **(24)**); C_6-C_7-C_6, diarilheptanoīdi; $(C_6$-$C_1)_2$, hidrolizējamie tanīni; $(C_6$-$C_3)_2$, lignāni (piemēram, matairezinols **(25)**); $(C_6$-C_3-$C_6)_2$, biflavanoīdi (piemēram, **(26)**); $(C_6$-$C_3)_n$, lignīns; $(C_6$-C_3-$C_6)_n$, kondensētie tanīni (procianidīni) **(27)** (1.4. att.) [38,42].



1.4. att. **Galveno augu fenolu klašu pārstāvji**

19 – rezorcinols**; 20** – galluskābe**; 21** – kafijas skābe; **22** – fizcions; **23** – rezveratrols; **24** – kvercetīns; **25** – matairezinols; **26** – agatisflavons; **27** – procianidīni

Fenola savienojumi veic dažādas auga aizsargfunkcijas, tajā skaitā: brīvo radikāļu dezaktivēšanu, metāla jonu helatēšanu, biocīdās funkcijas, aizsardzību no zālēdājiem, padarot augu tiem nepatīkamu pēc garšas. Lielākā daļa augu nepārtraukti sintezē fenola savienojumus, taču to uzkrāšanās var tikt inducēta ar biotiskajiem un abiotiskajiem stresiem, tādiem kā UV starojums, zemas temperatūras, barības vielu nepietiekamība, vēji, patogēnu uzbrukums [38, 40-45].

Pēdējos gados aktīvi tiek rekomendēta augļu un dārzeņu regulāra lietošana uzturā, jo polifenoliem, kuri ietilpst to sastāvā, ir svarīga loma ilgtermiņa veselībā un dažādu saslimšanu riska samazināšanā. Pateicoties polifenolu antioksidatīvajai, kā arī bioloģiskajai aktivitātei, piemēram, antibakteriālai, antiseptiskai, pretiekaisuma, polifenolus saturošus augus kopš seniem laikiem izmanto tautas medicīnā. Neskatoties uz taukiem bagātu diētu, Francijā novēro zemu aterosklerozes un koronārās sirds slimības līmeni. Šo „Francijas paradoksu" izskaidro ar sarkanā vīna sastāvā ietilpstošo polifenolu spēju inhibēt zema blīvuma lipoproteīna (LDL *low - density lipoprotein*) oksidēšanos [46 - 49].

Veiksmīgo dabas antioksidantu izmantošanu nosaka to struktūras-aktivitātes sakarību un darbības mehānismu noskaidrošana.

1.2. Fenola antioksidantu radikāļu dezaktivēšanas mehānismi

Antioksidantu darbības pamatā, galvenokārt, ir to spēja dezaktivēt brīvos radikāļus [50].

Ir pierādīts, ka fenola antioksidanti dezaktivē brīvos radikāļus, pateicoties H-atoma pārnesei no antioksidanta (ArO-**H**) aktīvas -OH grupas (grupām) uz brīvo radikāli ($R^{\bullet}$) [51-53]. Piemēram, aizvietojot eigenola (2-metoksi-4-(prop-2-ols)-fenols) un gvajakola (2-metoksifenols) ūdeņraža atomu pie fenola hidroksilgrupas ar metilgrupu, to spēja dezaktivēt radikāļus pazūd [53-55].

H-atoma pārneses procesam atbilst četri iespējamie mehānismi:

1) Ar protonu saistīta elektrona pārneses (*Proton Coupled Electron Transfer – PCET*) mehānisma pamatā ir sekojoša reakcija:

$$ArO\text{-}\mathbf{H} + R^{\bullet} \rightarrow ArO^{\bullet} + R\text{-}\mathbf{H} \qquad (1.12.)$$

$R^{\bullet}$ var būt jebkurš radikālis, kas iekļauts oksidēšanas ķēdēs, ieskaitot $ROO^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$, $O_2^{\bullet-}$.

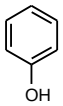
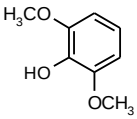
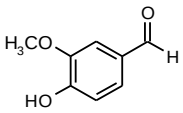
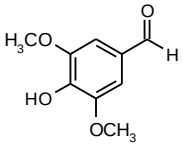
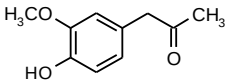
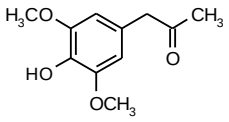
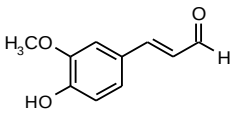
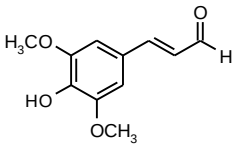
Tas ir atomārais process, kurā ūdeņraža atoms tiek pārnests oksidatīvajā sistēmā. Šī mehānisma norise ir atkarīga no fenola O-H saites disociācijas entalpijas (*BDE*):

$$BDE = H°_{298K}(ArO^{\bullet}) + H°_{298K}(H^{\bullet}) - H°_{298K}(ArOH) \quad (1.13.)$$

Jo zemāka ir *BDE*, jo vieglāka ir O-H saites homolītiskā disociācija un lielāka tās loma antioksidatīvajā reaģētspējā. *BDE* vērtību nosaka fenola savienojuma struktūra un fenola hidroksilgrupas izvietojums. Piemēram, aprēķinu rezultāti parāda, ka *o*-metoksilgrupas pazemina *BDE* (1.1. tabula) [56]. Tas sakrīt ar eksperimentu datiem par *o*-metoksilgrupu pozitīvo ietekmi uz fenolu antioksidatīvo aktivitāti (1.2. tabula) [54-57]. *BDE* vērtības atšķiras dažādām fenola hidroksilgrupām savienojuma sastāvā.

1.1. tabula

Dažādu fenolu O-H saites disociācijas ($ArOH \rightarrow ArO^{\bullet} + H^{\bullet}$) enerģijas (*BDE*)

Fenola nosaukumi	**Struktūrformula**	***BDE*, kcal·mol^{-1}**
Fenols		83,9
2,6-dimetoksifenols (siringols)		75,4
4-hidroksi-3-metoksibenzaldehīds (vanilīns)		83,0
4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehīds (siringilaldehīds)		76,8
1-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-propan-2-ons (gvajacilacetons)		80,5
1-(4'-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)-2- propanons (siringilacetons)		75,5
3-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-prop-2-ēnāls (koniferilaldehīds)		79,2
1-(4'-hidroksi-3',5'-dimetoksifenil)- prop-2-ēnāls (sinapilaldehīds)		75,5

2) Elektrona pārneses – protona pārneses (*ET-PT*) mehānisma pamatā ir sekojošas reakcijas:

$$R^{\bullet} + ArOH \rightarrow R^{-} + ArOH^{+\bullet} \rightarrow RH + ArO^{\bullet} \quad (1.14.)$$

Reakcijas (1.14.) pirmajā solī veidojas katjonradikāls $ArOH^{+\bullet}$, kas heterolītiski disociē. Rezultātā veidojas tādi paši produkti kā *PCET* mehānismā ($ArO^{\bullet}$ un RH).
Šī mehānisma norise ir atkarīga no jonizācijas potenciāla (*IP*):

$$IP = H°_{298K}(ArOH^{+\bullet}) - H°_{298K}(ArOH) \quad (1.15.)$$

$ArOH^{+\bullet}$ O-H saites heterolītiskā disociācija ir stipri eksotermiska fenola savienojumiem. Parasti $ArOH^{+\bullet}$ ir ļoti nestabils, tāpēc *ET-PT* mehānisma ieguldījums ir maznozīmīgs.

3) Secīgas protona zaudēšanas elektrona pārneses mehānisma (*SPLET*) pamatā ir sekojošas reakcijas:

$$ArOH \rightarrow ArO^{-} + H^{+}; ArO^{-} + R^{\bullet} \rightarrow ArO^{\bullet} + R^{-}; R^{-} + H^{+} \rightarrow RH \quad (1.16.)$$

Šajā mehānismā polifenols pirmajā solī tiek deprotonēts un tādā veidā aktivēts, lai vieglāk pārnestu elektronu, fenoksilradikāls veidojas no ArO^{-} anjona. Šo procesu norise ir atkarīga no pH un dažādu polifenolu OH grupu spējas deprotonēties. Šī mehānisma ieguldījums stipri palielinās sārmainā vidē, kurā tiek atvieglots pirmais solis - deprotonēšana.
Mehānisma norise ir atkarīga no elektrona pārneses entalpijas (*ETE*):

$$ETE = H°_{298K}(ArO^{\bullet}) - H°_{298K}(ArO^{-}) \quad (1.17.)$$

Saskaņā ar kinētikas pētījumu datiem *SPLET* mehānisms ir ātrāks nekā *PCET* [51-53]. Šajā mehānismā veidojas tie paši produkti kā *PCET* un *ET-PT* mehānismos ($ArO^{\bullet}$ un RH).

4) Aduktu veidošanās mehānisma pamatā ir reakcija:

$$ArO\text{-}H + R^{\bullet} \rightarrow [ArOH\text{-}R]^{\bullet} \rightarrow \text{metabolīti vai } ArO^{\bullet} + RH \quad (1.18.)$$

Šis mehānisms realizējas reti. Dažreiz tas ir sastopams reakcijās ar $OH^{\bullet}$ brīvajiem radikāļiem (un ūdens klātbūtnē var veidoties tie paši produkti, kas pārējos mehānismos: $ArO^{\bullet}$ un RH).

PCET, ET-PT un *SPLET* mehānismos veidojas vieni un tie paši reakcijas produkti ($ArO^{\bullet}$ un RH) un ir vienāda termodinamiska reaģentu un produktu bilance: $\Delta G^{PCET} = \Delta G^{ET\text{-}PT} = \Delta G^{SPLET}$. Šo procesu norisi labi raksturo O-H saites disociācijas entalpija, un O-**H** *BDE* ir atzīts par galveno termodinamisko deskriptoru, kas palīdz racionalizēt antioksidantīvo aktivitāti [51], bet *IP* un *ETE* ir svarīgi antioksidatīvas aktivitātes otrējie deskriptori.

Dažādi reakcijas mehānismi konkurē savā starpā, un noteiktā mehānisma norise ir atkarīga no antioksidanta struktūras, brīvā radikāļa - oksidētāja, reakcijas vides (galvenokārt, šķīdinātāja polaritātes un pH) [58].

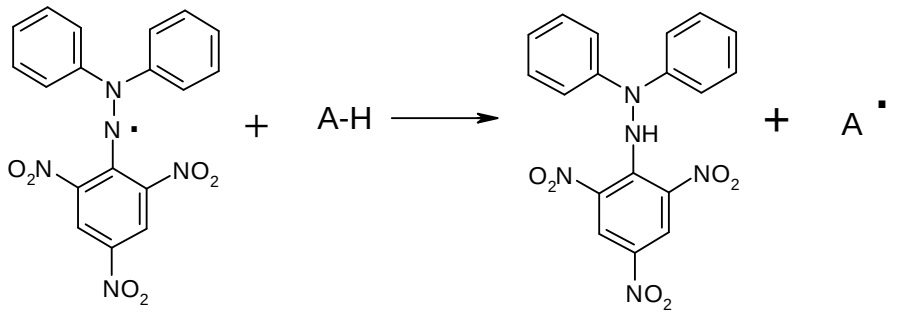
1.3. Antioksidatīvas aktivitātes pētīšanas metodes

Lai iegūtu vispusīgu informāciju par savienojuma antioksidatīvajām īpašībām, ir jāizmanto vairāku metožu kombinācijas. Izvēloties kādu no metodēm, ir jāņem vērā nepieciešamība raksturot gan termodinamiskus, gan kinētiskus ar antioksidatīvu aktivitāti saistītus faktorus, ka arī metodes pieejamība, laba reproducējamība, izmantošanas iespējas hidrofīliem un lipofīliem antioksidantiem, detektēšanas iespējas, traucējošo faktoru ietekme [59-64]. Ir jāpievērš uzmanība arī prooksidantajam efektam. Eksperimentālo analītiskās ķīmijas metožu kombinācija ar molekularās modelēšanas metodēm ir ļoti perspektīvs paņemiens, kas ļauj iegūt vērtīgu informāciju par antioksidantu darbības mehānismiem, noskaidrot to struktūras-aktivitātes sakarības.

Eksperementālās metodes balstās uz diviem dažādiem principiem. Reducēšanas metožu („*reduction assay*") principa pamatā ir shēma (1.19.):

Antioksidants → Indikators → Reducēts indikators (1.19.)

Visbiežāk izmanto fotometrisko detektēšanu, kur reducēta indikatora krāsas izmaiņa (gaismas absorbcijas palielināšanas vai samazināšanas pie noteikta viļņa garuma) korelē ar antioksidanta koncentrāciju paraugā [32, 62, 65]. Šīs metodes ir piemērotas antioksidatīvo aktivitāti noteicošo termodinamosko faktoru noskaidrošanai. Kā parādīts iepriekš, antioksidantu spējai dezaktivēt brīvos radikāļus ir liela nozīme dažādās jomās, tāpēc par antioksidantu īpašību indikatoriem parasti tiek izmantoti stabilie brīvie radikāļi. Visplašāk tiek izmantots 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikālis (DFPH$^{\bullet}$). Tas ir pieejams, viegli uzglabājams, labi šķīst dažādos organiskajos šķīdinātājos [58, 63, 65]. Nesapārota elektrona delokalizācija pa visu molekulu nodrošina šī radikāļa stabilitāti un intensīvi violeto krāsu. Kad DFPH$^{\bullet}$ saturošo šķīdumu sajauc ar substrātu, kas var atdot ūdeņraža atomu (AH), veidojas reducēta radikāļa bezkrāsainā forma (DFPH-H) (1.5. att.). Šī ir viena no vienkāršākajām metodēm relatīvās antioksidatīvas reaģētspējas un radikāļu dezaktivēšanas reakcijas stehiometriskā skaitļa noteikšanai [35]. Metodes galvenie trūkumi: fenola savienojumi vai to oksidēšanas produkti var absorbēt gaismu pie 517 nm; var rasties sfēriski traucējumi molekulām ar lielu molekulmasu; DFPH$^{\bullet}$ radikālis neeksistē *in vivo* [59].

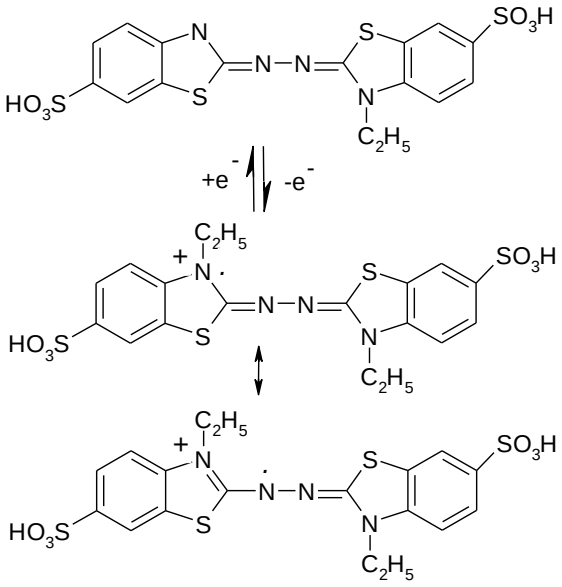


DFPH$^{\bullet}$
(Violets, max 517 nm)

DFPH-H
(iedzeltens)

1.5. att. **DFPH struktūra pirms un pēc reakcijas ar antioksidantu (AH)**

Citi plaši izmantojamie radikāļi ir 2,2'-azinobis(3-etilbenztiazolin-6-sulfonskābes) katjonradikāļi, ABTS$^{\bullet+}$ (1.16. att.).



ABTS
bezkrāsains

ABTS$^{+\bullet}$
zilganzaļš, max 734 nm

1.6. att. **ABTS un ABTS$^{\bullet+}$ katjonradikāļu struktūras**

Tie ir stabili un šķīstoši dažādos organiskajos šķīdinātajos un ūdenī. Atšķirībā no DFPH$^{\bullet}$, kas ir komerciāli pieejams, ABTS$^{\bullet+}$ katjonradikāļus pirms reakcijas ar antioksidantu ir nepieciešams ģenerēt no 2,2'-azinobis(3-etilbenztiazolin-6-sulfonskābes) (1.6. att.). Šim mērķim izmanto dažādus oksidētājus, piemēram, $K_2S_2O_8$ [32, 35]. Reakcijas rezultātā veidojas ABTS reducētā forma (1.6. att.) vai ABTS degradācijas produkti un notiek atkrāsošanās [67-68]. ABTS$^{\bullet+}$ radikālis neeksistē *in vivo* [59, 63, 69].

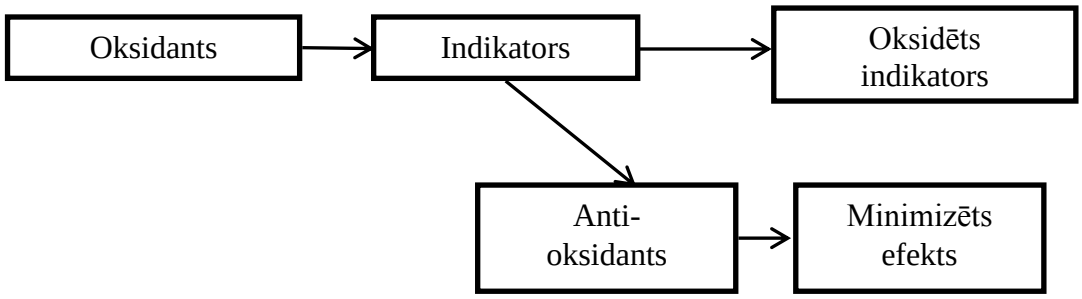
Kā indikatorus izmanto arī metālu krāsainos kompleksus. 1.2. tabulā ir apkopoti plašāk izmantoto metožu nosaukumi un principi.

1.2. tabula

Reducēšanas metožu ar metālu kompleksu indikatoriem nosaukumi un principi

Metodes nosaukums	**Reakcijas vienādojums**	**Analītiskais signāls**
FRAP [70-75]	$Fe(TPTZ)_2^{3+}$ + ArOH → $Fe(TPTZ)_2^{2+}$ (zils) + $ArO^{\bullet}$ + H^+ TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazina ligands	intensīvi zilas krāsas veidošanās λ_{max}=593 nm
CUPRAC [71-74]	n $Cu(Nc)_2^{2+}$ + $Ar(OH)_n$ → n $Cu(Nc)_2^{+}$ (oranžs)+ $Ar(=O)_n$ (hinons) + n H^+ $Cu(Nc)_2^{x+}$- bis(neocuproins) vara helāts	dzelteni-oranžas krāsas veidošanās λ_{max}=593 nm
Folin [71-75]	Mo(VI) (dzeltens) + e^- (no AH) → Mo(V) (zils) Mo(VI) ir $3H_2O \cdot P_2O_5 \cdot 13WO_3 \cdot 5MoO_3 \cdot 10H_2O$ krāsaina savienojuma aktīvais centrs	dzeltenas krāsas atkrāsošanā λ_{max}=765 nm

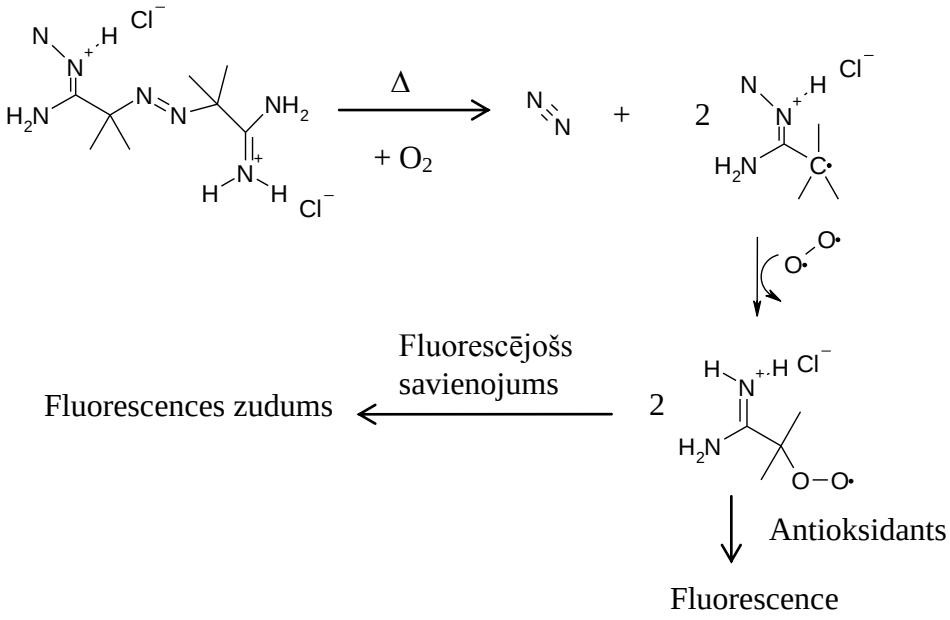
Konkurences metožu principa pamatā ir 1.7. attēlā parādītā shēma. Šīs metodes ļauj ņemt vērā kinētiskos faktorus antioksidatīvas aktivitātes raksturošanā. Oksidētājs reaģē ar indikatoru, izraisot izmaiņas tā *UV/VIS* absorbcijā, fluorescencē, luminiscencē vai citā mērāmajā īpašībā. Antioksidants sacenšas ar indikatoru par reakciju ar oksidētāju un tādā veidā novērš indikatora oksidēšanos un signāla izmaiņas. Kā oksidētāju izmanto dažādus radikāļus [32, 63].



1.7. att. **Konkurences metožu princips**

Skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitātes – *ORAC* (*oxygen radical absorbance capacity)* metode ir visplašāk izmantojamā konkurences metode. Antioksidants un

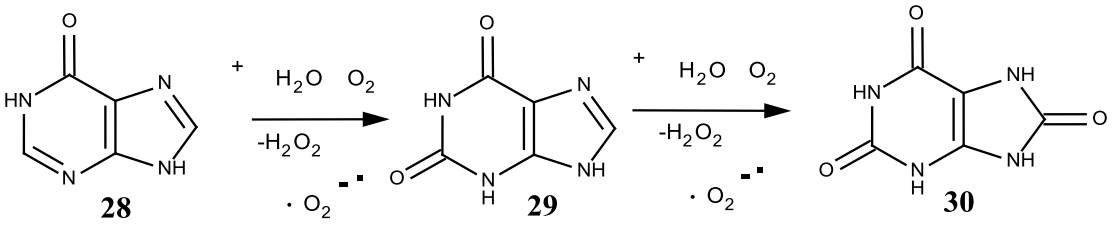
substrāts – fluorescējošais savienojums kinētiski konkurē par skābekļa aktīvajām formām - peroksilradikāļiem, kuri tiek ģenerēti, termiski sadalot azosavienojumus, piemēram, AAPH (2,2'-azobis-2-metil-propānimidamīda dihidrohlorīds). Šajā metodē antioksidatīvo aktivitāti novērtē, mērot fluorescences intensitāti un tās izmaiņas atkarībā no reakcijas laika. Skābekļa radikāļu iedarbības rezultātā notiek fluorescējošā savienojuma degradācija, un fluorescence samazinās. Savienojumu klātbūtnē, kas spēj saistīt skābekļa radikāļus, fluorescences laiks palielinās (1.8. att.). Sākotnēji kā fluorescējošo savienojumu izmantoja β-fikoerotrīnu, vēlāk fluoresceīnu [75-77].



1.8. att. ***ORAC*** **metodes princips**

ORAC metodē antioksidants mijiedarbojas ar peroksilradikāļiem pēc ar protonu saistīta elektrona pārneses (*PCET*) mehānisma (1.12.), uzrādot klasisko ķēdes oksidēšanās reakciju pārraujošo aktivitāti [63, 77]. Metodes galvenās priekšrocības: tā ir standartizēta, kas ļauj salīdzināt dažādu laboratoriju rezultātus; kombinē mērījumus par antioksidantu ietekmi uz substrāta oksidēšanas kinētiku un intensitāti; ģenerētie radikāļi eksistē *in vivo*. Metodes trūkumi: nepieciešama dārga aparatūra, pH-jutīga, tādā veidā radikāļi *in vivo* netiek ģenerēti [75, 77-79].

Citā konkurences metodē antioksidantīvas aktivitātes novērtēšanai tiek izmantoti sistēmā hipoksantīns/ksantinoksidāze ģenerēti skābekļa anjonradikāļi ($O_2^{\bullet-}$) (1.9. att.).



1.9. att. **Ksantīnoksidāzes katalizēta hipoksantīna pārvēršanās par urīnskābi**

28 – hipoksantīns**, 29** – ksantīns, **30 -** urīnskābe

Radikāļu saturs tiek noteikts fotometriski ar *NBT* (nitrozilā tetrazolija sāls) indikatora palīdzību, kura rekcijā ar skābekļa anjonradikāļiem veidojas krāsains savienojums ar absorbcijas maksimumu pie 560 nm (1.20.):

$$4O_2^{\bullet -} + \text{NBT} \rightarrow \text{diformazāns} + 4\ O_2 \qquad (1.20.)$$

zilgani-violets

Antioksidants dezaktivē daļu brīvo $O_2^{\bullet -}$, tā rezultātā mazāk radikāļu reaģē ar indikatoru, veidojas mazāk diformazāna un absorbcija samazinās. Metodes priekšrocība: brīvie radikāļi, to ģenerēšanas mehānisms un procesu katalizējošs enzīms eksistē *in vivo* Trūkumi: dārgs un nestabils enzīms, pH un temperatūras atkarība [60, 80].

Antioksidantu aktivitātes novērtēšanai izmanto arī reālas sistēmas. Daži piemēri ir parādīti 1.3. tabulā [32, 81-84].

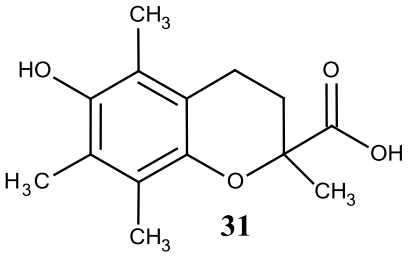
1.3. tabula

Konkurences metožu piemēri reālajās sistēmās

Substrāts	**Oksidējamais savienojums**	**Oksid-ētājs**	**Indikators**	**Detektēšana**
rapšu eļļa	lipīdi	O_2 (t^0)	kālija jodīds, kas reakcijā ar lipīdu oksidēšanas produktiem (peroksīdiem) izdala jodu	izdalītā joda titrēšana ar nātrija tiosulfāta standartšķīdumu
eritrocīti	lipīdi	H_2O_2	tiobarbiturskābes atvasinājumi, kas dod krāsainus produktus ar lipīdu peroksīdiem	fotometriskā, pie 532 nm
polietilēna plēve	polietilēns	O_2 (t^0)	masas zudums, siltuma plūsma	termiskā analīze (*TG*, *DSK*)

Pētījumu rezultātu izteikšanai ir svarīga loma parauga antioksidatīvas aktivitātes objektīvajā atspoguļošanā, rezultātu salīdzināšanā un izvērtēšanā.

Visbiežāk rezultāti pamatojas uz mērījumiem, kas tiek veikti pie fiksēta galapunkta. Šie rezultāti tiek salīdzināti ar references materiālu, par kuru parasti izmanto Troloksu (*Trolox*) - (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karbonskābe) **(31)** (1.10. att.), kas ir vitamīna E ūdenī šķīstošais analogs [7, 32, 65].

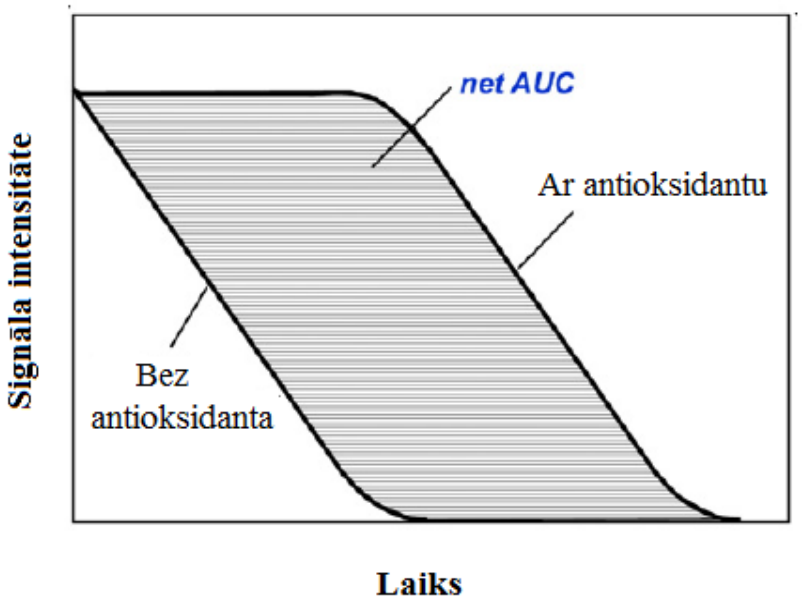


31

1.10. att. **Troloks - (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karbonskābe) (31)**

Antioksidatīvo aktivitāti bieži izsaka kā Troloksam ekvivalento antioksidatīvo aktivitāti/kapacitāti (*TEAC*), kas ir antioksidanta molārā (mmol•L^{-1}) koncentrācija, kurā antioksidants inhibē brīvo radikāli tikpat kā 1 mM Troloksa **(31)** šķīdums tādos pašos apstākļos (piemēram, to izmanto *ABTS, FRAP, ORAC* metodēs) [85]. Gadījumos, kad antioksidantam nav noteiktas molekulmasas, kā tas ir augu ekstraktiem, rezultātus var izteikt kā Troloksa ekvivalentus uz ekstrakta 1 gramu, līdzīgi kā tiek noteikta jonapmaiņas sveķu aktivitāte [86-90]. Šī rezultātu izteikšanas metode ļauj salīdzināt dažādus publicētus datus, ja metode, šķīdinātājs un laiks ir vienādi. Cits rezultātu izteikšanas veids, ko bieži izmanto pie fiksēta galapunkta mērījumiem, ir inhibēšanas masas daļas mērīšana, salīdzinot tukšā parauga signāla intensitāti un analītisko signālu pēc testēšanas parauga pievienošanas (izmanto $DFPH^{\bullet}$ metodē). Bieži izmanto IK_{50} parametru (jeb EC_{50}, IC_{50}), kas parāda, kāda antioksidanta koncentrācija ir nepieciešama, lai panāktu 50% inhibēšanas efektu. Šo parametru piedāvāja Brand-Williams un viņa kolēģi [91] , un vēlāk to plaši sāka izmantot citi pētnieki, lai prezentētu savus rezultātus. Kā termins tas tika ieviests analoģi „bioloģiskiem" parametriem, tādiem kā LD_{50} (toksikoloģijā: letālā doza 50 - doza, kas izraisa nāvi 50% no eksperimenta dzīvniekiem). Jo lielāka ir antioksidatīva aktivitāte, jo zemāka ir IK_{50} vērtība. Tā kā inhibēšanas pakāpe (%) ir atkarīga gan no radikāļa koncentrācijas, gan no ņemtā parauga koncentrācijas, nevar salīdzināt pētījumus, kuros izmanto dažādas izejas koncentrācijas. Izmantojot mērījumus pie fiksēta galapunkta, ir jāpārliecinās, ka dotajā laikā reakcija ir beigusies.

Citu rezultātu pamatā ir substrāta oksidēšanas kinētiskie pētījumi. *ORAC* un citās metodēs antioksidatīvas aktivitātes kvantitatīvai noteikšanai mēra laukumu starp divām līknēm – substrāta oksidēšanas līknēm ar un bez antioksidanta (*net AUC, area under curve*) (1.11. att.) [63, 77].



1.11. att. **Laukums starp substrāta oksidēšanas līknēm ar un bez antioksidanta** [34]

Dažās metodēs rezultātus izsaka, izmantojot laiku, uz kuru antioksidants spēj aizkavēt substrāta oksidēšanos – indukcijas laiku (bieži izmanto tauku oksidēšanas metodēs). Pētot dažādus savienojumus sarežģītos maisījumos, šis parametrs nav izmantojams [59].

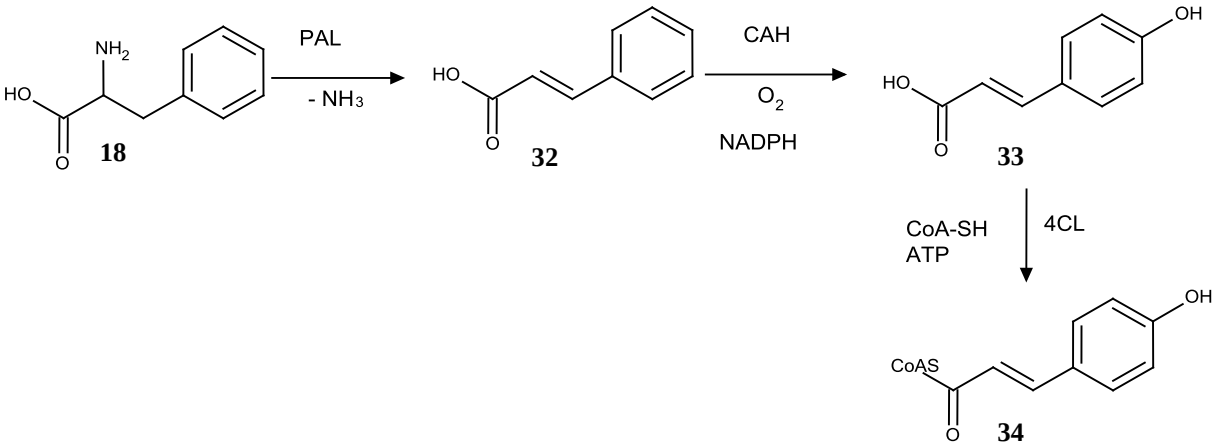
Teorētiskajos pētījumos antioksidatīvas aktivitātes racionalizēšanai un paredzēšanai tiek aprēķināti dažādi termodinamiskie deskriptori, galvenokārt, O-H saišu disociācijas entalpijas, deprotonēšanas un jonizācijas enerģijas. Ir parādīts, ka dažādiem polifenoliem šādu aprēķinu rezultāti labi korelē ar eksperimentāli noteikto antioksidatīvo aktivitāti [52-53, 58, 92-93].

Augu izcelsmes polifenolu strukturālā dažādība apgrūtina to antioksidatīvas darbības mehānismu un struktūras-aktivitātes sakarību noteikšanu. Šiem dabas antioksidantiem piemēroto antioksidatīvas aktivitātes pētīšanas metožu izvēle ir svarīgs analītiskās un dabasvielu ķīmijas jautājums. Līdz šīm brīdim kā antioksidanti ir labi raksturoti flavanoīdi, lignāni, stilbēni, fenolskābes u.c. Diarilheptanoīdu un lignīnu sistemātiskie pētījumi šajā aspektā ir veikti ievērojami retāk.

1.4. Diarilheptanoīdi

Diarilheptanoīdiem ir divi aromātiskie gredzeni, kas savā starpā ir saistīti ar alifātisko ķēdi, kas sastāv no septiņiem oglekļa atomiem. Tos var iedalīt divās grupās: lineārajos un cikliskajos diarilheptanoīdos. Lineāros diarilheptanoīdus var iedalīt divās apakšgrupās: nefenola diarilheptanoīdi un lineārie fenolu diarilheptanoīdi jeb kurkuminoīdi [94-95].

Kurkuminoīdu specifiskās biosintēzes izejviela ir 4-kumaril-CoA (*p*-kumaril CoA) **(30)**, kas ir veidojies no fenilalanīna **(18)** pēc tā biosintēzes saskaņā ar 1.12. attēlā parādīto shēmu.

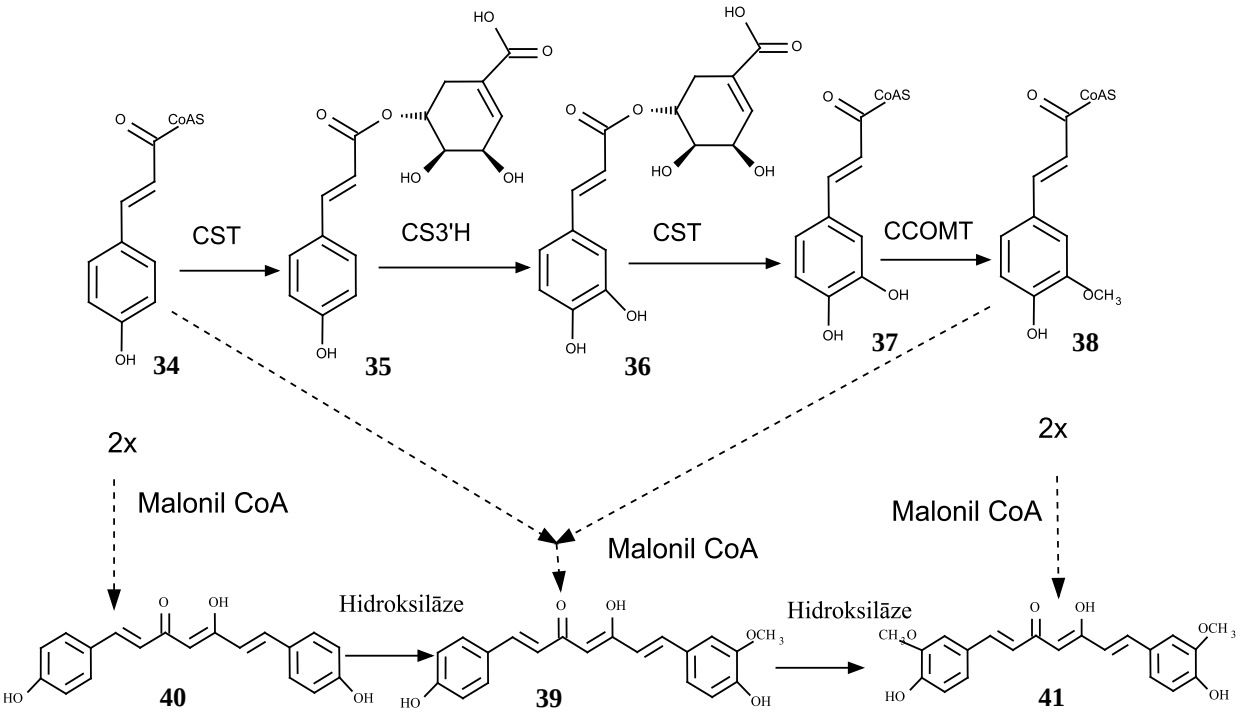


1.12. att. **4-kumaril-CoA (34) veidošanās no fenilalanīna (18) shēma**

PAL -fenilalanīna amonija liāze, **CAH** - cinamāt-4-hidroksilāze, **4 CL** - 4-kumarāt-CoA ligāze; **32 -** kanēļskābe; **33 -** *p*-kumarīnskābe

1.13. attēlā ir parādīti diarilheptanoīda kurkumīna **(39)** biosintēzes no 4-kumaril-CoA (*p*-kumaril CoA) **(34)** iespējamie ceļi.

Kurkumīns -1,7-bis-(-4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadiēn-2,5-dions **(41)** (1.13. att.) ir pirmais atklātais diarilheptanoīds. To iegūst no *Curcuma longa* saknēm un stublāja. *C. longa* ir plaši kultivētais augs Āzijas tropiskajās zonās un Centrālajā Amerikā. [96-98]. Kurkumīns **(41)** bija diarilheptanoīdu vienīgais zināmais pārstāvis līdz 1964. gadam. Nākošajos 30 gados no dažādām augu sugām tika izolēti 70 lineāri un 35 makrocikliski diarilheptanoīdi. Cikliskie diarilheptanoīdi veidojas no lineāriem diarilheptanoīdiem oksidatīvas ciklizācijas rezultātā [96-98].



1.13. att. **Diarilheptanoīda kurkumīna (41) biosintēzes shēma**

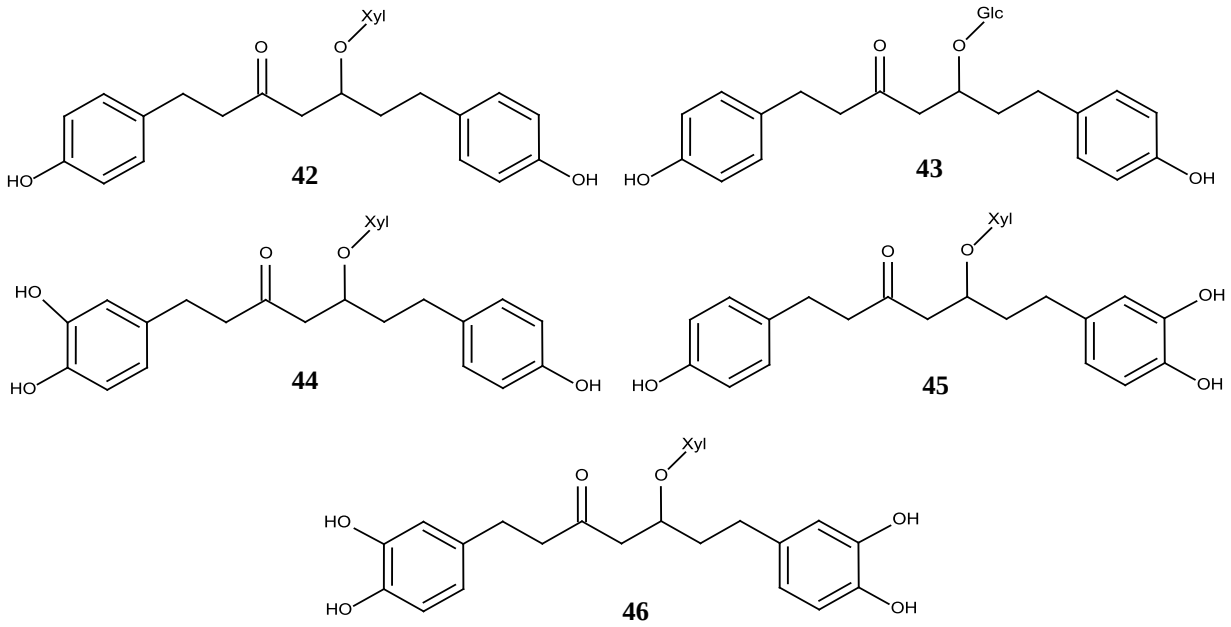
35 – 4-kumaril-5-O-šikimāts; **36** – kafeoil-5-O-šikimāts; **37**– kafeoil-CoA**; 38** – feruoil CoA; **39–**demetoksikurkumīns; **40** – bisdemetoksikurkumīns; **CST** = p-kumarilšikimāta transferāze; **CS3'H** = p-kumaril 5-O-šikimāt 3-O-hidrolāze; **CCOMT** = kafeoil-CoA O-metiltransferāze

Diarilheptanoīdu izdalīšanai no augu izejvielām izmanto ekstrakciju ar organiskajiem šķīdinātājiem. Parasti veic secīgu ekstrakciju ar dažādas polaritātes šķīdinātājiem, un diarilheptanoīdus izdala no etilacetāta frakcijas [99-104]. Augsti efektīvā šķidruma hromatogrāfija (*HPLC*) ir visplašāk izmantotā diarilheptanoīdu un citu mazmolekulāru hidrofīlo ekstraktvielu analīzes metode. Visbiežāk izmanto *UV*- detektoru, diožu matricas detektoru (*DAD*), kā arī fluorescences detektoru. Mūsdienās polifenolu pētīšanai *HPLC* apvieno ar *MS* un *PMR*. Diarilheptanoīdu struktūras analīzei izmanto arī Furjē transformāciju infrasarkano spektroskopiju (*FTIR*) [103-106].

1.4.1. Mizas diarilheptanoīdi

Diarilheptanoīdi ir plaši izplatīti kokaugu koksnē un mizā. Galvenokārt diarilheptanoīdu savienojumi ir raksturīgi bērzu (*Betulaceae)* dzimtas ģintīm, īpaši alkšņu (*Alnus*) sugām [94-95, 100-102]. Visvairāk datu ir par diarilheptanoīdu izdalīšanu no Āzijā un Ziemeļamerikā augošo alkšņu mizām. [94-95, 102, 111]. Sarkanajā alksnī (*Alnus rubra)*, Japānas alksnī (*Alnus japonica)*, kā arī *Alnus firma, Alnus hirsuta* un *Alnus nepalensis*, ir atklāti un izpētīti

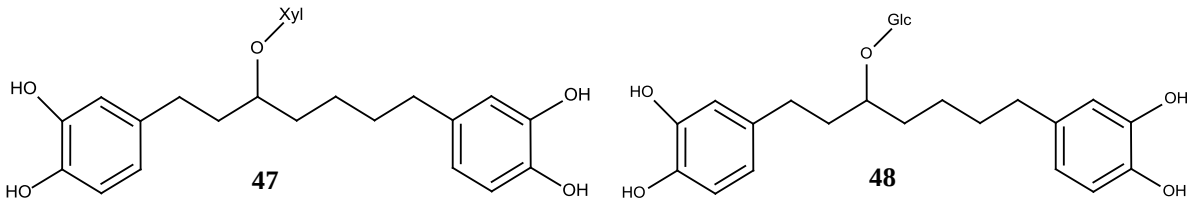
dažādas struktūras diarilheptanoīdu savienojumi. Piemēram, 1.14. attēlā ir parādīti lineāro fenola diarilheptanoīdu glikozīdi ar cukura atlikumu pie 5. alifātiskās ķēdes oglekļa atoma un karbonilgrupu pie 3. alifātiskās ķēdes oglekļa atoma, kas ir izdalīti no Japānas alkšņa (*Alnus Japonica*) mizas.



1.14. att. **No Japānas alkšņa (*Alnus japonica*) mizas izdalītie diarilheptanoīdu glikozīdi ar vienu cukura atlikumu un karbonilgrupu;**

(glc = β-D-glikopiranozil- un **xyl** = β-D-ksilopiranozil-**) 42** – platifilanol-5-ksilopiranozīds; **43** – platifilozīds; **44** – alnuzīds A; **45 –** alnuzīds B**; 46** – oregonīns

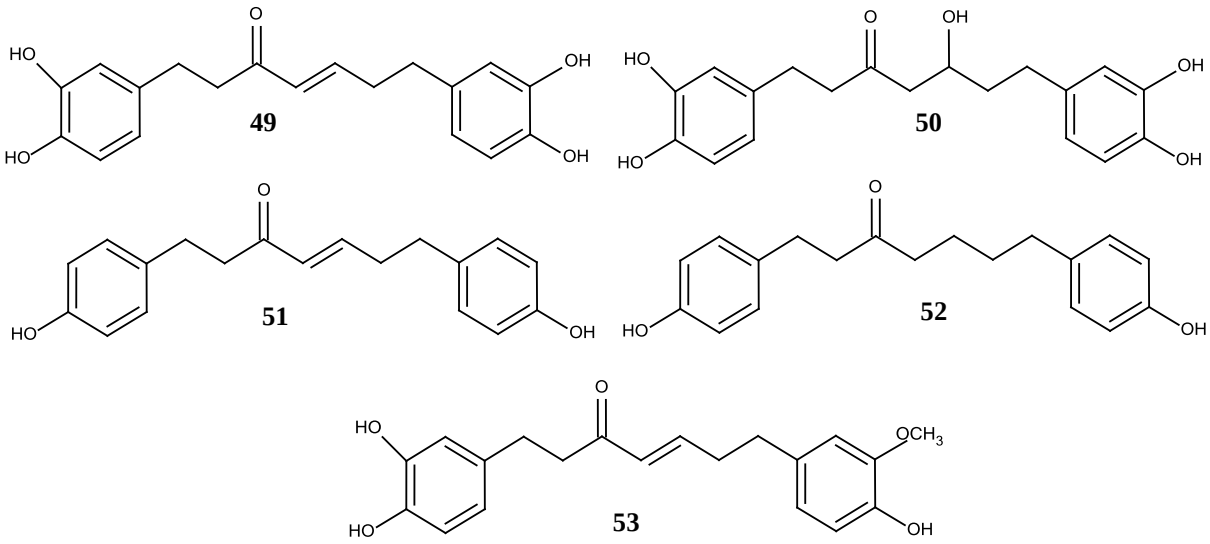
1.15. attēlā ir parādīti no sarkanā alkšņa (*Alnus rubra*) mizas izdalīto lineāro fenola diarilheptanoīdu glikozīdi ar cukura grupu pie 3 oglekļa atoma, kas nesatur karbonilgrupu.



1.15. att. **No Sarkanā alkšņa (*Alnus rubra*) mizas izdalītie diarilheptanoīdu glikozīdi bez karbonilgrupas alifātiskajā ķēdē**

43 - 1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-heptān-3-O-B-D-ksilopiranozīds; **44** - 1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-heptān-3-O-B-D-glikopiranozīds.

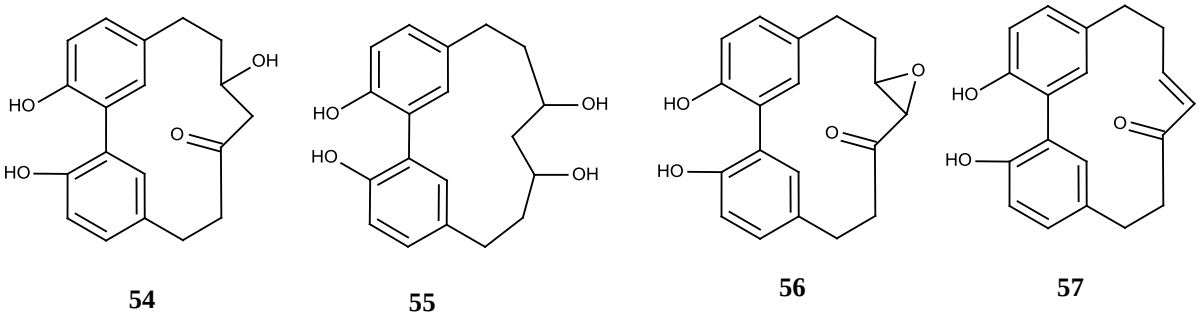
Alnus rubra mizā ir pierādīti arī sarežģītākas struktūras diarilheptanoīdu glikozīdi, kas satur vairākus cukura atlikumus [100, 111]. No *Alnus Japonica, Alnus rubra, Alnus hirsuta* un *Alnus firma* mizām ir izdalīti arī dažādi diarilheptanoīdi brīvā veidā, piemēram, 1.16. attēlā parādītie savienojumi [112].



1.16. att. **No dažādu alkšņu mizām izdalītie diarilheptanoīdi ar kabonilgrupu alifātiskajā ķēdē.**

49 – hirsutenons; **50** – hisrsutanonols; **51** – platifilenons; **52** – platifilons

A. rubra, A. Japonica un *A. hirsuta* mizu sastāvā ir identificēti arī cikliskie diarilheptanoīdi. Dažas šo savienojumu struktūras ir parādītas 1.17. attēlā [111- 112].



1.17. att. **No dažādām alkšņu mizām izdalītie cikliskie diarilheptanoīdi**

54 - alnusonols; **55** - alnusdiols; **56** - alnusoksīds; **57** - alnusons

Pētījumi par diarilheptanoīdu identificēšanu un izdalīšanu no Eiropas alkšņiem ir ļoti ierobežoti. 2002.gadā tika ziņots par diarilheptanoīda oregonīna (1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-

heptān-3-one-5-O-β-D-ksilopiranozīds) **(46)** izdalīšanu no Vācijas *A. glutinosa* mizas, ka arī par tā identifikāciju *A. incana, A. viridis,* un *A. Cordata* mizās. *Alnus glutinosa* un *Alnus incana* ir izplatīti Ziemeļeiropā, *A.viridis* ir atrodams Alpu kalnainā reģionā, *A. cordata* dzimtene ir Dienviditālija un Korsika. Pagaidām oregonīns **(46)** nav komerciāli pieejams [115-119].

No Eiropas bērza (*Betula pendula*) iekšējās mizas ir izdalīti 7 diarilheptanoīdi, tai skaitā platifilozīds **(43)** un platifilons **(53)** [120].

1.4.2. Diarilheptanoīdu antioksidatīva un bioloģiskā aktivitāte

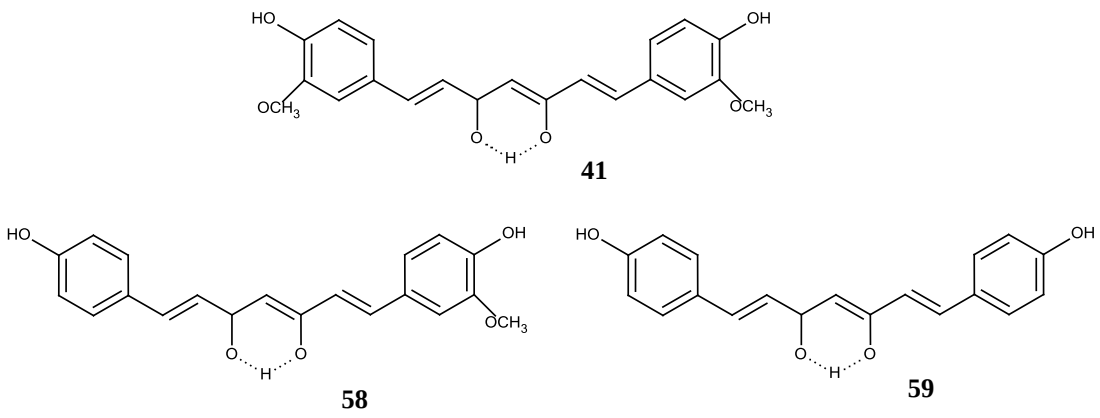
Diarilheptanoīdiem piemīt dažādas bioloģiskās un farmakoloģiskās aktivitātes, ieskaitot pretiekaisuma, pretsēnīšu, antibakteriālās, pretvīrusu, imunomodulējošā un citas, kā arī antioksidatīva aktivitāte [121-123]. Starp diarilheptanoīdiem vislabāk ir raksturots kurkumīns **(41)** [69, 124-128]. Pētījumi par kurkumīna **(41)** antioksidatīvo aktivitāti parādīja, ka tas spēj darboties ne tikai kā brīvo radikāļu dezaktivātors, bet arī kā metālu helators un inhibēt ar metālu joniem iniciēto oksidatīvo stresu, kā arī ietekmēt enzīmatiskus antioksidantus [129]. Kurkumīns **(41)** un radniecīgie diarilheptanoīdi nav toksiski, ko apstiprina fakts, ka sausa kurkuma ir plaši izmantota kā pārtikas komponente [130-132]. Kurkumīnu **(41)** saturošā *Curcuma longa (Zingiberaceae)* sakne ir ļoti populāra Āzijas medicīnā kā līdzeklis pret aknu slimībām un reimatismu. Eiropas etnomedicīnā rekomendē kurkumu kā holēras ārstniecības līdzekli [125].

Tautas medicīnā izmanto arī diarilheptanoīdus saturošu koku mizu. Piemēram, *Alnus japonica* miza ir izmantota austrumu tradicionālajā medicīnā, lai ārstētu drudzi, asiņošanu, kunģa - zarnu trakta traucējumus, vēzi un alkoholismu. *Alnus rubra* mizu Ziemeļamerikas pamatiedzīvotāji izmantoja dažādu slimību (no saaukstēšanās līdz pat sirds sāpēm) ārstēšanai [95]. Pētījumos par izdalītajiem mizas diarilheptanoīdiem ir parādīts, ka oregonīnam **(46)** (1.14. att.) un hirsutanonolam **(50)** (1.16. att.) piemīt pretaudzēju, pretiekaisumu un antioksidatīvie efekti [133].

Pētījumi par diarilheptanoīdu struktūras-antioksidatīvas aktivitātes saistību un darbības mehānismiem ir veikti, pārsvarā izmantojot kurkumīnu **(41)** un tā atvasinājumus [134, 69, 135-138].

Kā bija parādīts iepriekš, vienkāršo fenolu antioksidatīvo aktivitāti palielina *o*-stavoklī (attiecībā pret fenola hidroksilgrupu) esošās metoksilgrupas vai hidroksilgrupas [54, 57, 139]. *o*-Metoksilgrupām ir svarīga nozīme diarilheptanoīdu antioksidatīvajā aktivitātē, ko apstiprina pētījumi par kurkumīna **(41),** demetoksikurkumīna **(58)** un bis-demetoksikurkumīna **(59)**

aktivitāti, izmantojot linolskābes peroksidēšanas un fosfomolibdēna metodes. Šo savienojumu struktūras ir parādītas 1.18. attēlā.

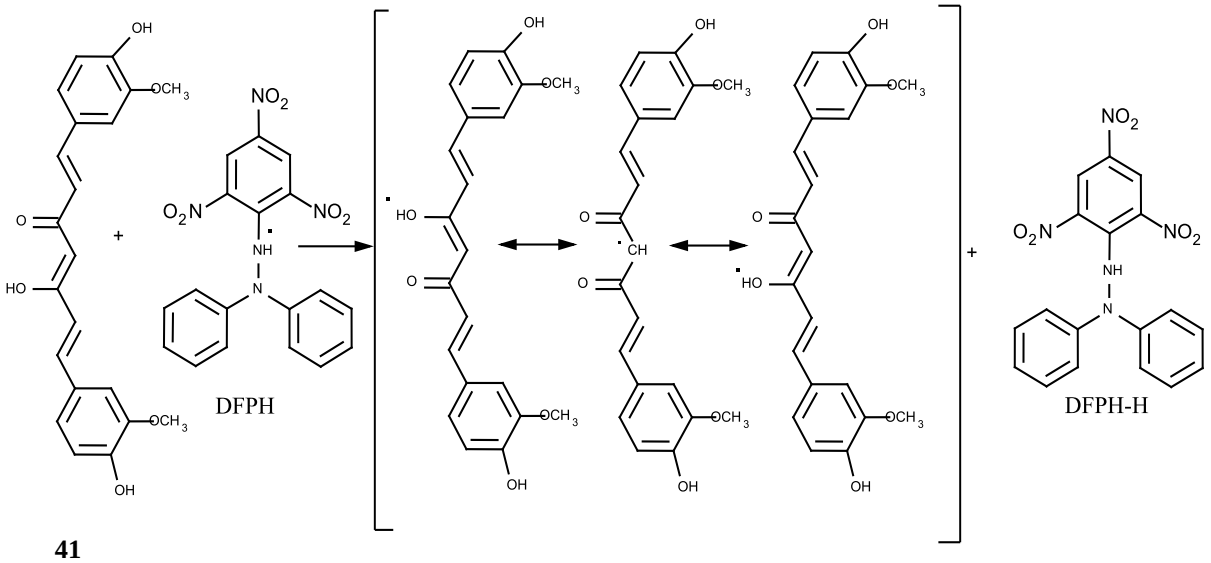


1.18. att. **Kurkumīns un tā analogi, kas atšķiras pēc metoksilgrupu skaita**

41 - kurkumīns; **58** – demetoksikurkumīns; **59** – bis-demetoksikurkumīns [139]

o-Metoksilgrupu un *o*-hidroksilgrupu ieguldījumu diarilheptanoīdu antioksidatīvajā aktivitātē apstiprina arī pētījumi par dažādu kurkuminoīdu un tetrahidrokurkuminoīdu reakcijām ar 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikāļiem [134].

Ir veikti pētījumi par kurkumīna ketoformas alifātiskās ķēdes centrālā oglekļa atoma lomu brīvo radikāļu dezaktivēšanā. Iespējamais reakcijas mehānisms ar 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikāļiem (DPPH$^{\bullet}$) ir parādīts 1.19. attēlā.



41

1.19. att. **Kurkumīna (41) un 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikāļu (DFPH$^{\bullet}$) iespējamais reakcijas mehānisms**

Pētījumi par alifātiskās ķēdes struktūras ietekmi uz diarilheptanoīdu antioksidatīvo aktivitāti ir pretrunīgi. Daži pētījumi parāda, ka dubultsaites alifātiskajā ķēdē (ieskaitot C-C dubultsaites α-stāvoklī pret gredzenu) palielina diarilheptanoīdu antioksidatīvo aktivitāti [140-142], turpretī citi parāda, ka attiecībā pret aromātiskajiem gredzeniem α-stāvoklī esošās dubultsaites to samazina [134]. Parādīta alifātiskās ķēdes hidroksilgrupu iespējamā pozitīvā ietekme uz diarilheptanoīdu antioksidatīvo aktivitāti [142].

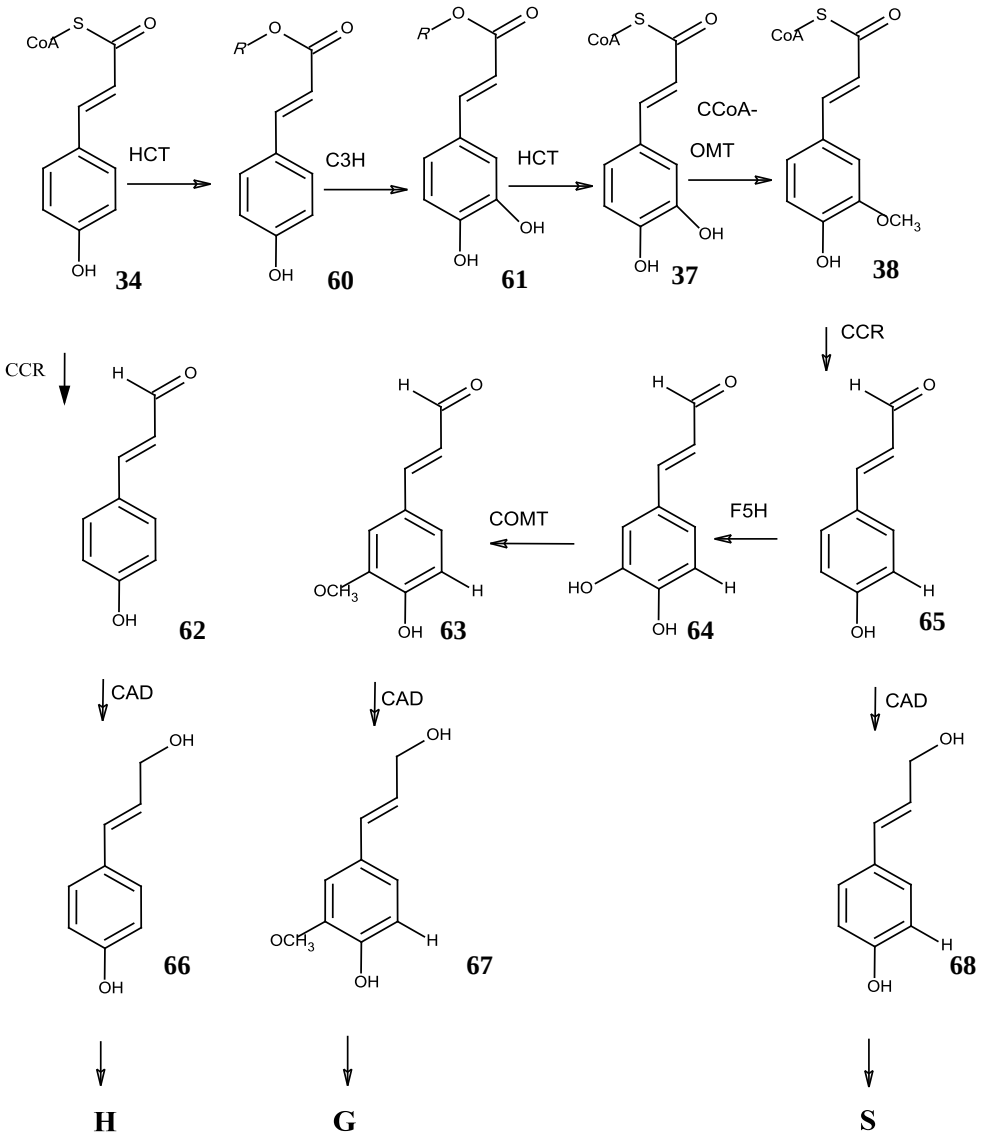
1.5. Lignīns

1.5.1. Dabas lignīns

Lignīns ir trīsdimensionāls polimērs, kas sastāv no metoksilētām fenilpropāna (C_6-C_3) vienībām, kas saistītas ar dažāda tipa ēteriskajām un C - C saitēm [56].

Augu valstī lignīns kā fotosintezētais dabas polimērs apjoma ziņā ieņem otro vietu pēc celulozes. Dabiskos apstākļos tas eksistē interpolimērajā kompleksā ar ogļūdeņražiem, galvenokārt, hemicelulozēm. Tas ir koksnes pamatsastāvdaļa (vidēji 20 - 30% no sausas koksnes masas). Skuju koku koksne satur no 24% līdz 33% lignīna, bet lapkoku - no 19% līdz 28%. Lignīns ietilpst arī viengadīgo augu sastāvā. Bambusniedru, cukurniedru un labības augu stiebros tā saturs svārstās no 15% līdz 25%. Lignīna sadalījums augos ir nevienmērīgs [143-144]. Lignīna bioloģiskā funkcija ir kopā ar polisaharīdiem veidot izturīgas augu audu struktūras, nodrošinot augu mehānisko izturību, ūdens pārvades sistēmu sablīvējumu, aizsargspēju pret biodegradāciju un citām nevēlamām apkārtējās vides iedarbībām [115, 145]. Lignīnam ir svarīga loma celulozes aizsardzībai koksnē pret fotodegradāciju.

Lignīna molekula veidojas trīs hidroksikanēļspirtu: 4 - kumarilspirta, koniferilspirta un sinapilspirta polimērizācijas rezultātā. Šo monolignolu specifiskā biosintēze sākas no 4-kumaril-CoA (*p*-kumaril CoA). Lignīna biosintēzes reakcijas līdz 4-kumaril-CoA sintēzei ir tādas pašas kā diarilheptanoīdu biosintēzē. Fenilalanīna sintēzes shēma ir parādīta 1.3.attēlā, 4-kumaril-CoA (*p*-kumaril CoA) sintēzes shēma - 1.12. attēlā, monolignolu specifiskās biosintēzes shēma - 1.20. attēlā. Pēc metoksilēšanas pakāpes atšķirīgie *p*-hidroksikanēļspirti veido polimērā *p*-hidroksifenilvienības (H), gvajacilvienības (G) un siringilvienības (S) (1.20. att.). Skuju koku lignīnā pārsvarā ir gvajacilvienības (4-hidroksi-3-metoksifenilpropāns), bet lapkoku lignīnā kopā ar iepriekšminētajām struktūrvienībām ir arī siringilvienības (4-hidroksi-3,5-dimetoksifenilpropāns). Viengadīgo augu lignīnā ietilpst gvajacilvienības, siringilvienības un arī *p*-hidroksifenilvienības [146-147].

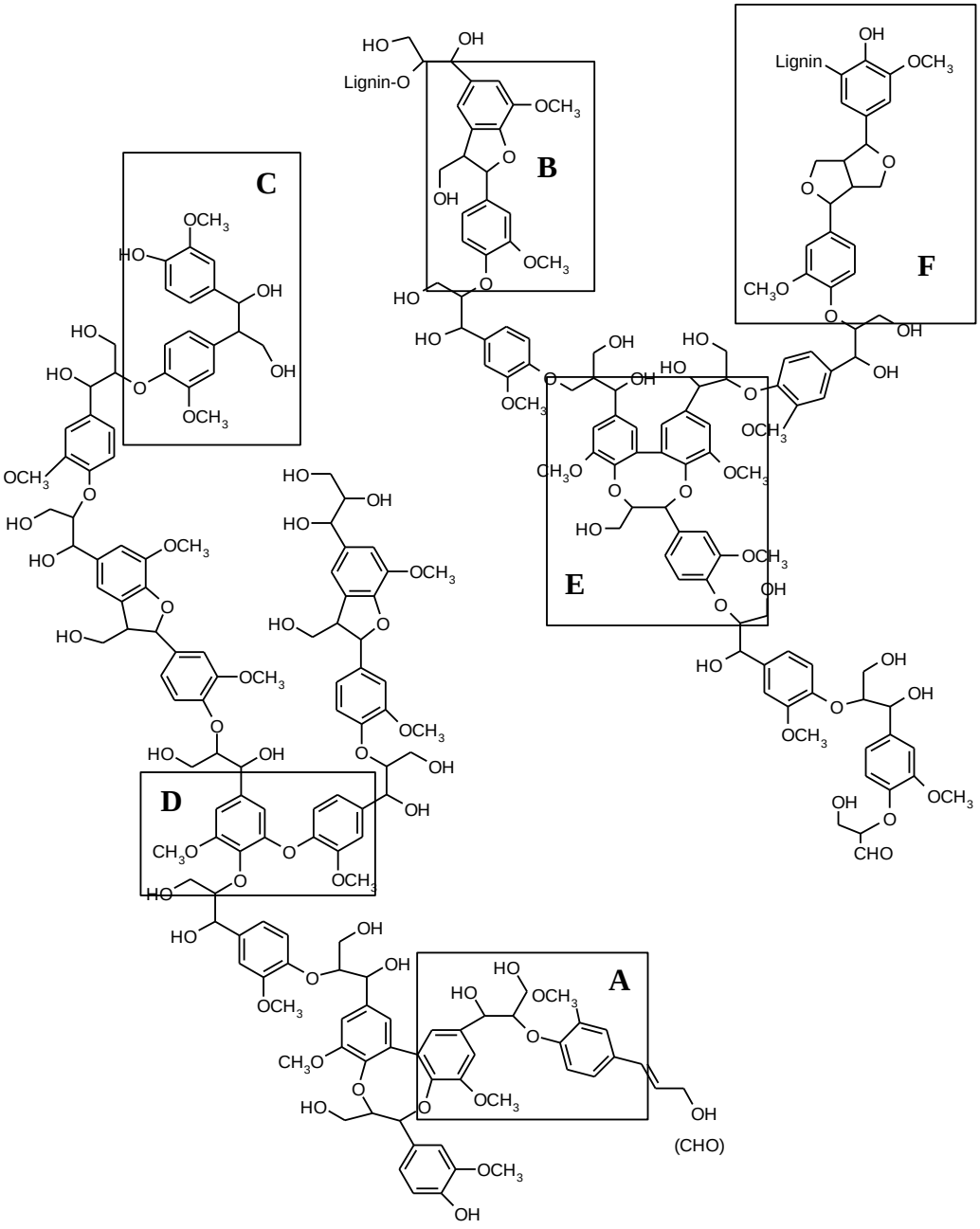


1.20. att. **Monolignolu specifiskās biosintēzes shēma**

62 - *p*-kumarilaldehīds; **63** - sinapilaldehīds; **64** – koniferilaldehīds; **65** – 5-hidroksikoniferilaldehīds; **66** – kumarilspirts; **67** – sinapilspirts; **68** – koniferilspirts; **HCT**- *p*-hidroksikanamoil-CoA:hināt/šikimāt-*p*-hidroksicinamoiltransferāze; **C3H** - p-kumarāt-3-hidroksilāze; **CCoAOMT** - kafeoil-CoA O-metiltransferāze; **CCR** - cinamoil-CoA reduktāze; **F5H** – ferulāt-5-hidroksilāze; **COMT** - kafijas skābes O-metiltransferāze; **CAD** – cinamoil-spirta dehidroģenāze

Monomēro spirtu polimerizācija sākas ar to fermentatīvo oksidēšanu (dehidrogenizāciju), kuras rezultātā no monolignoliem tiek atņemts protons un veidojas mezomēra radikāļu sistēma. Šie oksidēšanās produkti saistās savā starpā, veidojot dilignolus, trilignolus un oligolignolus. Tālāka polimerizācija ("*end wise*" polimerizācija) notiek, monolignoliem saistoties ar di - vai oligolignolu fenola gala grupām, vai arī saistoties divām radikāļu gala grupām, veidojot sazarota polimēra molekulu [144, 148-149]. Lignīna makromolekulu nevar aprakstīt ar vienu vai vairāku monomērvienību vienkāršu kombināciju,

kā celulozei un hemicelulozēm, jo tā veidojas nevis ģenētiski noteikta regulāra procesa rezultātā, bet lignolu nejaušas saistīšanās (dažādās vietās) rezultātā [150]. Lignīna saišu dažādību demonstrē Brunova modelis (1.21. att.) [148].



1.21. att. **Skuju koku koksnes lignīna fragmenta shēma**

A - β-arilēteris [β-O-4]; **B** - fenilkumarans [β-5(α-O-4)]; **C** - β-1; **D** - difenilēteris [5-O-4]; **E** - dibenzodioksocins [5-5/β-O-4(α-O-4)]; **F** - resinols [β-β`(γ-O-α)]

Galvenais saites tips ir β-O-4 saite (A 1.21. att.), kas sastāda vairāk nekā pusi no visu saišu tipiem starp fenilpropāna struktūrvienībām lignīnos [151-152]. Lignīna makromolekulā ir sastopamas dažādas funkcionālas grupas: metoksilgrupas; fenola hidroksilgrupas;

alifātiskās hidroksilgrupas; karboksilgrupas; karbonilgrupas (aldehīdgrupas vai ketogrupas propāna ķēdes α-, β- un γ-stāvoklī, hinonās grupas); C=C dubultsaites propāna ķēdē. Lignīna struktūra un ķīmiskā heterogenitāte ir atkarīga no tā lokalizācijas vietas augā un šūnas sieniņā, auga sugas un augšanas apstākļiem. Lignīns tiek raksturots ar funkcionālo grupu un substruktūru dažādu izkārtojumu makromolekulās ar dažādu molekulmasu. Lignīna polidispersitātes (molekulmasas izkliedes) rezultātā apskata vidējo skaitlisko M_n un vidējo masas M_w molekulmasu vērtības. M_w/M_n attiecība raksturo polidispersijas pakāpi [153-157].

Izdalot lignīnu no augu audiem, tiek mainīta to molekulmasa un funkcionālo grupu saturs, kā arī tiek modificētas saites starp fenilpropāna vienībām un propāna ķēdes struktūru, atkarībā no izdalīšanas metodes [153-158]. Lignīna izdalīšanas metodes principiāli iedalāmas divās grupās: 1) izšķīdina holocelulozi (celuloze + hemicelulozes), pāri paliek nešķīstošs lignīns, kuru nofiltrē; 2) izšķīdina pašu lignīnu un to no šķīduma izdala ar dažādiem paņēmieniem. Uz šīm metodēm pamatojas dažādas fitomasas ķīmiskās pārstrādes tehnoloģijas.

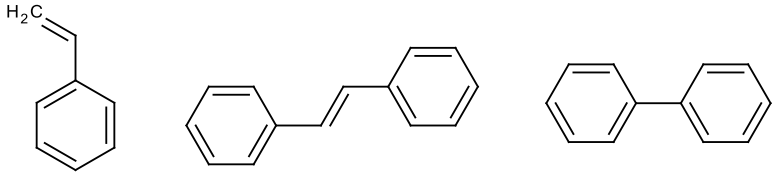
Viens no paņēmieniem, kā var izdalīt maz izmainītu lignīnu (salīdzinot ar augu audu lignīnu), ir izmantot *Bjorkmana* procedūru**:** fitomasas miltus ilgstoši maļ bumbu vibrodzirnavās inertā vidē, parasti suspensijā toluolā vai atdzesējot, pēc tam ekstrahē ar dioksānu. Izdalīšana notiek bez aktīvu ķīmisku reaģentu (skābes, sārmi, oksidētāji un tamlīdzīgi) iedarbības, un iegūtais lignīns (maltās koksnes lignīns, angl. *MWL – milled wood lignin* jeb *Bjorkmana* lignīns) visvairāk tiek izmantots lignīna ķīmiskās struktūras pētījumos. Jāatzīmē, ka *MWL* lignīnu nevar uzskatīt par absolūti neizmainītu, jo tā izšķīdināšana izsauc saišu mehanoķīmisko destrukciju. Egles *MWL* lignīns satur 15,60% metoksilgrupu, 2,97% fenola hidroksilgrupu, 9,29% alifātisko hidroksilgrupu, 3,06% karbonilgrupu; tā M_w ir ap 15000 [157, 159-160].

1.5.2. Tehniskie lignīni

Lignīnus, kurus iegūst kā blakusproduktus pēc koksnes vai lauksaimniecības augu ķīmiskās pārstrādes, sauc par tehniskajiem lignīniem, jo to dabiskā struktūra ir modificēta pārstrādes procesos [154-161]. Fitomasas ķīmiskās pārstrādes pamatvirzieni ir celulozes - papīra rūpniecība, hidrolīzes rūpniecība un termiskā sadalīšana**.** Katru gadu celulozes vārīšanas un papīra iegūšanas procesos no koksnes tiek izdalīti ap 50 - 100 miljonu tonnu tehnisko lignīnu. Degvielas etanola ražošana no lignocelulozes izejvielām, ko nosaka Eiropas Savienības direktīvas, palielinās lignīnu saturošo hidrolīzes rūpniecības blakusproduktu

daudzumu. Gandrīz visā koksnes ķīmiskās pārstrādes attīstības vēsturē pārsvarā tika domāts par galveno produktu īpašību uzlabošanu. Lignīnu saturošie blakusprodukti galvenokārt tiek izmantoti kā kurināmais, lai uzlabotu pamatprocesa enerģētisko bilanci, un tikai neliela daļa (1-2%) tiek pārvērsta produktos ar pievienoto vērtību. Pēdējos gados situācija sāk mainīties, jo tiek apzināts lignīna lielais potenciāls dažādās jomās. Tiek izstrādātas jaunas lignīna izdalīšanas tehnoloģijas, lai uzlabotu iegūstamo blakusproduktu īpašības un efektīvi tos izmantotu [162-164].

90% no visām celulozes iegūšanas rūpnīcām izmanto tā saucamo '*kraft*' jeb sulfātvārīšanas metodi. Šajā procesā iegūst celulozi ar lielu izturību, kura visvairāk tiek izmantota kā izejviela papīra rūpniecībā. Sasmalcinātu koksni 180 °C temperatūrā autoklāvos apstrādā ar Na_2S + NaOH ūdens šķīdumu (Na_2S iegūst no Na_2SO_4 reakcijā ar oglekli). Lignīns pāriet šķīdumā, ko sauc par atsārmu. *Kraft* lignīnu iegūst, atdalot to no sulfātvārījuma atsārma, pazeminot pH (parasti ar sērskābi, arī ar CO_2), nogulsnējot un filtrējot. Pēc tam iegūtās nogulsnes izžāvē. Lignīna izdalīšanai no sulfātvārīšanas atsārma ir gara vēsture, pirmie patenti bija izsniegti pirms vairāk nekā simt gadiem. Pēdējos gados *Innventia AB* un *Chalmers University of technology* sadarbības projektos attīstīja jaunu *LignoBoost* tehnoloģiju, kas ļauj iegūt augstas tīrības lignīnu. Tā ietver sevī daļēji iztvaikojušā atsārma izgulsnēšanu pie pH 10, kam seko filtrēšana, atkārtota lignīna tehnoloģiskā šķidruma (*cake)* re-suspendēšana skābā šķīdumā pirms otrās filtrēšanas un skalošanas [165]. *Kraft* lignīnus iegūst no skuju koku un lapkoku koksnes. *Kraft* lignīniem piemīt hidrofobās īpašības, tie šķīst sārmu šķīdumos un dažos organiskos šķīdinātājos (dimetilsulfoksīds, dioksāns). Ēterisko saišu destrukcijas rezultātā palielinās fenola hidroksilgrupu daudzums. Eliminēšanas reakcijas samazina alifātisko hidroksilgrupu daudzumu. Sulfātvārīšanas procesā notiek reakcijas, kuru rezultātā lignīnā veidojas stirēna **(69)** un stilbēnu **(70)** struktūras (1.22. att.), kā arī katehola un difenila **(71)** vienības [166-168].



69 **70** **71**

1.22. att. **Stirēna (69), stilbēna (70) un difenila (71) struktūras**

Pēdējā laikā tiek aktīvi veikta izpēte sēru nesaturošo delignifikācijas procesu izstrādes jomā. Rūpnieciski realizēts ir natronprocess jeb sārma vārīšana. Šajā procesā celulozi vāra ar

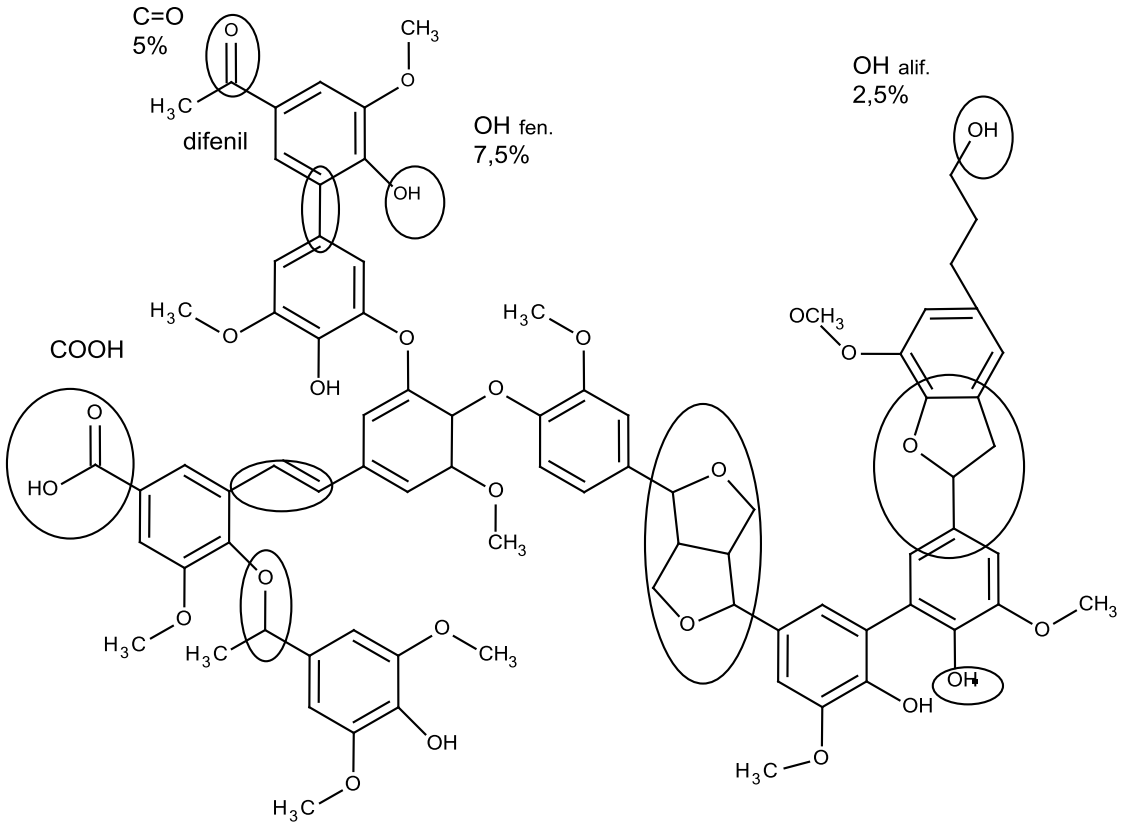
nātrija hidroksīda ūdens šķīdumu pie paaugstināta spiediena un temperatūrā >150 °C. Šķīdumā pāriet praktiski viss lignīns un hemicelulozes. Šķīdumu neitralizējot ar skābi (HCl, H_2SO_4 arī CO_2), izgulsnējas sārma lignīns, kura iznākums no lignīna *in situ* nav simtprocentīgs, jo notiek ievērojama lignīna destrukcija. Preparāts ir ar augstāku fenola -OH grupu saturu, salīdzinot ar citiem lignīna preparātiem. Kā katalizatoru lieto antrahinonu, kas paaugstina celulozes un lignīna iznākumu. Šajā procesā izmanto pārsvarā nekoksnes augus: graudaugu salmus, cukurniedres, kaņepes, sisalu, abaku, linus, džutu u.c. [169-170].

Tiek veikti intensīvi pētījumi par dažādu organisko šķīdinātāju (piemēram, fenols, etanols, metanols, etiķskābe, skudrskābe) izmantošanu delignifikācijā. Ir izstrādāti celulozes ražošanas procesi ar organisko šķīdinātāju izmantošanu, piemēram, *Organocell* [171], bet tie nav ieviesti rūpniecībā ekonomisku iemeslu dēļ. Pašlaik šos procesus piedāvā augu izejvielu pārstrādei lignocelulozes biorafinēšanas tehnoloģijās [172].

Atšķirībā no iepriekš minētajām augu biomasas ķīmiskās pārstrādes metodēm, kurās lignīns tiek iegūts kā šķīstošais produkts un tālāk tiek izgulsnēts, degvielas etanola ražošanas procesos lignīnu saturošo blakusproduktu iegūst kā cietu, nešķīstošu atlikumu. Etanola ražošanas procesā tiek veikta lignocelulozes biomasas hidrolīze, kuras rezultātā ogļhidrāti tiek pārvērsti monosaharīdos, kas ar raugu palīdzību tiek fermentēti par etanolu. Ogļhidrātu hidrolīzi var veikt dažādu minerālskābju vidē, no kurām sērskābe ir vairāk pieņemama no ekonomiskā viedokļa, kā arī izmantojot fermentus. Kā izejvielu izmanto gan koksni, gan lauksaimniecības augus. Hidrolīzes lignīns parasti satur daudz ogļhidrātu degradācijas produktu, ekstraktvielu un neorganisko savienojumu piemaisījumu. Minerālskābju un temperatūras ietekmē notiek lignīna kondensācija – aktīvo reaģētspējīgo grupu zudums un papildu –C-C- saišu veidošanās, līdz ar to ievērojami pazemināsHidrolīzes lignīna reaģētspēja un šķīdība [171, 173]

Viena no perspektīvākajām koksnes termoķīmiskās konversijas tehnoloģijām ir ātrā pirolīze (AP). AP dod iespēju pārvērst biomasu un tās pārstrādes atkritumus šķidrumā (pirolītiskā eļļa) ar augstu enerģētisko blīvumu, ko ir vieglāk transportēt, uzglabāt un izlietot nekā pašu biomasu. Dažādas ražotspējas un atšķirīgu darbības principu ātrās pirolīzes iekārtas darbojas 15 ES valstīs, kā arī ASV, Kanādā un Austrālijā. Pamatprasība iekārtas reaktora konstrukcijai ir augsta siltuma pārvade. Pēdējos gados intensīvi tiek pētīts pirolītiskās eļļas ķīmiskais sastāvs un īpašības ar mērķi izdalīt savienojumus ar vērtīgām īpašībām, gan arī uzlabot pirolītiskās eļļas kā degvielas īpašības [174-176].

Pirolītiskā eļļa (PE) ir sarežģīts fenolu un ogļūdeņražu savienojumu maisījums, kura pamatā ir hemiceluložu, celulozes un lignīna termodegradācijas produkti. Lielā ātrumā disperģējot ūdenī, pirolitisko eļļu sadala ūdenī šķīstošajās un ūdenī nešķīstošajās frakcijās. Ūdenī nešķīstošās frakcijas satur hidrofobus komponentus, galvenokārt lignīnu atvasinājumu fragmentus, tā saucamos pirolīzes lignīnus. Pirolīzes procesā lignīna β-O-4 saites tiek pārrautas, veidojas lignīnu oligomēri ar relatīvi zemu molekulmasu. Iespējamā struktūra parādīta 1.23. attēlā [177-178].



1.23. att. **Pirolīzes lignīna struktūras formālais modelis ($C_{76}H_{67}O_{21}$) ar masu 1315 g•mol^{-1}**

1.5.3. Lignīna struktūras analīzes metodes

Iepriekšminēto lignīnu struktūras komponentu dažādību paplašina un padziļina jaunu fitomasas ķīmiskās (un termoķīmiskās) pārstrādes tehnoloģiju un lignīnu saturošo blaksuproduktu izolēšanas metožu attīstība. Patlaban nav analītisko metožu, kas ļautu pilnīgi raksturot lignīna struktūru. Ļoti bieži rodas nepieciešamība raksturot noteiktas lignīna struktūras īpašības atkarībā no jomas, kurā to vēlas izmantot. Lai iegūtu pēc iespējas vairāk informācijas par to, ir nepieciešams apvienot daudzas metodes. Lignīnu analītiskos pētījumus var iedalīt vairākās grupās: funkcionālo grupu noteikšana, elementanalīze, spektroskopiskās metodes, degradācijas eksperimenti un molekulmasas noteikšana.

Metoksilgrupu noteikšanai visplašāk izmanto *Ceizela-Fibeka-Švapaha* metodi, kas ietver sevī šo grupu kvantitatīvo pārraušanu ar jodūdeņražskābi, veidojot metiljodīdu. Kopējo hidroksilgrupu noteikšanai izmanto kodolmagnētisko rezonansi, acetilēšanas un metilēšanas reakcijas u.c. Fenola hidroksilgrupas nosaka, izmantojot potenciometrisko un konduktometrisko titrēšanu, hemosorbcijas un metilēšanas metodes, diferenciālo UV-spektroskopiju u.c. Alifātiskās hidroksilgrupas nosaka kā starpību starp kopējo un fenola hidroksilgrupu saturu. Aldehīd- un ketogrupu noteikšanai visplašāk izmanto reakciju ar hidroksilamīna hidrohlorīdu. Karboksilgrupas nosaka, izmantojot galvenokārt potenciometrisko un konduktometrisko titrēšanu [157, 179-180].

Elementanalīze kopā ar metoksilgrupu noteikšanu dod informāciju par C_9 vienību vidējo saturu lignīnā.

Biežāk izmantojamās spektroskopiskās metodes ir *UV* un *IS* spektroskopija, kodolmagnētiskās rezonanses spektroskopija (*PMR* un ^{13}*C-PMR*), masspektroskopija kombinācijā ar gāzes hromatogrāfiju, elektronu spinu rezonanses spektroskopija (*EPR*) [146, 157, 179]. Pašlaik ir zināms, ka jebkuras koksnes sugai un visiem no koksnes izdalītajiem preparātiem piemīt paramagnētiskas īpašības - to struktūrā ir brīvie radikāļi. Pirmoreiz paramagnētisko centru klātbūtne lignīnā tika atklāta 1960. gadā. Lignīnam tipiska *EPR* līkne - singlets. *EPR* metodi izmanto lignīna paramagnētisko centru noteikšanai, lignīna struktūras polikonjugācijas noteikšanai, lignīnu transformācijas raksturošanai ķīmiskajos, bioloģiskajos un termiskajos procesos, lignīnu kompleksu veidošanās ar pārejas metāliem, termisko pārvērtību un savietojamības ar cietiem polimēriem pētīšanai [179].

Degradācijas metodes ietver sevī ķīmiskās degradācijas apstrādes paņēmienus: etanolīzi; acidolīzi; hidrogenolīzi; maigo hidrolīzi; tioacetolīzi; oksidēšanu ar permanganātu, ar nitrobenzolu, ar vara(II) oksīdu; ozonēšanu; termiskās degradācijas metodi. Šo metožu pamatā ir lignīna molekulas sašķelšana mazmolekulāros produktos, kuru identificēšana ļauj iegūt informāciju par makromolekulas uzbūvi un saišu veidiem tajā. Analītiskā pirolīze pieder pie perspektīvākajām destruktīvajām metodēm ķīmijā, to tradicionāli izmanto lignīnu struktūras pētīšanā. Galvenie ķīmiski destruktīvo metožu trūkumi ir to sarežģītība oksidējošo aģentu izmantošanas un analīzes veikšanas laikietilpības dēļ. Analītiskās pirolīzes metode ir ātra, jo nav nepieciešama sarežģīta ķīmiskā apstrāde, parauga sagatavošanai to tikai žāvē un sasmalcina. Lignocelulozes materiālu analītiskās pirolīzes procesā polisaharīdu un lignīna degradācijas produktus sadala ar gāzes hromatogrāfiju un identificē ar masspektrometriju. Pirolīzē molekula termiski tiek sašķelta specifiskās vietās ar zemām saišu enerģijām. Analītiskās pirolīzes apstākļos notiek ēte un oglekļa-oglekļa saišu pārraušana, un rezultātā lignīns sadalās līdz monomēru un dimēru savienojumiem.

Identificētie monomērie destrukcijas produkti, to absolūtie vai relatīvie daudzumi sniedz informāciju par polimērās molekulas struktūru kopumā. Piemērotos apstākļos lignīna pirolīzes procesā veidojas monomēri fenoli, kuros propāna ķēde ir pilnīgi atdalīta vai saīsināta līdz vienam vai diviem oglekļa atomiem. Savienojumu ar saīsinātu ķēdi esamība pirolīzes produktos liecina par β-aril-ētera saišu destrukciju. Pirolītiskas dehidrogenācijas rezultātā propāna ķēdēs veidojas jaunas dubultsaites. Metode ir noderīga dažādas izcelsmes lignīnu ātrai salīdzināšanai un tiek plaši lietota lignīna struktūras pētīšanai. Uz pirolīzes produktu gvajacil- un siringilatvasinājumu relatīvā satura pamata iespējams paraugus klasificēt kā gvajacil-tipa vai gvajacil/siringil-tipa lignīnus. [178-179, 181-189].

Lignīna molekulmasas noteikšanai visplašāk izmanto gēlfiltrācijas hromatogrāfiju, kuru apzīmē arī *SEC* (*size exclusion chromatography*) vai *GPC* (*gel permeation chromatography*). Saskaņā ar šīs metodes pamatprincipu, ar mazākiem eluenta tilpumiem izdalās lielmolekulāras frakcijas, ar lielākiem tilpumiem - mazmolekulāras frakcijas. Kalibrēšanai parasti izmanto polistirolu standartus [178, 183]. Molekulmasas noteikšanai izmanto arī gaismas izkliedes, tvaika spiediena osmometrijas un ultrafiltrācijas metodes [179].

Sakarā ar lignīna kā analītiska objekta sarežģītību analīžu gaitā nākas saskarties ar milzīgu datu daudzumu. Pašlaik šie dati netiek pienācīgi izvērtēti un salīdzināti, un hemometrisko metožu ieviešana un attīstība ir viens no svarīgākajiem lignīna analītiskās ķīmijas uzdevumiem. Bez tā lignīna veiksmīga izmantošana dažādās jomās, tai skaitā kā par antioksidantu, nav iespējama.

1.5.4. Lignīna antioksidatīva un bioloģiskā aktivitāte

Pašlaik lignīnu antioksidatīva aktivitāte, proti, spēja dezaktivēt brīvos radikāļus, ir labi dokumentēta. Piemēram, ir parādīta dažādu lignīnu spēja dezaktivēt skābekļa anjonradikāļus un 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikāļus, kas ir atkarīga no lignīna izdalīšanas metodes [189-191]. Lignīns, kas ir iegūts no blakusproduktiem pēc etanola ražošanas no kukurūzas stiebra, veicot to ekstrakciju ar sārmu, uzrādīja augstu antioksidatīvo aktivitāti attiecībā pret fluoresceīna oksidēšanos ar peroksilradikāļiem, kā arī antimikrobiālo aktivitāti attiecībā pret Gram-pozitīvajām baktērijām (*Listeria monocytogenes* un *Staphylococcus aureus*) un raugu (*Candida lipolytica*) [192]. Ir parādīts, ka *kraft* lignīns ir tikpat efektīvs kukurūzas eļļas antioksidants kā vitamīns E [56, 191, 193].

Lignīns inhibē radikāļus un novērš celulozes autooksidēšanos un depolimerizāciju tehniskajā celulozē un papīros. Lignīna iekļaušana polimēru sistēmās var stabilizēt materiālu pret foto- un termisko oksidēšanos [145, 194-200]. Piemēram, ievadot lignīnu, kas ir izdalīts no bērza koksnes priekšhidrolīzes blakusproduktiem, polipropilēnā vai reciklētajā

polipropilēnā no 0,5 līdz 10% (pēc masas), ievērojami palielinās materiāla stabilitate. Antioksidatīvais efekts pieaug, palielinoties lignīna koncentrācijai polimērā no 0,5% līdz 5%. Ir novērots sinerģisms ar komerciālo antioksidantu *Irganox 1010*. Lignīna ievadīšana palielina arī šī materiāla stingrību [201]. Diemžēl, parastie antioksidanti turpina uzrādīt stabilizējošo efektu arī pēc izstrādājuma izmantošanas beigām, kad tas nonāk izgāztuvē. Tas nav vēlams, jo bremzē plastmasas atkritumu sadalīšanos. Ņemot vērā lignīna bionoārdīšanas spēju ar noteiktiem mikroorganismiem, tā izmantošana par antioksidantu kompozītos ļaus novērst šo trūkumu. Piemēram, ir parādīts, ka lignīna, kas ir linu natronvārīšanas procesa blakusprodukts, ievadīšana mazās koncentrācijās (4,2% un 9,3% pēc masas) poli(etilēnadipāt)uretāna plēvēs ievērojami uzlabo šī materiāla degradējamību ar sēnīšu enzīmiem, īpaši ar lakāzi, kas tika izdalīta no *Aspergillus sp.* [202].

Liela molekulmasa, slikta sagremojamība un ierobežota izplatība pārtikas produktos ierobežoja pētījumus par šo ārkārtīgi sarežģīto vielu kā par uzturvielu vai farmakoloģiski aktīvo vielu, salīdzinot ar pētījumiem par mazmolekulāriem polifenoliem. Tomēr ir interesanti atzīmēt, ka vienkāršiem fenoliem, kas ir lapkoku lignīna modeļvielas (sinapilaldehīds, siringilaldehīds, siringols, siringilacetons) ir zemākas fenola O-H saišu disociācijas enerģijas, salīdzinot ar rezveratrolu un vienādas fenola O-H saišu disociācijas enerģijas, salīdzinot ar katehīnu – vienu no spēcīgākajiem uztura antioksidantiem [56]. Dažādi pētnieki piešķir lignīna atvasinājumiem veselības aizsardzībai svarīgas īpašības, ieskaitot antimutagēno, imunostimulējošo, antibakteriālo un citas [203-205]. Parādīts, ka *Lentinus edodes* (šitakē sēnes) micellas ekstrakta attīrīta frakcija inhibē cilvēka imunodeficīta vīrusa darbību. Izrādījās, ka šīs frakcijas aktīvā viela ir ūdenī šķīstošie lignīna atvasinājumi, kas veidojas no nešķīstoša cukurniedru lignīna pēc bioloģiskās karboksilēšanas un degradācijas *Lentinus edodes* darbības rezultātā. Arī šķīstošajam lignosulfonātam (LS) piemīt analoģiska iedarbība attiecībā pret cilvēka imunodeficīta vīrusu *in vitro*. LS piemīt imunostimulējoša aktivitāte [172, 206]. Priedes *Pinus parviflora* čiekuru ekstraktiem piemīt pretvēža iedarbība (kunģa vēzis). Japānā tos izmanto vairāk nekā 100 gadus, īpaši *Kyushu* reģionā. Meklējot aktīvo vielu, kas varētu tikt izmantota vēža ķīmijas terapijā, tika parādīts, ka aktīvām pretaudzēju vielām ir lignīna daba [207, 208-209]. Kā pārtikas šķiedras svarīga sastāvdaļa lignīns var inhibēt enzīmus, kas ir saistīti ar superoksīdanjona radikāļa ģenerēšanu, un kavēt vēža šūnu augšanu [210], kā arī novērst ar brīvajiem radikāļiem saistītās slimības, pateicoties spējai tos dezaktivēt. Parādīts, ka lignīnu saturošiem fitomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktiem ir liels potenciāls kā dzīvnieku barības aktīvajai sastāvdaļai, tiem piemīt dažādas bioloģiskās un antioksidatīvas aktivitātes. Fitomasas rūpnieciskā pārstrāde var palielināt lignīna *in situ* sagremojamību. [211-212]. Dažādu industriālo lignīnu pētījumi parādīja, ka tie nekairina ādu

un acis, tiem ir liels potenciāls kosmētikā [213]. Tie uzrāda augstu antioksidatīvo aktivitāti koncentracijās, kuras nav kaitīgas cilvēku normālajām šūnām [214].

Lignīnu molekulas sarežģētības dēļ ir grūti saistīt to antioksidatīvo aktivitāti ar noteiktām struktūras vienībām. Uzskata, ka galvenā loma lignīna redoks-reaktivitātē ir fenola hidroksilgrupām, un tie var darboties līdzīgi citiem fenola antioksidantiem [54, 215-216]. Ūdeņraža atomi, kas nav fenola grupas sastāvā, arī var dot ieguldījumu lignīnu spējā saistīt radikāļus [76, 217-218]. Daži autori parāda, ka oligomēriem un polimēriem fenoliem ir lielāks potenciāls kā antioksidantiem, salīdzinājumā ar monomēriem fenoliem. Piemēram, ir parādīta kondensēto un hidrolizējamo tanīnu augstāka spēja dezaktivēt stabilos brīvos radikāļus, salīdzinot ar monomēriem flavanoīdiem [219-220]. Lai pierādītu, ka par lignīnu dažādām bioloģiskajām aktivitātēm ir atbildīga tieši lignīna polimērā struktūra, tika pārbaudīti tā sintētiskie dehidrogenēšanas polimēri. Šie polimēri uzrādīja lignīniem līdzīgu bioaktivitāti, kamēr neviens no trim monomērajiem fenilpropanoīdiem (*p*-kumarilskābe, ferulskābe, kafijas skābe) šīs aktivitātes neuzrāda [208]. Lignīnam ir raksturīga augstāka termiskā un bioloģiskā stabilitāte, kā arī augstāka noturība pret migrāciju no materiāla izskalošanas vai iztvaikošanas dēļ, salīdzinot ar mazmolekulārajiem savienojumiem, un tas var tikt izmantots tādās jomās, kurās monomolekulāro antioksidantu izmantošana ir neefektīva. Daži flavanoīdi ir raksturoti kā prooksidanti, kas organismā veicina skābekļa aktīvo daļiņu ģenerēšanu. Pretēji, salīdzinoši lielmolekulāras frakcijas no izekstrahētiem augu polifenoliem, saskaņā ar literatūru, neuzrāda prooksidanto efektu [219-222].

Līz šim veiktie lignīna struktūras-aktivitātes pētījumi, neļāva iegūt daudz informācijas, jo nav izstrādāts polimēram lignīnam piemērots antioksidatīvas aktivitātes izteikšanas veids. Pētījumos par izdalīto lignīnu antioksidatīvo aktivitāti ir parādīts, ka liela molekulmasa un paaugstināta molekulmasas izkliede (polidispersitāte M_w/M_n) samazina lignīnu spēju saistīt brīvos radikāļus. Vēl viens faktors, kas ietekmē lignīnu antioksidatīvo aktivitāti, ir izolēto lignīnu heterogenitāte jeb piemaisījumu saturs. Šie piemaisījumi (polisaharīdi, proteīni un citas makromolekulas, atkarībā no lignīna izcelsmes) maina polaritāti un samazina aktīvo fenola hidroksilgrupu koncentrāciju. Ogļhidrātu piemaisījumu polārās grupas var veidot ūdeņraža saites ar lignīnu fenola hidroksilgrupām un tādejādi samazināt to antioksidatīvo aktivitāti [173, 188,]. Viens no paņēmieniem lignīna produktu heterogenitātes samazināšanai ir to frakcionēšana, kas pēdējos gados piesaista arvien lielāku uzmanību. Frakcionēšana ar organiskajiem šķīdinātājiem var ne tikai uzlabot iegūstamo lignīnu tīrību, bet arī sašaurināt molekulārās masas sadalījumu un regulēt polaritāti un tādā veidā veicināt lignīnu izmantošanu par izejvielu antioksidantu ražošanā [173, 223-224].

1.6. Literatūras apskata kopsavilkums

Saistībā ar pieaugošām prasībām pēc tehnisko materiālu un pārtikas produktu kvalitātes un īpašību stabilitātes, kā arī ar nelabvēlīgo apkārtējās vides apstākļu pastiprināšanos, strauji pieaug interese par augu polifenolu antioksidantiem, kuri ir sevišķi svarīgi cilvēka organisma aizsardzībai. Neskatoties uz lielu pētījumu skaitu, kas ir veltīti augu polifenolu antioksidantajām īpašībām, to rezultāti nav savstarpēji izvērtēti, trūkst polimēru un monomēru polifenolu salīdzinājumu. Dažādu pētniecisko institūciju rezultātus ir grūti salīdzināt, jo tie ir iegūti dažādos apstākļos, arī rezultātu izteikšanas veids nav vienots. Apskatīto literatūras avotu vairākumā augu ekstraktu un lielmolekulāro savienojumu antioksidatīvo aktivitāti izsaka uz ekstrakta/lielmolekulāra savienojuma vienu gramu vai izmantojot masas koncentrāciju (IK_{50} gadījumā). Tas dod praktisku priekšstatu par šo preparātu izmantošanas iespējam, bet šis rezultātu izteikšanas veids nav piemērots struktūras-antioksidatīvas aktivitātes pētījumiem. Lai veicinātu augu polifenolu izmantošanu par antioksidantiem, ir jāsakārto to antioksidatīvas aktivitātes noteikšanas metodes. Eksperimentālo pētījumu apvienošana ar teorētiskajiem šķiet ļoti perspektīva struktūras-aktivitātes sakarību noskaidrošanai, bet pašlaik šis paņēmiens augu fenolu analītiskajā ķīmijā ir maz attīstīts. Lielākā daļa pētījumu par augu fenolu izdalīšanu un antioksidatīvajām īpašībām ir veltīti savienojumiem, kurus izdala no augļiem, ogām, dārzeņiem, dažām zālēm, saknēm [103, 138, 207, 225-236]. Ekonomisko, ekoloģisko un citu iemeslu dēļ pieaug interese par antioksidantu iegūšanu no pārtikas rūpniecības un lauksaimniecības blakusproduktiem, piemēram, no rīsu un griķu sēnalām, kartupeļu mizas, citrusaugļu mizas [233-236]. Koksnes mehāniskās un ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu ekstrahēšana ir maz izplatīta, kaut gan tie varētu būt potenciāla izejviela vērtīgu produktu ražošanai [236]. Piemēram, skuju koku atzarojuma vieta kodolkoksnē t.s. zaru "saknes", var saturēt līdz pat 30% polifenolu lignānu. Somijas pētnieki ir izstrādājuši *ChipSep* procesu, kas ļauj atdalīt zarus no celulozes ražošanas plūsmas un veikt to ekstrakciju, lai iegūtu lignānus, īpaši hidroksimatairezinolu, un testējuši to pilotiekārtas mērogā. 2006. gadā *HMRlignan*^{TM} produkts izgāja tirgū. Koku mizā ir koncentrēti dažādi bioloģiski aktīvie fenola savienojumi, tai skaitā diarilheptanoīdi. Polifenolu uzkrāšanās mizā augu evolūcijas rezultātā ir to atbildes reakcija uz dažādiem, tai skaitā oksidatīvajiem stresiem [138, 207, 230-231]. Mizas diarilheptanoīdiem kā dabas antioksidantiem netiek veltīta pietiekoša uzmanība, un to struktūras-aktivitātes sakarības ir neskaidras. Starp diarilheptanoīdiem vislabāk ir raksturota kurkumīna, kuru izdala no *Curcuma longa* (plaši kultivētais augs Āzijas tropiskajās zonās un Centrālajā Amerikā) saknēm un

stublāja, antioksidatīva un bioloģiskās aktivitātes. Ir veikti pētījumi arī par kurkumīna atvasinājumu struktūras - aktivitātes sakarībām.

Lignocelulozes biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusproduktu pamatsastāvdaļa ir polimērais polifenols lignīns. Pašlaik lignīnu antioksidatīva aktivitāte ir labi dokumentēta, tomēr tikpat kā nav informācijas par to struktūras-aktivitātes sakarībām, darbības mehānismiem. Pētījumi par lignīnu antioksidatīvo aktivitāti ir veikti, izmantojot ļoti ierobežotu lignīnu skaitu. Lignīnu heterogenitāte un struktūras dažādība atkarībā no avota, kā arī tās izmaiņas atkarībā no izdalīšanas metodes, nosaka nepieciešamību veikt pētījumus, izmantojot lielu lignīnu paraugu dažādību, ka arī dažādu metožu kombināciju. Lignīna analītiskās ķīmijas attīstība ir saistīta ar hemometrisko metožu ieviešanu un attīstību. Sakarā ar to, dotā darba uzdevumi bija izpētīt radniecīgo mazmolekulāro diarilheptanoīdu un lielmolekulāro lignīnu antioksidatīvas īpašības atkarībā no to struktūras un loģiski izskaidrot struktūras-aktivitātes sakarības, vispusīgi izvērtēt šo savienojumu darbību dažādās sintētiskajās un dabas sistēmās, kas ļautu iegūt no biomasas mehāniskās un ķīmiskās pārstrādes neracionāli izmantojamiem blakusproduktiem efektīvus antioksidantus izmantošanai dažādās jomās.

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Pētījuma objekti

I. Diarilheptanoīdi

No lapkoku mizām iegūtie diarilheptanoīdi: 1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-heptān-3-on-5-O-β-D-ksilopiranozīds (oregonīns) **(46)**; 1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-3-hidroksi-heptān-5-O-β-D-ksilopiranozīds **(72)** un 1,7-bis-(4-hidroksifenil)-heptān-3-on-5-O-β-D-glikopiranozīds (platifilozīds) **(43)**.

Pētījumos ir izmantots arī komerciāli pieejamais diarilheptanoīds kurkumīns (1,7-bis-(-4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadiēn-2,5-dions) **(41)** (hromatogrāfiski tīrs, *EXTRASYNTHESE).*

II. Augu biomasas ķīmiskās pārstrādes blakusprodukti

1) Skuju koku un lapkoku koksnes *kraft* lignīni, kas ir izdalīti no celulozes varīšanas atsārma ar *Inventia AB,* izmantoto *LignoBoost* procesu. Saņemti no *Inventijas AB* (Zviedrija) (10.2009. un 09.2010).

2) Celulozes iegūšanas *kraft* procesā iegūts blakusprodukts no skuju koku un lapkoku koksnes pārstrādes rūpnīcas. Saņemts no *SIA Borregard Lignitech.*

3) Celulozes iegūšanas, izmantojot natron- jeb sārma delignifikāciju, blakusprodukti. Iegūti no lauksaimniecības augiem (abaka (*Musa textilis),* cukurniedres (*Saccharum officiranum),* sisals (*Agave sisalana*), džuta (*Corchorus*), kaņepes (*Cannabis*), lini (*Linum usitatissimum* L.), kviešu (*Triticum*) salmi) eksperimentalās iekārtās Šveicē un papīrfabrikā *Thonon* (Francijā) un saņemti no SIA *Granit* (*Lausanne*, Šveice).

4) Biolignīns^{TM} ir izdalīts no kviešu salmiem, izmantojot etiķskābes-skudrskābes-ūdens maisījumu *CIMV* pilotrūpnīcā (*Pomacle*, Francija).

5) Degvielas etanola ražošanas blakusprodukts. Iegūts *IFP* (*Institute of French Petroleum*) pilotiekārtā (Parīze, Francija) pēc kviešu salmu hidrolīzes, saņemts (03.2009.)

III. Laboratorijā iegūtie lignīni

1) Egles (*Picea Abies*) maltas koksnes lignīns. Izdalīts Koksnes ķīmijas institūtā pēc *Bjorkmana* aprakstītās metodes [159].

2) No melnalkšņa (*Alnus glutinosa)* un oša (*Fraxinus excelsior*) ar sārmu izdalīti laboratorijas lignīni. To iegūšana un raksturojums ir apraktīti talāk.

IV. Pirolīzes lignīni

Iegūti KĶI eksperimentālajā iekārtā. Iekārta sastāv no divām kamerām: 1. - kamera izejas materiāla žāvēšana (180 °C temperatūrā), 2. – ablatīvās pirolīzes kamera (550 °C temperatūrā). Reaktora kapacitāte 150 g izejas materiāla vienā ciklā. Iegūtā pirolīzes eļļa tika sadalīta ūdenī šķīstošajā un ūdenī nešķīstošajā frakcijās. 60 mL pirolīzes eļļas pa pilienam tika pievienota 1 L ledus auksta ūdens, maisot ar 6000 apgr/min izmantojot maisītāju Ultra turrax (*IKA-ULTRATURRAX T 50 basic, Germany*). Eļļas-ūdens attiecība bija vismaz 1:10. Pirolīzes lignīnus (ūdenī nešķīstošā frakcija) mazgāja ar ūdeni un žāvēja vakuumā. Pirolīzes lignīnu iznākums no koksnes 10-12%.

2.2.Aparatūra

- Elektriskā plītiņa *Gerhard*; max temp.=350 °C
- Rotācijas ietvaicētājs *Heidolph Instruments* (1000-0 mbar, ±1 mbar, ±1°C)
- Analītiskie svari *Precisa 262SMA-FR* (± 0,0001g)
- Analītiskie svari - *KERN ALJ* 220-4, Max masa =220 g. d=0,1 mg
- Žāvskapis *FN 400* (± 1°C)
- Vakuumžāvskapis – *Vaciotempt-t*, 0 -760mm/Hg
- Liofilizācijas aparāts *Heto PowerDry PL3000*
- Preparatīvais hromatogrāfs *Biotage SP1*
- Kolona *KP-C18-HS*, 90 Å, daļiņu izmērs 35-70 μm
- Kolonna *Zorbax Eclipse XDB*-C18, daļiņu izmērs 5 μm, 4,6x150 mm
- Autoklāvs; max temp.= 350 °C
- Magnētiskais maisītājs; max apg.•min^{-1}=1500
- Stikla filtrs ar poru izmēru 40 μm,
- Ultra skaņas vanna – *Cole Parmer* 8891, 100 W, 42 KHz ± 6 %
- Infrasarkanais spektrometrs – *PerkinElmer* ATR-FT-IR, 4000 – 450 cm^{-1} d=4 cm^{-1}
- Presforma *PerkinElme*r, diametrs 13 mm
- Automātiskā titrēšanas iekārta – *ABU 901* ar biretes tilpumu 20 mL
- Gāzes hromatogrāfs – *Shimatdzu GC-MS-QP2010*; pirolīzes sistēma F*rontier Lab (Py-2020 iD)* ar automātisko paraugu ievadīšanas ierīci *(AS-1020 E)*
- Kapilāra tipa kolonna (60 m×0,25 mm×0,25 μm) ar fāzi RTX-1701
- *BRUKER EMX* elektronu paramagnētiskās rezonanses (*EPR*) spectrometrs

- *Bruker Avance* 400, *Bruker Avance* 300 MHz
- *UV/VIS* spektrometrs (*PerkinElmer Lambda* 25 UV/VIS (±0,0001 nm)
- FLUOstar Omega mikroplašu lasītājs (*BMG LABTECH*), Germany
- *ML OXIPRES* (*Mikrolab Aarhus*) aparāts ar divām mērīšanas šūnām
- Termogravimetrijas aparāts *Metter Toledo TGA/SDTA* 851 maks. t. 1000 °C
- *Metter Toledo TGA/DTA* 851 termiskās analīzes iekārta; *Metler Toledo Star^e DSC* 823^e termiskās analīzes iekārta
- Šķidruma hromatogrāfs (*HPLC*) *Agilent* 1100 ar UV-DAD un RI detektoriem
- *Econofilter Syringe Filras* filtrs (*Agilent Technologies*) ar 0,2 μm porām
- *GPS/SEC* kolonna 300×7,50 mm
- Automātiskais paraugu kratītājs *Labquake Tube Shaker*
- *Ceizela* iekārta (laboratorijā konstruēta stikla iekārta)

2.3.Reaģenti

- Heksāns (blīvums ~0,66 kg•L^{-1}), CAS Number: 2493-44-9
- Etilacetāts (blīvums 0,90 kg•L^{-1}), CAS Number: 141-78-6
- Ledus etiķskābe, CH_3COOH, CAS Number: 64-19-7, 99,5%
- Jodūdeņražskābe, HI, *Acōrs organic* CAS No: 10034-85-2, 57 %
- Etanols, CAS Number:64-17-5, 96%
- Metanols (*HPLC gradient grade*), CAS Number: 67-56-1; 99,5%
- Nātrija borhidrīds, $NaBH_4$, CAS Number:16940-66-2; 99,9%
- C18-HS sorbents 90 Å, daļiņu izmērs 35-70 μm
- Natrija hidroksīds NaOH, CAS No: 1310-73-2, 99,9
- Sērskābe H_2SO_4 *Sigma Aldrich*, CAS No: 7664-93-9, 95-98%
- Sālsskābe HCl CAS No: 7647-01-0, 37%
- Dihlormetāns CH_2Cl_2 *Lach-Ner;*CAS:75-09-2
- n-Propanols C_3H_7OH (*HPLC grade*), *Sigma Aldrich*, CAS No: 71-23-8; 99,9%
- Fosfora pentoksīds P_2O_5 *Lach-ner*, CAS No:1314-56-3
- Kālija bromīds, KBr (*FT-IR grade*) *Sigma-Aldrich*, CAS No: 7758-02-3, ≥99,%
- Fenols C_6H_5OH, *Acōrs organic*, CAS No: 108-95-2, 99 %
- Etiķskābes anhidrīds $(CH_3CO)_2O$, *Lach-Ner*, CAS No: 108-24-7, 99,5%
- Kālija jodīds KI, *Sigma-Aldrich*, CAS No: 7681-11-0, ≥99,0%

- Acetons (C_3H_6O), *Lach-Ner*, CAS No: 8006-64-2, 99,5%
- Sarkanā fosfora suspensija ūdenī 1%, CAS No: 7723-14-0;
- Nātrija tiosulfāts $Na_2S_2O_3$ 0,1 M šķīdums, *Sigma Aldrich*, CAS No: 7772-98-7
- Broms Br_2, *Sigma-Aldrich*, CAS: 64-19-7, 99,99%
- Nātrija acetāts CH_3COONa, *Sigma-Aldrich*, CAS No: 64-19-7, ≥99,7%
- Slāpeklis N_2, 99,99%
- Skudrskābe HCOOH, *Sigma-Aldrich*, CAS: 64-18-6, ≥ 96,0%
- Piridīns C_6H_5N, *Sigma Aldrich*, CAS No 110-86-1, 99,9%
- Hēlijs (nesējgāze), 99,99999%
- Šķidrais slāpeklis N_2
- Dimetilsulfoksīds DMSO $(CH_3)_2SO$, *Sigma Aldrich*, CAS No: 67-68-5, 99,9%
- ABTS 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskābes diamonija sāls $C18H_{24}N_6O_6S_4$,; M=548,7 g•mol^{-1} Sigma Aldrich, CAS No: 30931-67-0; ≈ 98%
- Kālija dihidrogēnfosfāts KH_2PO_4, ≥ 99,0%, *Sigma Aldrich*, CAS: 7778-77-0;
- Nātrija hidrogēnfosfāts kristālhidrāts $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ >99,0%, *Sigma Aldrich*, CAS: 10039-32-4
- Kalija hlorīds, KCl ≥ 99,0%, *Sigma Aldrich*, CAS No: 7447-40-7
- Kālija persulfāts $K_2S_2O_8$ ≥ 99,0%, *Sigma Aldrich*, CAS No: 7727-21-1
- DFPH 2,2-difenil-1-pikrilhidrazils ≈90%, M=394,32 g•mol^{-1}, *Sigma-Aldrich*, CAS:1898-66-4
- Etilēndinitrotetraetiķskābe, EDTA ~99%, *Sigma-Aldrich*, CAS:60-00-4
- Nātrija karbonāts kristālhidrāts $Na_2CO_3 \times 10H_2O$, ≥ 99,5%, *Sigma-Aldrich*, CAS: 6132-02-1
- Nātrija hidrogēnkarbonāts $NaHCO_3$, *Sigma-Aldrich*, CAS: 144-55-8
- Hipoksantīns ≥99%, $C_5H_4N_4O$, *Sigma-Aldrich*, CAS: 68-94-0
- Nitrozilie tetrazolija sāļi, NBT, *Sigma-Aldrich*, CAS: 298-83-9
- Ksantīnoksidāze, *Sigma-Aldrich*, CAS: 9002-17-9
- Fluoresceīns, *Sigma-Aldrich*, CAS: 2321-07-5
- 2, 2'-azobis(2-amidino-propān) dihidrohlorīds, AAPH, $C_8H_{18}N_6 \cdot 2HCl$ CAS No: 2997-92-4
- Nātrija hlorīds, NaCl ≥99,0%, *Sigma-Aldrich*, CAS No: 7647-14-5
- Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksiskābe) $C_{14}H_{18}O_4$ >98% (HPLC); *Fluka*, CAS: 53188-07-1

- *TBHQ* (*tert*-butilhidrohinons), $(CH_3)_3CC_6H_3$-1,4-$(OH)_2$, ≥ 97%, *Sigma-Aldrich*, CAS No: 1948-33-0
- Rapšu eļļa (nerafinēta, bez antioksidantu piedevas)
- Skābeklis O_2 ≥99,0%
- PEG-400 (polietilēnglikols ar MW 400 g mol^{-1}), *ROTH, Art*.-Nr. 0144.1
- PMDI (komerciāls polimērais difenilmetānadiizocianāts *Voratec SD 100* ar izocionata grupu (NCO) saturu 31%)
- Alvas dibutillaurāts $(C_4H_9)_2Sn(C_{11}H_{23}COO)_2$, tīrība: 95 % Cas No: 77-58-7
- Tetrahidrofurāns (THF), 99,5% Extra Dry, *Acōrs organic*, CAS No: 109-99-9;
- P_2O_5, *Lach-ner*, CAS No:1314-56-3

2.4. Diarilheptanoīdu izdalīšana no mizām

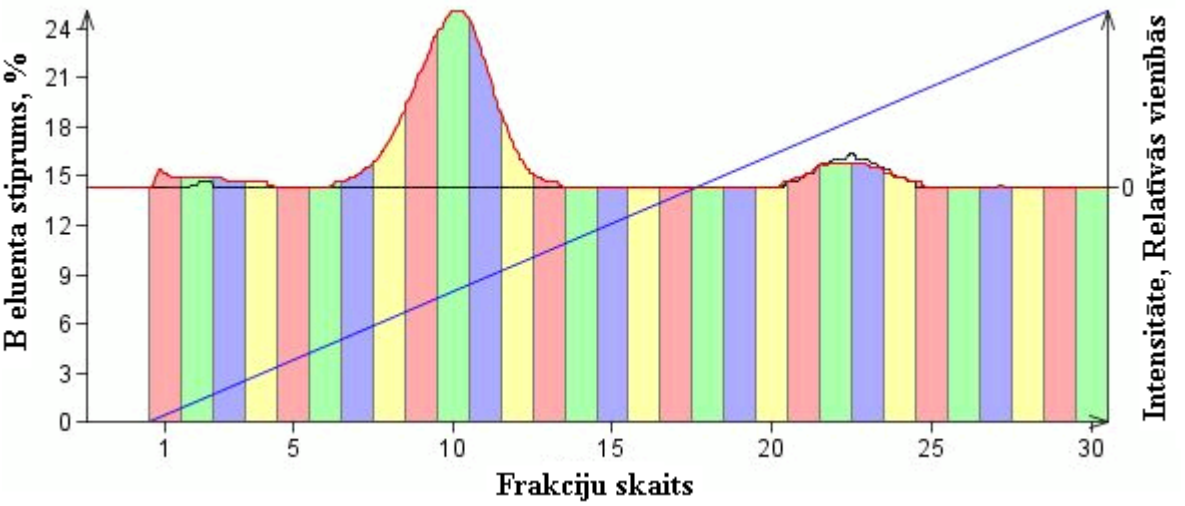
2.4.1. Etilacetāta ekstrakta iegūšana

Diarilheptanoīdu izdalīšanai izmantoja Latvijas lapkoku mizu. Baltalkšņa (*Alnus incana*) mizas ir iegūtas no Latvijā, Ogres novadā, Ogresgala mežos augošiem apmēram 30 gadus veciem alkšņiem un ievāktas 2010. gada 5. – 9. augustā. Bērza (*Betula pendula*) mizas iegūtas no Daugavpils rajonā augošiem apmēram 30 gadus veciem bērziem un ievāktas 2010. gada 6. jūnijā. Mizas žāvēja istabas temperatūrā, samala ar *IKA MF 10* dzirnavām un izsijāja ar kombinēto sieta sistēmu caur 0,5 mm sietu. Sagatavotās mizas mitrums 8 ± 1 %.

Mizu ekstrakcijas veica, izmantojot šķīdinātājus ar pieaugošu polaritāti: heksānu – etilacetātu – etanolu. Soksleta aparāts sastāvēja no kolbas (500 mL), ekstraktora (200 mL) un dzesinātāja. Parauga (~5 g) ekstrakcija ilga 6-8 stundas. Ekstraktu ietvaicēja, izmantojot rotācijas ietvaicētāju. Ūdens vannas temperatūra bija 40 °C, spiediens atkarīgs no atdestilējamā šķīdinātāja viršanas temperatūras. Sausa ekstrakta iegūšanai veica liofilizāciju. Iegūto mizas ekstraktu izšķīdināja 5 mL metanola vai etanola, tad pievienoja 15 mL destilēta ūdens. Iegūto suspensiju ietvaicēja rotācijas ietvaicētājā (temperatūra 40 °C, spiediens 130-50 mbar) līdz pilnīgai spirta atdestilēšanai. Ekstrakta suspensiju ūdenī sasaldēja zemā temperatūrā (-30 °C), vienmērīgi maisot, līdz viss maisījums bija viendabīgi izklājies gar apaļkolbas sieniņām. Kolbu ar sasaldēto maisījumu pievienoja liofilizācijas aparātam. Pēc apmēram 24 stundām liofilizācijas aparātā ekstrakts bija iegūts cietā agregātstāvoklī.

2.4.2. Oregonīna izdalīšana no baltalkšņa mizas etilacetāta ekstrakta

Pagatavoja 2-2,5% baltalkšņa mizas etilacetāta ekstrakta šķīdumu, kā šķīdinātāju izmantoja 40% etanola šķīdumu. Etilacetāta ekstrakta šķīdumam veica preparatīvo hromatogrāfiju, izmantojot gradientu 0-25%, absorbciju mērīja pie 280 un 315 nm. Kā eluentu A preparatīvajai hromatogrāfijai izmantoja 20% C_2H_5OH + 1% CH_3COOH šķīdumu, eluents B bija 96% C_2H_5OH. 2.1. attēlā dota baltalkšņa mizas etilacetāta ekstrakta preparatīvās hromatogrāfijas hromatogramma, 2.2. attēlā redzama 3. frakcijas preparatīvā hromatogramma, kurā dominējošais savienojums ir oregonīns **(46)**.

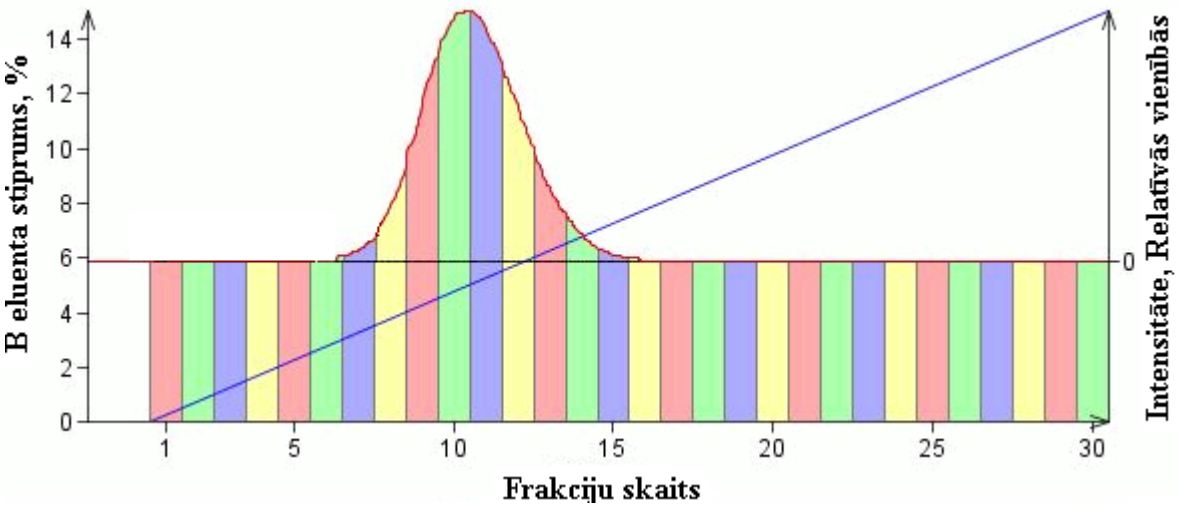


2.1. att. **Preparatīvā hromatogramma baltalkšņu mizas etilacetāta ekstraktam.**

Viena frakcijas vienība ir 15mL, eluents A = 20% C_2H_5OH un 1% CH_3COOH ūdens šķīdums, eluents B = 96% C_2H_5OH, detektēšana 280 nm

Lai iegūtu oregonīnu **(46)** ar tīrības pakāpi lielāku par 95%, frakcijas, kuras satur visvairāk oregonīna **(46),** atkārtoti attīrīja ar preparatīvo hromatogrāfiju.

Oregonīnu **(46)** pierādīja un tā saturu noteica, izmantojot *UV, MS, HPLC, FTIR* un *PMR* metodes, kā aprakstīts [237-238]. UV λ_{max} (CH_3OH) 224, 281 nm. *FTIR* ν_{max}, cm^{-1}: 1700 (C=O), 1606, 1518 (aromātiskais gredzens). ES^-: m/z 477 $[M-H]^-$; ES^+: m/z 501 ($[M+Na]^+$), 329. *PMR* dati ir aprakstīti [239].

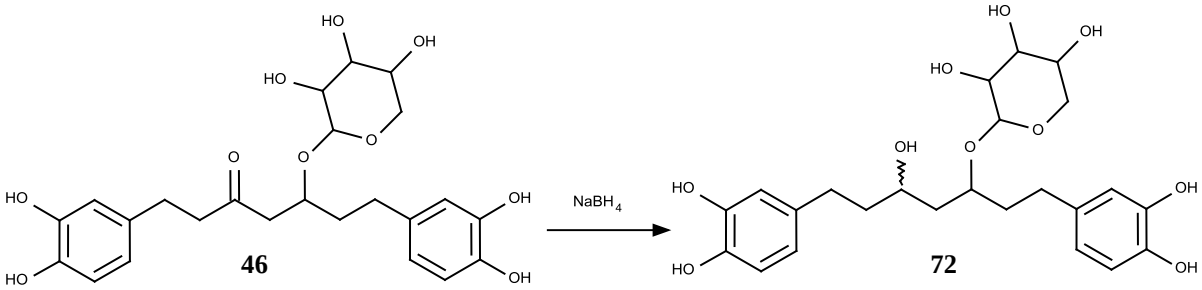


2.2. att. **Preparatīvā hromatogramma baltalkšņu mizas etilacetāta ekstrakta 3. frakcijai.**

Viena frakcijas vienība ir 15mL, Eluents A = 20% C_2H_5OH un 1% CH_3COOH ūdens šķīdums, eluents B = 96% C_2H_5OH, detektēšana - pie 280 nm

2.4.3. Hidroksioregonīna iegūšana

Struktūras-antioksidatīvas aktivitātes pētīšanai oregonīna **(46)** karbonilgrupas reducēja ar nātrija borhidrīdu.

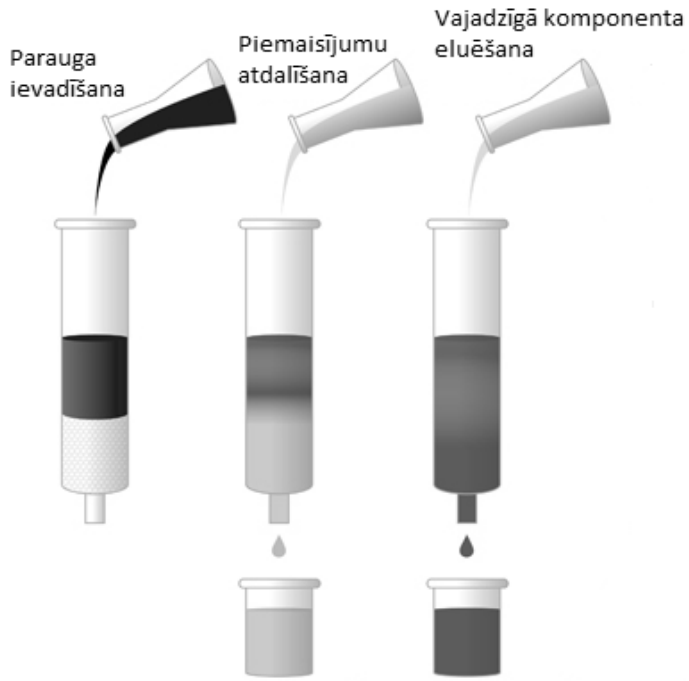


2.3. att. **Oregonīna (46) karbonilgrupas reducēšana**

72 - hidroksioregonīns

Uz analītiskajiem svariem nosvēra 1g reducējamā diarilheptanoīda, izšķīdināja to ~ 20 mL metanola. Ar magnētisko maisītāju iegūto šķīdumu maisīja līdz visa ekstrakta izšķīšanai. Nosvēra 0,5g nātrija borhidrīda, to iebēra iegūtajā šķīdumā un maisīja ar magnētisko maisītāju istabas temperatūrā ~ 1 stundu. Pēc tam reakcijas maisījumā ielēja 50 mL destilēta ūdens, nedaudz paskābināja ar koncentrētu etiķskābi un atšķaidīja ar destilētu ūdeni līdz 200 mL. Iegūtā reducētā parauga attīrīšanai izmantoja ar C18-HS sorbentu 90 Å pildītu kolonnu, daļiņu

izmērs 35-70 μm. 15 cm garā stikla kolonnā ievietoja vati un piepildīja ar C18-HS sorbentu, raugoties, lai neizveidojas gaisa burbuļi. Sorbenta slāņa augstums 10 cm. Iegūto reducēto ekstraktu attīrīja eluējot caur šo kolonnu. Analizējamais savienojums – 1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-heptān-3-ols-5-O-ksilopiranozīds **(72)** vai saīsināti hidroksioregonīns **(72)** - attīrīšanas laikā adsorbējās uz sorbenta un kolonnā ir redzams kā brūnganas krāsas josla. Attīrīšanu no piemaisījumiem kontrolēja, izmantojot *UV/VIS* spektrometru. Eluēja, kamēr absorbcija pie 280 nm vairs nemainījās un bija tuvu bāzes līnijai. Kad visi piemaisījumi bija izmazgāti, hidroksioregonīnu eluēja ar tīru etilspirtu. Attīrīšanas gaita parādīta 2.4. attēlā.



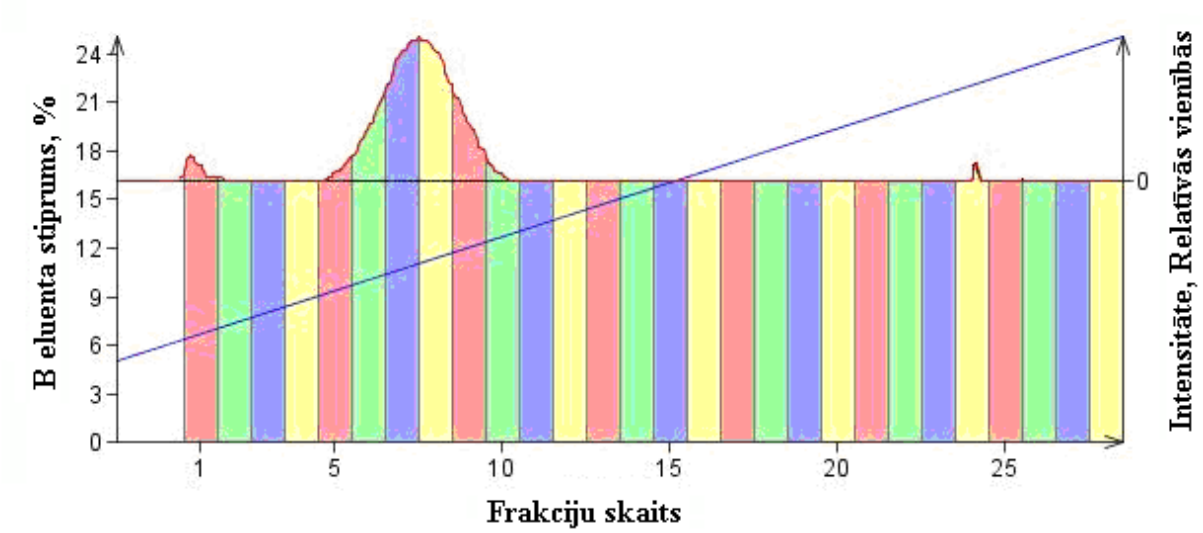
2.4.att. **Hidroksioregonīna (72) attīrīšana**

Pēc attīrīšanas ar C18-HS kolonnu, hidroksioregonīnu **(72)** papildus attīrīja, izmantojot preparatīvo hromatogrāfiju. Pagatavoja 2-2,5% šķīdumu, kā šķīdinātāju izmantoja 40% etanola šķīdumu. Veica preparatīvo hromatogrāfiju, izmantojot gradientu 0-15%; absorbciju mērīja pie 280 un 315 nm. Kā eluentu A izmantoja 20% C_2H_5OH + 1% CH_3COOH šķīdumu, eluents B bija 96% C_2H_5OH. Ieguva hidroksioregonīnu ar tīrības pakāpi ap 90%.

Hidroksioregonīnu **(72)** pierādīja un tā saturu noteica, izmantojot *UV, MS, HPLC, FTIR* un *PMR* metodes, kā aprakstīts [237-238]. λ_{max} (CH_3OH) 282 nm. ES^-: m/z 479 $[M-H]^-$.

2.4.4. Platifilozīda izdalīšana no bērza mizas etilacetāta ekstrakta

Pagatavoja 2-2,5% bērza mizas etilacetāta ekstrakta šķīdumu, kā šķīdinātāju izmantoja 40% etanola šķīdumu. Bērza mizas etilacetāta ekstrakta šķīdumam veica preparatīvo hromatogrāfiju, izmantojot gradientu 5-25%. Absorbciju mērīja pie 280 un 315 nm. Kā eluentu A izmantoja 20% C_2H_5OH + 1% CH_3COOH šķīdumu, eluents B bija 96% C_2H_5OH. Ieguva platofilozīdu **(43)** ar tīrības pakāpi ap 90%.



2.5. att. **Bērza (*Betula pendula*) mizas etilacetāta ekstrakta preparatīvā hromatogramma.**

Viena frakcijas vienība ir 15 mL , eluents A = 20% C_2H_5OH un 1% CH_3COOH ūdens šķīdums, eluents B = 96% C_2H_5OH, detektēšana 280nm; λ_{max} (CH_3OH) 281 nm. ES^-: m/z 475 $(M-H)^-$, 295. *PMR* dati ir aprakstīti [122].

2.5. Tehnisko lignīnu izdalīšanas, attīrīšanas un frakcionēšanas metodes

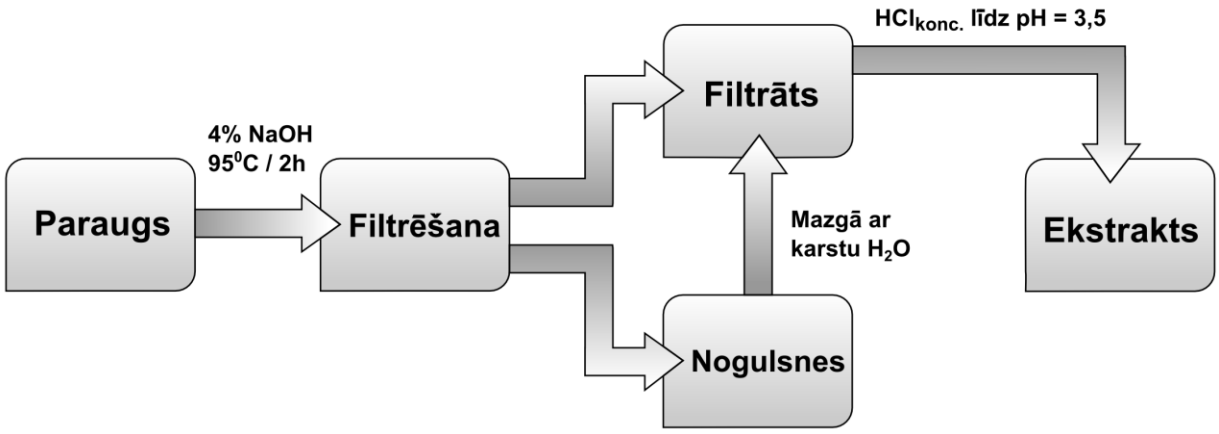
2.5.1. Sārma lignīnu izdalīšana no melnalkšņa un oša koksnes

Sārma lignīna preparātu ieguva, vārot skaidas autoklāvā 160 °C temperatūrā 3 stundas. Skaidu un 5% NaOH attiecība bija 1:10. Autoklāva tilpums 1 litrs. Skaidu daudzums 70 g. NaOH šķīduma tilpums 700 mL. Atfiltrēja celulozi, atmazgāja līdz pH 7. Filtrātu paskābināja līdz pH 2 ar koncentrētu sērskābi, kas atšķaidīta ar ūdeni attiecībā 1:1. Paskābināto filtrātu sildīja ar atteces dzesētāju ūdens vannā 2,5 stundas. Lignīnu nofiltrēja un skaloja ar karstu ūdeni kamēr SO_4^{2-} joni vairs nav detektējami. Iegūto lignīnu žāvēja vakuumžāvskapī 40°C temperatūrā.

Melnalkšņa sārma lignīna iznākums ap 20% (no sausas koksnes, mitrums < 1%). Oša sārma lignīna iznākums 20,50% (no sausas koksnes, mitrums < 1%).

2.5.2. Lignīna izdalīšana no etanola ražošanas blakusproduktiem

No kviešu salmiem etanola (degvielas) ražošanas procesā iegūtajam blakusproduktam ir liels ogļhidrātu saturs. Lignīna attīrīšanai izmantoja 2.6. attēlā parādīto shēmu.



2.6. att. **Lignīna izdalīšana no degvielas etanola ražošanas blakusproduktiem**

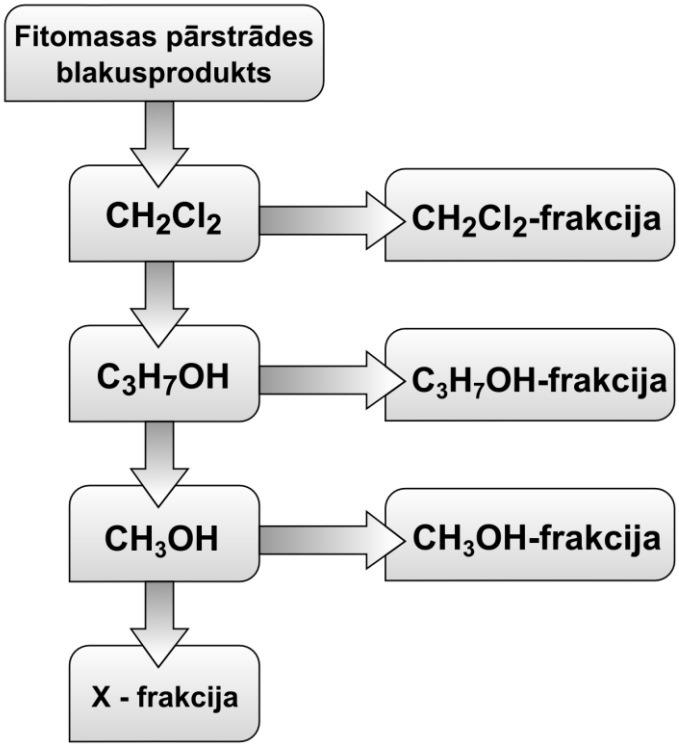
Apmēram 7,5 gramus (pārrēķinot uz sausu masu, mitrums < 1%) lignīna saturoša parauga ievietoja 250 mL koniskajā kolbā un pievienoja 50 mL 4% NaOH šķīduma. Paraugu divas stundas sildīja uz elektriskās plītiņas 95 °C temperatūrā, atdzesēja līdz istabas temperatūrai, pēc tam filtrēja caur iepriekš izžāvētu un nosvērtu stikla filtru ar poru izmēru 40 μm. Nogulsnes skaloja ar nelielu daudzumu ūdens, līdz filtrāts kļuva gaiši brūns, abus filtrātus apvienoja, pārlēja 300 mL vārglāzē. Pievienoja koncentrētu HCl, sākumā lielākas devas un pēc tam pa pilienam, līdz pH sasniedza 3,5 (ekstrakts izkrita nogulsnēs). Pēc 2-3 stundām iegūtās nogulsnes filtrēja caur stikla filtru un-skaloja ar destilēto ūdeni līdz neitrālai reakcijai. Iegūtās nogulsne žāvēja vakuumžāvskapī līdz konstantai masai, kā desikantu lietojot P_2O_5. Katram paraugam veica 2 paralēlas ekstrakcijas.

Sārma ekstrakta iznākums: 34,5 ± 0,1 % (no izejas masas, mitrums < 1%).

2.5.3. Lignīnu saturošo blakusproduktu frakcionēšana ar organiskajiem šķīdinātājiem

Lai samazinātu produktu heterogenitāti, polidispersitāti, atdalītu nešķīstošās frakcijas, izmantoja ekstrakciju ar organiskajiem šķīdinātājiem ar pieaugošu polaritāti: dihlormetāns, (Hansena šķīdības parametri δ_d = 18,2 $MPa^{½}$, δ_P = 6,3 $MPa^{½}$ un δ_H =6,1 $MPa^{½}$), n-propanols (24,6; 6,8 un 17,4 $MPa^{½}$, attiecīgi) un metanols (29,6; 12,3 un 22,3 $MPa^{½}$, attiecīgi) [240].

Lignīnu saturošos blakusproduktus, kurus iegūst pēc celulozes iegūšanas pēc *kraft* un *LignoBoost kraft* procesiem, frakcionēja pēc 2.7.attēlā redzamās ekstrakcijas shēmas.



2.7. att. **Tehnisko lignīnu frakcionēšana ar organiskajiem šķīdinātājiem**

Apmēram 10 gramus lignīna (pārrēķinot uz sausu masu, mitrums < 1%) ievietoja 250 mL vārglāzē un pievienoja 40 mL dihlormetāna (CH_2Cl_2). Lignīnam ļāva uzbriest (apmēram 1 stundu), pēc tam maisījumu 15 minūtes apstrādāja ultraskaņas vannā. Paraugu filtrēja caur iepriekš izžāvētu un nosvērtu stikla filtru ar poru izmēru 100 µm un ekstraktu savāca apaļkolbā. Nogulsnes atkārtoti apstrādāja ar 40 mL dihlormetāna, nofiltrēja un ekstraktus apvienoja. Procedūru atkārtoja 4-5 reizes, līdz ieguva ļoti gaišu ekstraktu, uzskatot, ka visa dotajā šķīdinātājā šķīstošā lignīna daļa ir atdalīta no nogulsnēm. Iegūtās nogulsnes žāvēja līdz konstantam svaram vakuumžāvskapī, kā desikantu izmantojot P_2O_5, pēc ekstrahēja ar nākošo šķīdinātāju – propanolu (C_3H_7OH) tieši tāpat, kā aprakstīts iepriekš, frakcionējot ar dihlormetānu. Pēc otrās ekstrakcijas palikušās nogulsnes ekstrahēja ar metanolu (CH_3OH), kā aprakstīts iepriekš [223]. Pēc katras ekstrakcijas iegūtos apvienotos ekstraktus pie pazemināta spiediena iztvaicēja rotācijas ietvaicētājā, tad žāvēja vakuumžāvskapī līdz konstantai masai. Katram paraugam veica 2 paralēlas ekstrakcijas.

2.1. tabula

***Kraft* un sārma lignīnu frakciju (F) iznākumi ar standartnovirzēm %; (mitrums < 1%)**

Paraugs	F-CH_2Cl_2	F-C_3H_7OH	F-CH_3OH	F-X
Skuju koku *Kraft Lignoboost* lignīns	9,5 ± 0,3	11,3 ± 0,4	12,9 ± 0,5	66,3 ± 0,9
Lapkoku *Kraft Lignoboost* lignīns	23,2 ± 0,5	48,3 ± 0,6	9,2 ± 0,5	19,3 ±0,2
Skuju koku *Kraft* lignīns (izdalīts tradicionali)	0,20 ± 0,05	0,30 ± 0,05	32,7 ± 0,9	66,5 ± 0,7
Melnalkšņa sārma lignīns	20,0 ± 0,8	21,5 ± 0,8	20,5 ± 0,7	37,9 ± 0,7
Oša sārma lignīns	34,9± 0,8	21,5± 0,7	18,9± 0,9	24,1± 0,6
Abakas sārma lignīns	25,7 ± 0,6	38,0 ± 0,4	21,0 ± 0,4	15,3 ± 0,3
Linu sārma lignīns	26,1 ± 0,3	24,1 ± 0,6	17,0 ± 0,7	32,8 ± 0,6

Biolignina^{TM} (blakusprodukts, kas ir iegūts celulozes un etanola ražošanā izmantojot organiskos šķīdinātājus) frakcionēšanai tika izmantota analoga metode, tikai ar citiem šķīdinātājiem: dihlormetāns, metanols un dihlormetāna - metanola maisījums (3:4). Iegūto frakciju iznākumi doti 2.2. tabulā.

2.2. tabula

***Biolignina*^{TM} frakciju (F) iznākumi % ar standartnovirzēm; mitrums < 1%**

F-CH_2Cl_2	F-CH_3OH	F -CH_2Cl_2/CH_3OH	F-X (nešķīstošā
7,4 ± 0,2	14,5 ± 0,2	18,2 ± 0,5	59,9 ± 0,5

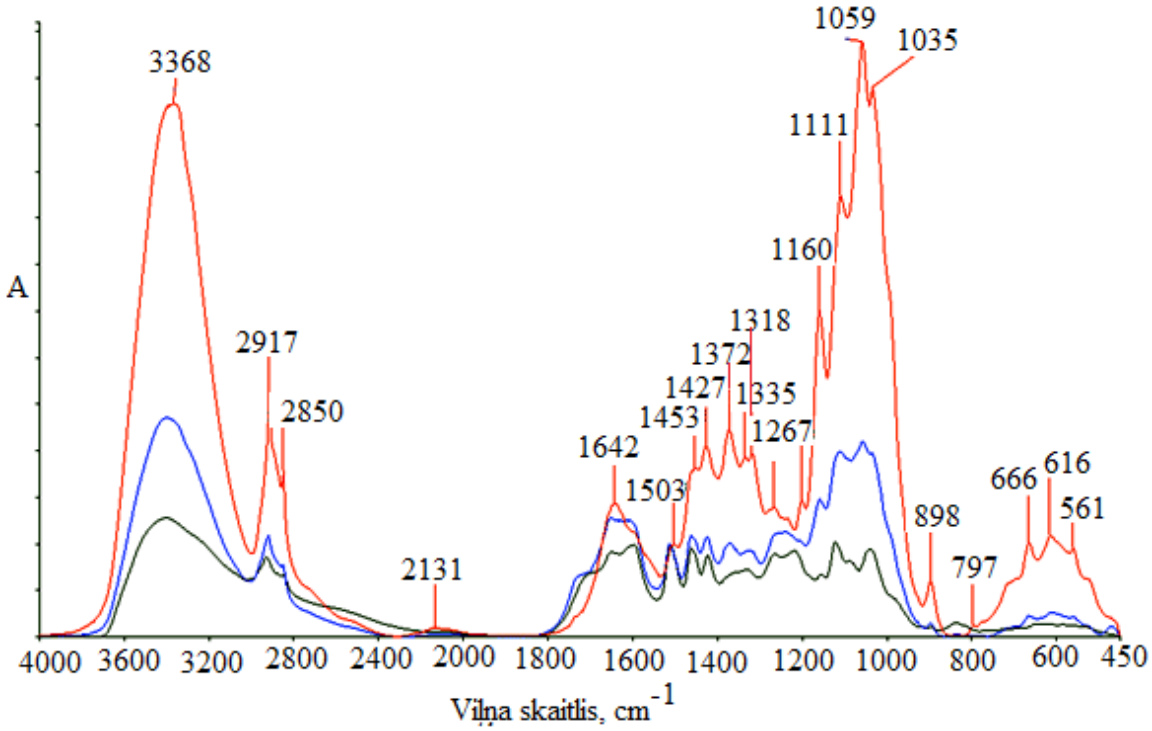
2.6. Tehnisko lignīnu struktūras analīze

Visus pētāmos paraugus pirms analīzēm homogenizēja un žāvēja vakuumā 40 °C temperatūrā, līdz mitruma saturs paraugā bija < 1%. Paraugiem noteica pelnu saturu (700 ^{o}C, 3 stundas) un visu analīžu rezultātu aprēķināšanai izmantoja paraugu masu bez pelniem.

2.6.1. *FTIR* spektroskopija

FTIR spektrus uzņēma ar *PerkinElmer Spectrum One FTIR* spektrometru istabas temperatūrā. Vispirms uzņēma fonu spektru, lai rezultējošā spektrā neparādītos atmosfēras CO_2 un ūdens tvaika absorbcijas joslas. Spektru uzņemšanai izmantoja KBr tabletēšanas tehniku. Nosvēra 1 - 1,5 mg sausa (mitrums < 1%) un homogenizēta pētāmā parauga un

pievienoja ~ 180-200 mg kālija bromīda, rūpīgi samaisīja un sasmalcināja piestā. Iegūto viendabīgo maisījumu ievietoja presformā ar diametru 13 mm un presēja ar hidraulisko presi (slodze 10 tonnas uz cm^2). Iegūtajai tabletei uzņēma *FTIR* spektru (izšķiršana 4 cm^{-1}, skenēšanu skaits: 64). Bāzes līnijas korekcijai izmantoja datorprogrammu *Spectrum v5.0.1.* Iegūtos spektrus normalizēja pret smaili 1514 cm^{-1} (lignīna aromātiskā gredzena svārstības), vai arī pret lielāko smaili. Mērījumus atkārtoja 3 reizes. Iegūto spektru piemērs dots 2.8. attēlā.



2.8. att. **Etanola (degvielas) ražošanā no kviešu salmiem iegūtais produkts (zilā krāsā), tā sārma ekstrakts (melnā krāsā), sārmā nešķīstošā frakcija (sarkanā)**

2.6.2. Metoksilgrupu satura noteikšana

Analīzei izmantoja *Ceizela-Fibeka-Švappaha* metodi, kas ir modificēta KĶI Lignīna ķīmijas laboratorijā [160]. Metodes būtība: apstrādājot organisko savienojumu, kas satur metoksilgrupas, notiek kvantitatīva reakcija (vienādojums 2.1.):

$$R\text{-}OCH_3 + HJ \rightarrow R\text{-}OH + CH_3J \qquad (2.1.)$$

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

$$CH_3J + Br_2 \rightarrow CH_3Br + JBr \qquad (2.2.)$$

Vienlaicīgi broma pārākums oksidē joda bromīdu (vienādojums 2.3.):

$$JBr + 2Br_2 + 3H_2O \rightarrow HJO_3 + 5HBr \qquad (2.3.)$$

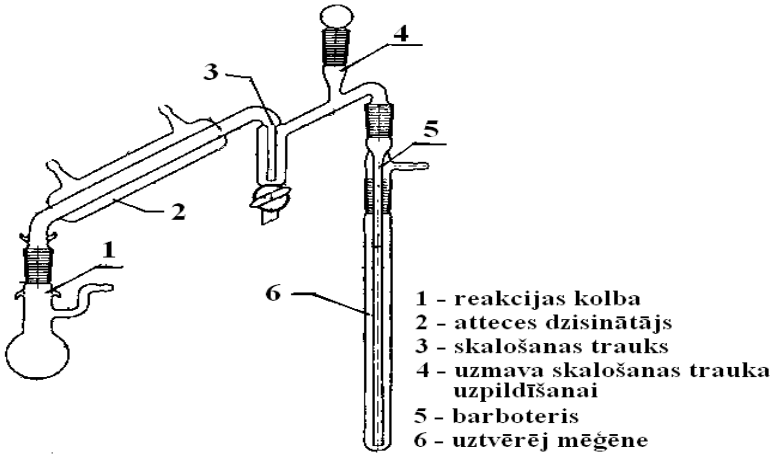
Šim šķīdumam pievienojot kālija jodīda un sērskābes pārākumu, izdalās brīvs jods vienādojums 2.4):

$$HJO_3 + 5HJ \rightarrow 3J_2 + 3H_2O \qquad (2.4.)$$

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

$$3J_2 + 6Na_2S_2O_3 \rightarrow 6NaJ + 3Na_2S_4O_6 \qquad (2.5.)$$

Analīzi veica 2.9. attēlā redzamajā iekārtā.



2.9. att. **Iekārta metoksilgrupu noteikšanai**

Reakcijas kolbiņā iesvēra ~ 40 mg analizējamā parauga ar precizitāti 0,1 mg. Kolbiņā 1 pievienoja ~ 0,5 g fenola, 6 pilienus etiķskābes anhidrīda un 3 mL 57% jodūdeņražskābes šķīduma. Skalotni līdz pusei piepildīja ar sarkanā fosfora suspensiju ūdenī. Uztvērējmēģenē caur piltuvīti ielēja 15 mL broma šķīduma, ievietoja barbotieri un pievienoja aparātam. Uztvērējmēģeni caur novadu savienoja ar skalotni, kurā bija 10% HCOOH šķīdums. Reakcijas kolbiņu savienoja ar N_2 balonu un izturēja 30 minūtes termoregulējamā vannā 140 °C temperatūrā, vienlaicīgi sekojot vienmērīgai N_2 plūsmai.

Uztvērējšķīdumu kvantitatīvi ieskaloja 250 mL Erlenmeijera kolbā ar pieslīpētu aizbāzni, kurā iepriekš bija ielieti 25 mL 20% CH_3COONa. Enerģiski saskalojot, sarkanbrūnajam šķīdumam no biretes pievienoja 4 % HCOOH, uzreiz 4 mL, pēc tam pa

pilienam līdz šķīdums atkrāsojās. Pēc tam piepilināja 2 pilienus metilsarkanā šķīduma un novēroja krāsa izmaiņu. Kad viss broma pārākums bija sadalīts, kolbā pievienoja 20 mL 10% H_2SO_4 un 5 ml 10% KI, kolbu noslēdza ar aizbāzni un atstāja stāvēt 5 minūtes. Izdalīto jodu titrēja ar 0,05 M $Na_2S_2O_3$ līdz gaiši oranžai nokrāsai, tad pielika 2 mL cietes šķīduma un, intensīvi skalojot, pabeidza titrēšanu.

Analīzi atkārto trīs reizes.

Metoksilgrupu saturu aprēķinaja pēc vienādojuma (2.6.);

$$W(OCH_3) = \frac{v \cdot f \cdot 0{,}5172}{G_w(1-\frac{W_r}{100})} \cdot 100\% \qquad (2.6.)$$

$W(OCH_3)$ – metoksilgrupu saturs

v– titrēšanā patērētais 0,05 M $Na_2S_2O_3$ tilpums, mL;

f– 0,05 M $Na_2S_2O_3$ koncentrācijas korekcijasfaktors

0,5172– OCH_3 masa, kas atbilst 1 mL 0,05 M $Na_2S_2O_3$, mg

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

W_r– parauga relatīvais mitrums, %.

2.6.3. Hidroksilgrupu satura noteikšana

-OH_{fenola} un -OH_{COOH} noteikšanai izmantoja konduktometrisko titrēšanu. Lignīnā sastopamo skābo funkcionālo grupu (skābo -OH_{COOH} un fenola -OH_{fenola}) kvantitatīvai analīzei bieži izmanto "skābes – bāzes" konduktometriskās titrēšanas metodi. Ievadot titrējamā vidē sārmu (tiešā titrēšana), skābo grupu jonizācijas pakāpe pieaug, un līdz ar to sistēmā pieaug summārā elektrovadītspēja. Šādu sistēmu titrējot ar skābi, notiek pretējais (apgrieztā titrēšana), un atbilstoši skābumam titrējas vispirms vājākās skābās -OH_{fenola}, pēc tam skābākās -OH_{COOH} grupas.

50 mg lignīna preparāta iesvēra pudelītē (10 mL), kurā bija iepildīts slāpeklis, un aplēja ar 5 mL 0,1 M nātrija hidroksīda šķīduma. Pēc 24 stundām pudelītes saturu kvantitatīvi ar destilētu ūdeni ieskaloja titrējamā glāzītē, ievietoja tajā konduktometrisko šūnu (elektrodus) un titrēja ar 0,1 M HCl šķīdumu līdz ~ 6 mL tilpumam. Titrēšanu vadīja un fiksēja datorizētā režīmā.

Aprēķinus veica pēc formulām (2.7.) un (2.8.).

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

$$OH_{fen} = \frac{b \cdot 1,7}{A} \cdot 100\% \quad (2.8.)$$

OH_{COOH} - karboksigrupu saturs paraugā, %;

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

a,b - patērētais titranta tilpums, mL;

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

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

Katru analīzi atkārtoja 3 reizes.

Kopējo -OH grupu noteikšana ar acetilēšanas metodi. Lai noteiktu kopējo OH grupu saturu lignīnā, bieži izmanto acetilēšanu ar etiķskābes anhidrīda un piridīna maisījumu (vienādojumi 2.9. – 2.12.);

$$R–OH + (CH_3CO)_2O \rightarrow R–OCOCH_3 + CH_3COOH \quad (2.9.)$$

Analizējamā preparāta iesvaram pielika acetilējošā maisījuma precīzu daudzumu, pēc reakcijas norises Ac_2O parākumu sadalīja ar ūdeni un AcOH titrēja ar sārmu. Paralēli veica tukšo meģinājumu bez parauga iesvara. Pēc tukšajam meģinājumam un parauga attitrēšanai patērēto sārma tilpumu starpības atrada reakcijā saistītā AcOH daudzumu, kas ir ekvivalents acetilējamo OH grupu saturam.

$$R\text{-}(OH)_x + n(CH_3CO)_2O \rightarrow R\text{-}(OCOCH_3)_x + (2n\text{-}x)CH_3COOH \quad (2.10.)$$

Tukšajā mēģinājumā:

$$n(CH_3CO)_2O \rightarrow 2nCH_3COOH \quad (2.11.)$$

Starpība 2n - (2n-x) = x

Acetilējamo OH grupu saturu analizējamā paraugā aprēķināja pēc vienādojuma (2.12.);

$$[OH] = \frac{(b_0 - b) \cdot 170}{G}, \% \quad (2.12.)$$

G - analizējamā parauga iesvara masa, mg;

b - 0,1 M KOH tilpums, titrējot reakcijas maisījumu pēc acetilēšanas, mL;

b_0 - 0,1 M KOH tilpums, titrējot tukšajā mēģinājumā, mL

Kopējo acetilējamo hidroksilgrupu saturu izmantoja, lai aprēķinātu alifātisko hidroksilgrupu saturu. To aprēķināja kā starpību starp kopējo acetilējamo hidroksilgrupu saturu un skābo titrējamo hidroksilgrupu saturu [160, 179].

2.6.4. Analītiskā pirolīze - *Py-GC-MS-FID*

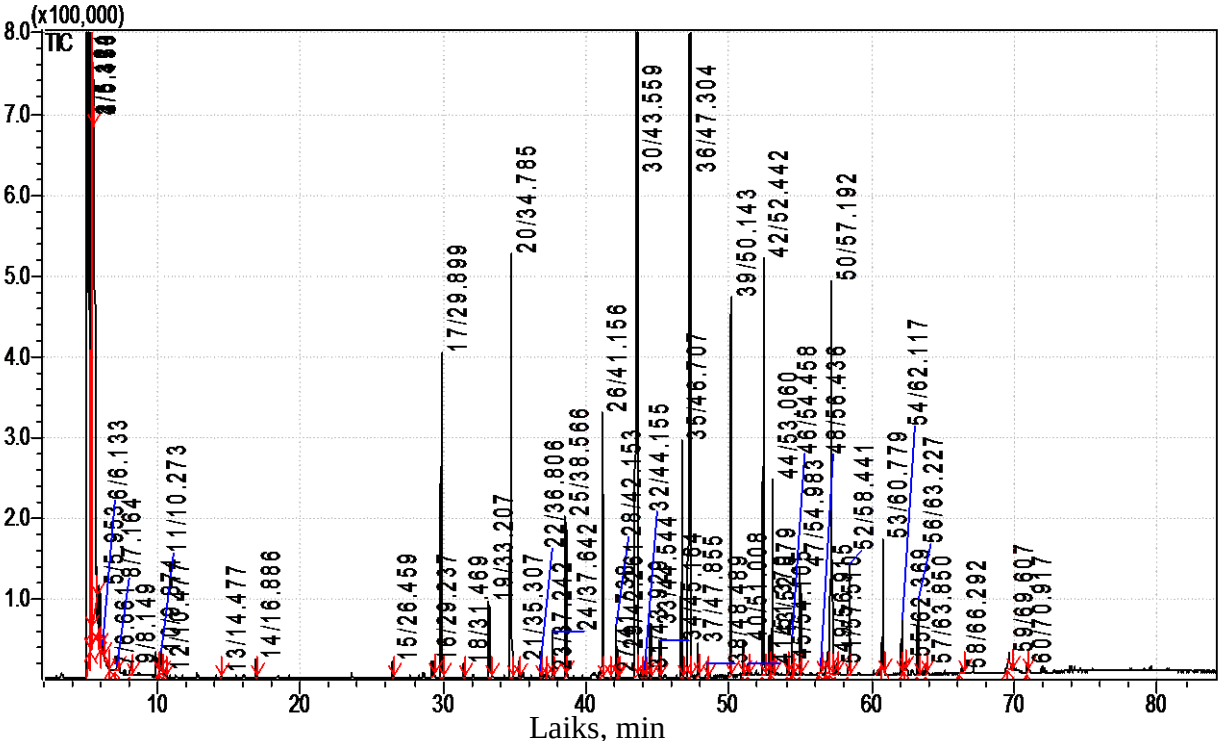
Pirms analīzēm lielu uzmanību veltījām lignīna paraugu homogenizācijai.

~ 2,5 mg homogenizēta parauga pārnesa tērauda tīģelītī un ievietoja to pirolīzes sistēmas *Frontier Lab* (Py-2020 iD) automātiskajā paraugu ievadīšanas ierīcē (AS-1020 E). Pirolīzes procesu veica 500 °C temperatūrā 15 sekundes. Pēc pirolīzes caur gāzes hromatogrāfa injektoru gāzveida sadalīšanās produkti nonāca (*split*-režīmā – 1 : 30) kapilāra tipa kolonnā (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm) ar fāzi RTX-1701. Iekārta ir modificēta ar nesējgāzes plūsmas dalītāju *Silica Outlet Splitter VSOS* (*SGE, Ringwood,* Victoria, Australia) lai vienlaicīgi darbotos ar *FID* un *MS* detektoriem. Produktu identifikācijai izmantoja *MS* detektoru, to relatīvā satura noteikšanai izmantoja liesmas jonizācijas detektoru (*FID*).

Gāzes hromatogrāfā nesējgāze bija hēlijs ar lineāro plūsmas ātrumu kolonnā 20,0 cm s^{-1}. Hromatogrāfijas procesu veica sekojošā režīmā: 7,5 minūtes, sākot no 40 °C, uzturēja doto temperatūru nemainīgu, tad to ar ātrumu 3 °C•min^{-1} paaugstināja līdz 270 °C , pēc tam 10 minūtes uzturēja doto temperatūru nemainīgu. Iegūto pirogrammu piemērs redzams 2.10. attēlā.

Masas spektru uzņemšanai izmantoja elektrona trieciena jonizāciju (70 eV) un kvadrapola masas analizatoru ar skenēšanas apgabalu no 15,00 līdz 350,00 m/z. Savienojumu identifikācijai izmantoja *Shimadzu Corporation* (Japan) *Lab Solution* datu bāzi (*GC-MS solution Version* 2.40).

Analīzi atkārtoja 3 reizes.



2.10. att. **Lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīna pirogramma**

2.6.5. Elektronu paramagnētiskās rezonanses spektrometrija

EPR spektrus uzņēma istabas temperatūrā, izmantojot datora kontrolētu *BRUKER EMX* spektrometru, *X band* frekvencē. *EPR* spektrus ieguva pie sekojošiem parametriem: mikroviļņu frekvence - 9,6 Ghz, magnētiskā lauka modulācijas frekvence - 50 kHz, mikroviļņu jauda 1 mW, centrālais magnētiskais lauks 345 mT, modulācijas amplitūda - 0,02 mT, skenēšanas intervāls 10 - 20 mT; g-vērtība (proporcionalitātes starp megnētisko dipolmomentu un radikāļa nesapārotā elektrona leņķa momentu konstante) un līnijas platums ΔH_{max} tika noteikts tieši no spektra. Brīvu radikāļu (paramagnētisko centru) koncentrāciju aprēķināja, salīdzinot pētāmā parauga un references materiāla (paraugs, kas satur $1{,}9\times10^{13}$ spins•cm^{-1}, *Bruker*) spektru integrālās intensitātes. *EPR* spektru integrālas intensitātes ieguva, novērtējot to divkāršos integrāļus, izmantojot *WIN EPR* programmatūru (*Bruker*). Polikonjugēto sistēmu daudzumu lignīna matricā novērtēja pēc stabilu paramagnētisku centru koncentrācijas paraugā. Lai raksturotu π-konjugētās sistēmu veidošanos lignīnu paraugos, izmantoja vērtību, kas apzīmē konjugācijas apgabalu izmēru un kuru noteica no lignīna stabilo paramagnētisko centru *EPR* spektru līknes kā CH fragmentu skaits, kas ir iesaistīti nesapārota elektrona delokalizācijas apgabalā.

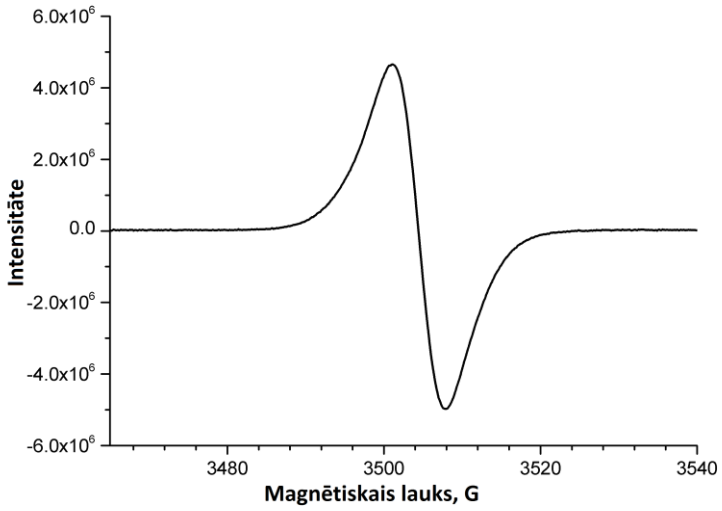
π-Konjugētās sistēmas izmērus aprēķināja pēc formulas (2.13):

$$n \geq 1 + (\Delta H_0 / \Delta H_{ef})^2 \quad (2.13.)$$

ΔH_0 - p-elektrona un protona, kas atrodas CH fragmentā, mijiedarbības spektra līnijas platums (2,25 mT);

ΔH_{ef} - eksperimentāli iegūtais *EPR* līnijas platums.

Lai atdalītu brīvus radikāļus, kas nav saistīti ar polikonjugētām sistēmam, pirms *EPR* spektra uzņemšanas paraugus izturēja 100 °C temperatūrā un dziļā vakuumā ($1 \cdot 10^{-4}$ Torr). Parauga masa bija 10.0 - 20.0 mg (mitrums < 1%). Nesapārota elektrona delokalizācijas reģiona izmērs korelē ar aromātiskuma pakāpi [241-243].



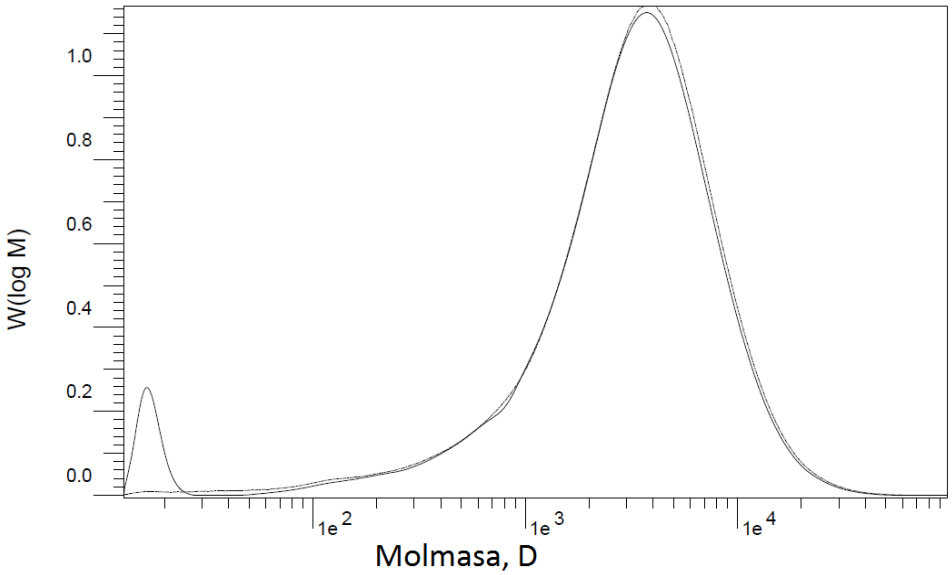
2.11. att. **Oša sārma lignīna EPR spektrs**

Polikonjugēto sistēmu daudzumu lignīna matricā novērtēja pēc stabilu paramagnētisku centru koncentrācijas paraugā.

2.6.6. Molekulmasas novērtēšana

Gēlfiltrācijas hromatogrāfija. Pagatavoja parauga šķīdumu dimetilsulfoksīdā (DMSO), lai masas koncentrācija būtu 1 $mg \cdot ml^{-1}$. Iegūto šķīdumu uz 24 stundām atstāja uz automātiskā kratītāja. Pēc 24 stundām paraugus nofiltrēja, izmantojot *Econofilter Syringe* filtru (*Agilent Technologies*) ar 0,2 μm porām. Iegūto filtrātu (100 μL) ievadīja hromatografā un veica hromatogrāfijas analīzi, izmantojot šķidruma hromatogrāfu *Agilent 1100* ar *UV-DAD* un *RI* detektoriem Hromatogrāfiju veica 60 ^{o}C temperatūrā, izmantojot *GPS/SEC* 300 mm × 7,50 mm kolonnu, eluents – DMSO. Molekulmasas novērtēšanai izmantoja savienojumu izdalīšanas laikus: sākumā iziet lielmolekulārākās frakcijas, pēdējās – frakcijas ar mazākām

molekulmasām. Lai izdalīšanas laiki korelētu ar molekulmasas vērtībām, tika veikta kalibrēšana ar polistirolu standartiem. Iegūto hromatogrammu piemērs – att. (2.12).



2.12. att. **Melnalkšņa sārma lignīna metanolā šķīstošās frakcijas molekulmasas sadalījums**

Nosaka vidējās skaitliskās (M_n) (vienādojums 2.14.) un vidējas masas (M_w) (vienādojums 2.15.) molekulmasas, kā arī polidispersitātes pakāpi, kas ir vienāda ar M_w/M_n.

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \qquad (2.14.)$$

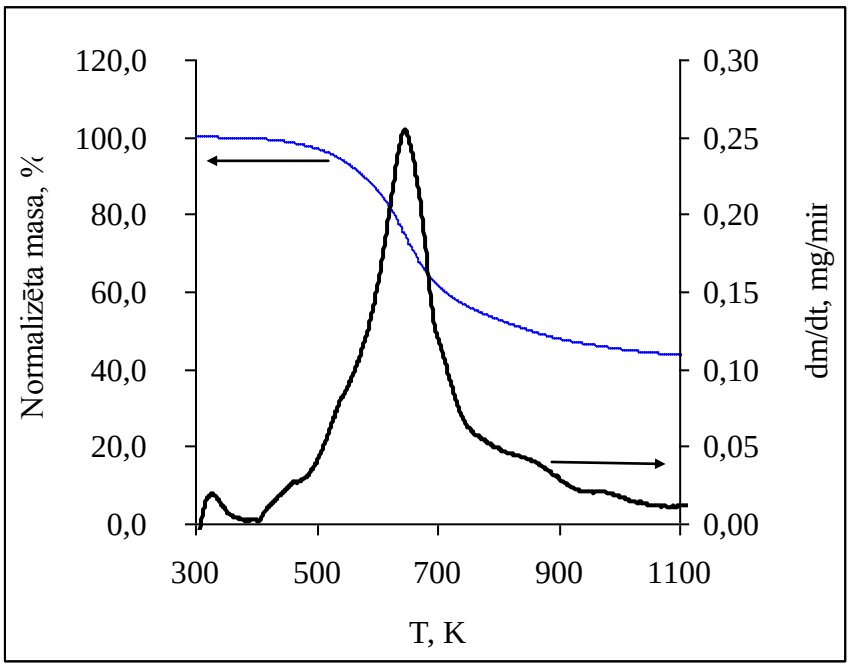
$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} \qquad (2.15.)$$

M_i – noteiktās polimēra molekulas molekulmasa

N_i – molekulu skaits ar molekulmasu M_i

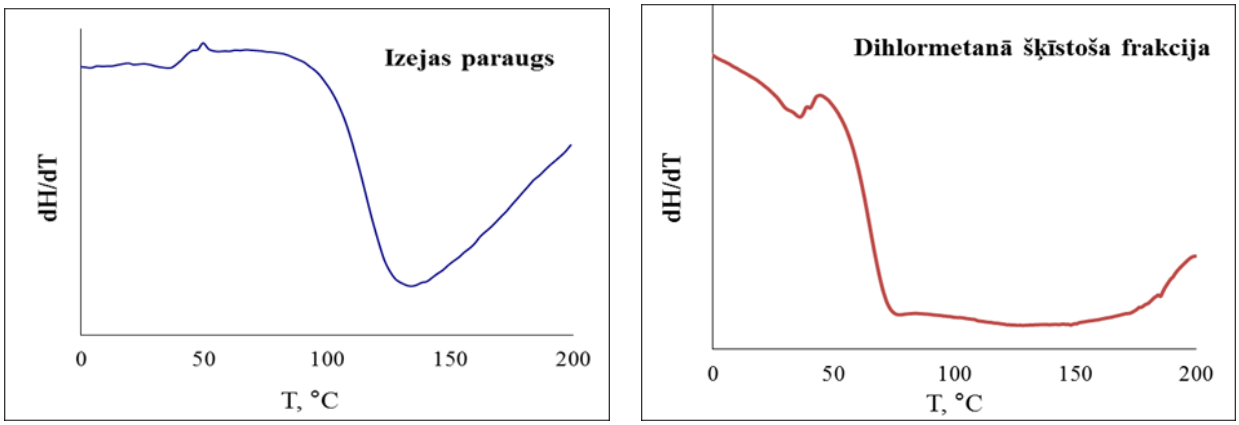
2.6.7. Termiskā analīze

Termogravimetrijas analīze. Izmantojot iekārtu *Metter Toledo TGA/SDTA 851*, noteica paraugu masas zudumus atkarībā no karsēšanas temperatūras. Sākotnējais parauga iesvars bija ~ 8 mg, uzkarsēšanas ātrums 10 ºC min^{-1}. Paraugu karsēja slāpekļa atmosfērā līdz 650 ºC, atdzesēšanas ātrums 50 ºC min^{-1}. Iegūto *TG* līkņu piemērs - att. 2.13.



2.13. att. **Skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīna termogravimetrijas līknes**

Diferenciālskenējošā kalorimetrijas analīze. Stiklošanās temperatūras noteikšanai izmantoja diferenciālās skenēšanas kalorimetru *Metler Toledo Star^e DSC 823^e*, parauga iesvars ~ 8 mg. Skenēšanu veica divas reizes, pirmajā skenēšanā paraugu uzkarsēja līdz 140 °C ar ātrumu 25 °C min^{-1}, tad atdzesēja līdz -50 °C, otrajā reizē uzkarsēja no -50 °C līdz 170 °C ar ātrumu 10 °C min^{-1} (slāpekļa atmosfērā) [244]. Stiklošanās temperatūras noteikšanai izmantoja datorprogrammu *Star^e Software Version* 9.00, lietojot DIN standartu Nr. 51007. Iegūto *DSK* līkņu piemērs - 2.14. att.



2.14. att. **Lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīna un tā dihlormetana šķīstošas frakcijas *DSK* līknes**

2.7. Antioksidatīvas aktivitātes raksturošanas analītiskās metodes

2.7.1. 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskābes ($ABTS^{\bullet+}$) radikāļu inhibēšanas metode

Pagatavoja 2 mM ABTS šķīdumu: nosvēra 0,055 g ABTS un izšķīdināja 50 mL fosfāta buferšķīduma, kas saturēja 8,18 g NaCl, 0,27 g KH_2PO_4, 3,58 g $Na_2HPO_4 \times 11H_2O$ un 0,15 g KCl 1 litrā destilēta ūdens. Šķīduma pH jābūt 7,4, tāpēc pH regulēšanai nepieciešamības gadījumā pielika 0,1 M NaOH vai 0,1 M HCl. $ABTS^{\bullet+}$ stabilo radikāļu izejas šķīdumu ieguva, 50,0 mL 2 mM ABTS šķīdumam reaģējot ar 200 µL 70 mM $K_2S_2O_8$ ūdens šķīduma. Maisījumu atstāja tumsā, 21±1°C temperatūrā 16 stundas. Izejas $ABTS^{\bullet+}$ šķīdumu atšķaidīja ar fosfāta buferšķīdumu, lai absorbcijas vērtība pie 734 nm būtu 0,800 ± 0,030. Iegūto $ABTS^{\bullet+}$ darba šķīdumu izmantoja paraugu antioksidatīvas aktivitātes noteikšanai.

Pirms antioksidatīvas aktivitātes noteikšanas mērīja absorbciju pie 734 nm atkarībā no $ABTS^{\bullet+}$ koncentrācijas un ieguva regresijas vienādojumu (2.16.)

$$y=23,85x-0,007 \qquad (2.16.)$$
$$R^2=0,999987$$

Antioksidatīvas aktivitātes noteikšanai 3,0 mL $ABTS^{\bullet+}$ darba šķīduma iemērīja 1 cm kivetē (PMMA kivetes, V=4,5 mL) un pievienoja 30 µL noteiktas masas koncentrācijas parauga šķīduma DMSO šķīdinātājā, labi sakratīja un 10 min izturēja tumsā pie 21±1°C. Pēc tam izmērīja absorbciju (A_A) pie 734 nm, izmantojot *UV/VIS* spektrometru. Kā salīdzināšanas šķīdumu izmantoja fosfāta buferšķīdumu (*PBS*) (3 mL *PBS* + 30 µL DMSO). Katram paraugam pagatavoja un analizēja vismaz 5 dažādas koncentrācijas šķīdumus, un katram šķīdumam mērījumus atkārtoja 3 reizes. Lai novērtētu antioksidanta ietekmi uz brīvā radikāļa inhibēšanu, precīzi noteica darba $ABTS^{\bullet+}$ šķīduma absorbciju eksperimenta apstākļos: 3,0 mL $ABTS^{\bullet+}$ darba šķīduma iemērīja 1 cm kivetē un pievienoja 30 µL šķīdinātāja DMSO (bez parauga). Absorbciju (A_B) izmērīja pēc 10 minūtēm pie 734 nm. Kā salīdzināšanas šķīdumu izmantoja 3 mL *PBS* + 30 µL DMSO. Šos mērījumus atkārtoja vairākas reizēs darba gaitā.

$ABTS^{\bullet+}$ inhibēšanu (absorbcijas samazināšanos pie 734 nm) aprēķinaja pēc formulas (2.17.).

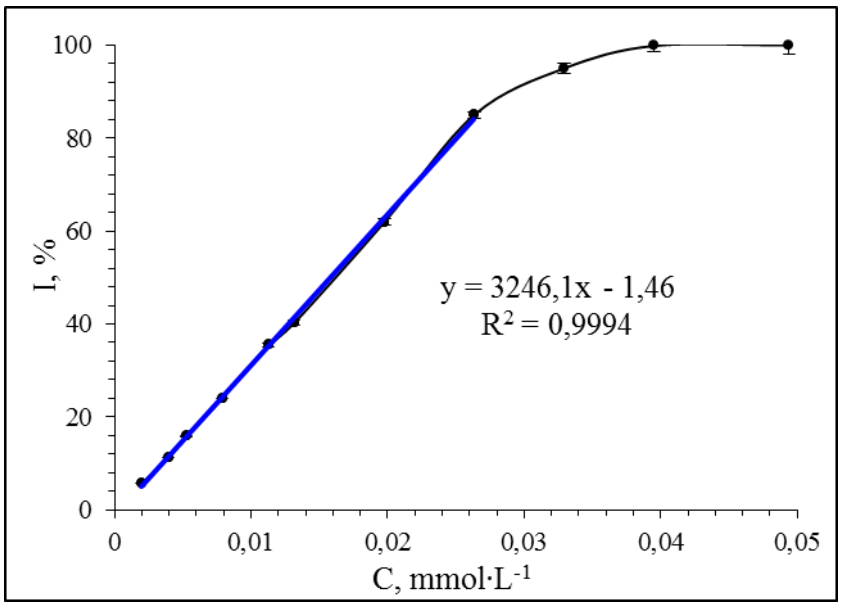
$$I = \frac{(A_B - A_A)}{A_B} \times 100\% \qquad (2.17.)$$

I - inhibēšana, %;

A_B - darba šķīduma absorbcija bez antioksidanta;

A_A - darba šķīduma absorbcija ar antioksidantu pēc 10 min.

Kā references meteriālu izmantoja Troloksu, tā spēja inhibēt radikāļus atkarībā no koncentrācijas ir parādīta 2.15. att.



2.15. att. **$ABTS^{\bullet+}$ inhibēšana (I) atkarībā no Troloksa molārās koncentācijas (C)**

2.7.2. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikāļu ($DFPH^{\bullet}$) inhibēšanas metode

Pagatavoja $1 \cdot 10^{-4}$ mol·mol^{-1} $DFPH^{\bullet}$ šķīduma metanolā. Iegūto $DFPH^{\bullet}$ darba šķīdumu izmantoja paraugu antioksidatīvas aktivitātes noteikšanai. Pirms tam noteica absorbcijas (pie 515 nm) atkarību no $DFPH^{\bullet}$ koncentrācijas un ieguva regresijas vienādojumu (2.18.)

$$y = 8{,}3\ x + 0{,}001 \qquad (2.18.)$$

$$R^2 = 0{,}99995$$

3,0 mL $DPPH^{\bullet}$ darba šķīduma iemērīja pudelītē (*Rotilaba Probenflaschchen*, V=4 mL) un pievienoja 30 µL noteiktas koncentrācijas parauga šķīduma DMSO, labi sakratīja un 15 min izturējā tumsā 21±1 °C temperatūrā,.pēc tam saturu ātri pārnesa

kvarca kivetē un mērīja maisījuma absorbciju (A_A) pie 515 nm, izmantojot *UV/VIS* spektrometru. Kā salīdzināšanas šķīdumu izmantoja metanolu. Katram paraugam pagatavoja un analizēja 5 dažādas koncentrācijas šķīdumus. Katram no tiem mērījumus atkārtoja 3 reizes.

Lai novērtētu antioksidanta ietekmi uz brīvā radikāļa inhibēšanu, precīzi noteica darba DFPH$^{\bullet}$ šķīduma absorbciju eksperimenta apstākļos: 3,0 mL DFPH$^{\bullet}$ darba šķīduma iemērīja 1 cm kvarca kivetē un pievienoja 30 µL šķīdinātāja DMSO (bez parauga). Absorbciju (A_B) izmērīja pēc 15 minūtēm pie 515 nm. Kā salīdzināšanas šķīdumu izmantoja metanolu. Šos mērījumus atkārtoja vairākas reizes darba gaitā.

DFPH$^{\bullet}$ inhibēšanu (absorbcijas samazināšanos pie 515 nm) aprēķināja pēc formulas (2.19.)

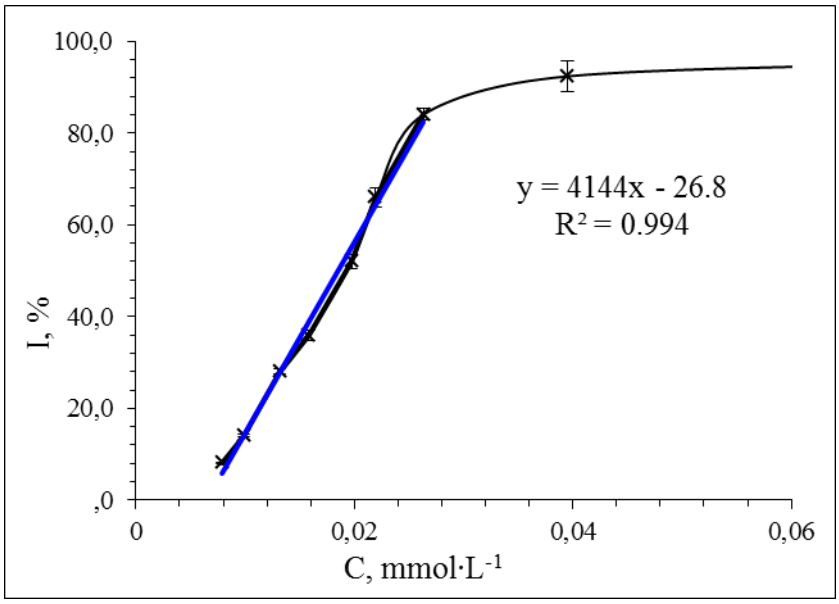
$$I = \frac{(A_B - A_A)}{A_B} \times 100\% \qquad (2.19.)$$

I- DFPH$^{\bullet}$ inhibēšana, %;

A_B - DFPH$^{\bullet}$ darba šķīduma absorbcija bez antioksidanta;

A_A - DFPH$^{\bullet}$ darba šķīduma absorbcija ar antioksidantu pēc 15 min.

Kā references meteriālu izmantoja Troloksu, tā spēja inhibēt radikāļus atkarībā no koncentrācijas ir redzama 2.16. att.



2.16. att. **DFPH$^{\bullet}$ inhibēšana (I) atkarībā no Troloksa molārās koncentrācijas (C)**

2.7.3. Hipoksantīns/ksantīnoksidāze sistēmā ģenerēto $O_2^{\bullet-}$ radikāļu inhibēšanas metode.

$O_2^{\bullet-}$ metodē antioksidatīvas aktivitātes novērtēšanai tiek izmantoti hipoksantīns/ksantinoksidāze sistēmā ģenerēti skābekļa anjonradikāļi. Radikāļu saturu nosaka fotometriski ar NBT (*nitroblue tetrazolium salts* – nitrozilā tetrazolija sāļi) indikatora palīdzību, kura reakcijā ar skābekļa anjonradikāļiem veidojas krāsains savienojums ar absorbcijas maksimumu pie 560 nm. Antioksidants dezaktivē daļu brīvu $O_2^{\bullet-}$, kā rezultātā mazāk radikāļu reaģē ar indikatoru, veidojas mazāk diformazāna, un absorbcija samazinās. Pagatavoja 0,06 mM EDTA šķīdumu $NaHCO_3$ - Na_2CO_3 buferšķīdumā ar pH=10,2, 250 µM hipoksantīna ūdens šķīdumu, 150 µM NBT (indikators) ūdens šķīdumu un 0,06 $U \cdot ml^{-1}$ ksantīnoksidāzes ūdens šķīdumu. Lai noteiktu anjonradikāļus saturošā šķīduma absorbciju darba sistēmā bez antioksidanta pievienošanas, 0,5 mL EDTA šķīduma ielēja PMMA kivetē, pievienoja 1 mL hipoksantīna, 0,8 mL ūdens, 30 µL DMSO, 0,5 mL NBT šķīduma un 0,2 mL ksantīnoksidāzes šķīduma – kivetes saturu labi samaisīja un ievietoja termostatā 24 ^oC temperatūrā 15 minūtes. Pēc tam mērīja absorbciju pie 560 nm. Kā salīdzināšanas šķīdumu izmantoja šķīdumu, kas ir iegūts tāpat kā analizējamais šķīdums, bet 0,2 mL ksantinoksidāzes ūdens šķīduma vietā pievienoja 0,2 mL destilēta ūdens. Lai noteiktu antioksidantu paraugu spēju dezaktivēt skābekļa anjonradikāļus, 0,5 mL EDTA šķīdumu ielēja PMMA kivetē, pievienoja 1 mL hipoksantīna, 0,8 mL ūdens, 30 µL antioksidanta šķīduma DMSO, 0,5 mL NBT šķīduma un 0,2 mL ksantīnoksidāzes šķīduma. Kivetes saturu labi samaisīja un ievietoja termostatā 24 ^oC temperatūrā uz 15 minūtēm. Pēc tam mērīja absorbciju pie 560 nm. Kā salīdzināšanas šķīdumu izmantoja šķīdumu, kurā 0,2 mL ksantinoksidāzes ūdens šķīduma vietā bija pievienots 0,2 mL destilēta ūdens. Visi šķīdumi un reaģenti pirms sajaukšanas bija termostatēti 24 ^oC temperatūrā. Kā references materiālu izmantoja Troloksu.

Absorbcijas samazināšanos aprēķinaja pēc formulas (2.20.);

$$I = \frac{(A_B - A_A)}{A_B} \times 100\% \qquad (2.20)$$

I - $O_2^{\bullet-}$ radikāļu inhibēšana, %;

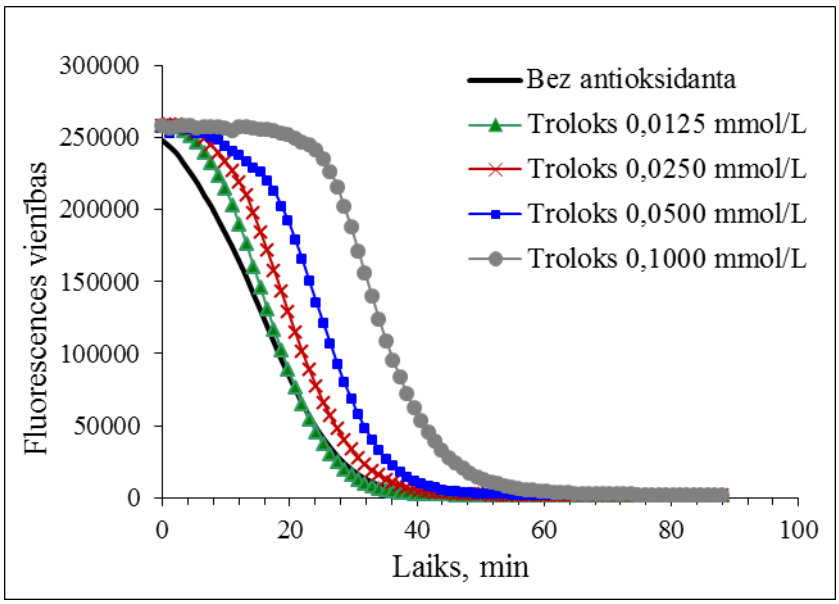
A_B - $O_2^{\bullet-}$ radikāļu parauga bez antioksidanta absorbcija pēc 15 min.;

A_A - radikāļu parauga ar antioksidantu absorbcija pēc 15 min.

2.7.4. Skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitātes metode

Šī metode ir standartizēta. Skābekļa aktīvās formas, kas tiek ģenerētas AAPH [2, 2'-azobis(2-amidino-propān)dihidrohlorīds] termiskās sadalīšanās procesā, samazina fluoresceīna fluorescenci. Antioksidanta pievienošana stabilizē fluoresceīna signālu [245-246].

Pagatavoja fosfāta buferšķīdumu: (*PBS*) izšķīdināja 8.18 g NaCl, 0,27 g $KH_2PO_4 \times 12$ H_2O, 3,58 g Na_2HPO_4 un 0,15 g KCl 1 L destilētā ūdens. Panāca, lai *PBS* šķīduma pH ir 7,4. Izejas fluoresceīna šķīduma pagatavošanai izšķīdināja 0,0225 g fluoresceīna 50 mL *PBS* šķīduma. Lai iegūtu 95,68 nmol•L^{-1} fluoresceīna šķīdumu, kuru izmantoja testēšanai, 800 µL darba šķīduma pievienoja 50 mL *PBS*. 240 mM AAPH šķīdumu pagatavoja, izšķīdinot 1,6272g AAPH 25 mL *PBS* šķīduma. Skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitātes (*ORAC*) testu veica, izmantojot *FLUOstar Omega* mikroplašu lasītāju (*BMG LABTECH, Germany*). Izmantoja 96 šūnu plati. Plates šūnas uzpildīja ar 25 µL pētāma parauga vai Troloksa šķīduma, vai *PBS* šķīdumu tukšajam mērījumam, pēc tam katras šūnas saturam pievienoja 150 µL fluoresceīna šķīduma. Lai katram mērījumam veiktu trīs paralēlus eksperimentus, trīs reizes atkārtoja katras šūnas saturu. Mikroplati ievietoja mikroplašu lasītājā un 15 min. inkubēja 37 ^{o}C temperatūrā. Izmantojot automātiskas uzpildes sistēmu, katras šūnas saturam ātri pievienoja 25µL AAPH šķīduma un veica fluorescences mērījumus. Mērījumus veica apmēram 90 minūtes (81 cikls).



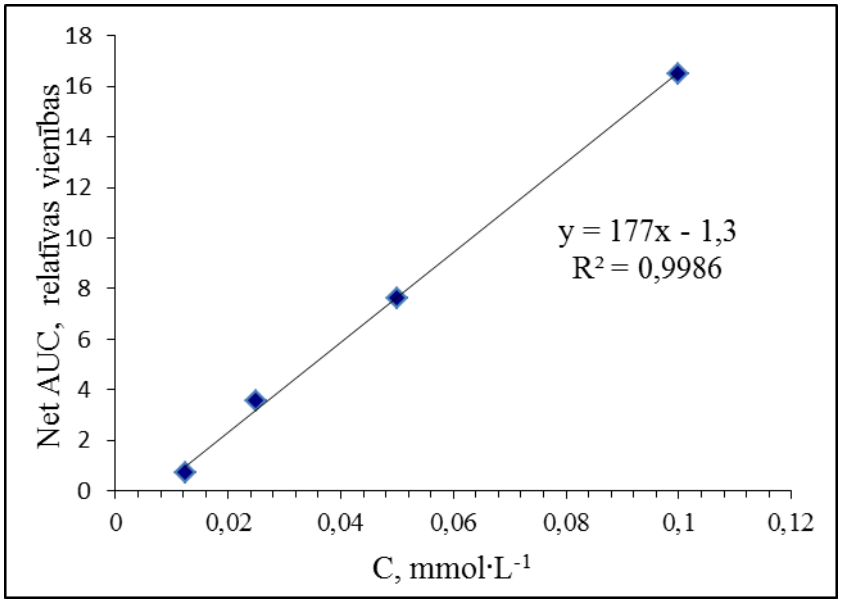
2.17. att. **Fluoresceīna oksidēšanas inhibēšana atkarībā no antioksidanta Troloksa koncentrācijas**

Laukums zem līknes (*AUC*) aprēķināja, izmantojot 2.21. vienādojumu

$$AUC = (0.5+f_1/f_0+f_2/f_0+f_3/f_0+\cdots+f_i/f_0) \times CT \quad (2.21.)$$

Kur f_0= sākuma fluoresceīna fluorescences vērtība ciklā 1; f_i= fluorescences vērtība ciklā i un *CT*= ciklu skaits minūtē.

$$net\ AUC = AUC_{paraugs} - AUC_{bez\ antioksidanta} \quad (2.22.)$$



2.18. att. **Fluoresceīna degradācijas līknes *net AUC* laukuma atkarība no Troloksa koncentrācijas**

Katra parauga antioksidanto kapacitāti izteica kā Troloksa ekvivalentu µmoli (*TE*) uz 1 gramu ekstrakta/parauga vai Troloksam ekvivalentā antioksidanta koncentrāciju. Rezultātu aprēķināšanai izmantoja regresijas vienādojumu (Y=aX+b) starp Troloksa koncentrāciju un neto laukumu zem fluoresceīna sabrukšanas līknes (2.17 att., 2.18. att.), kā arī paraugam aprēķināto ***net AUC*** (vienād. 2.21 un 2.22). Kalibrēšanai izmantoja zināmu troloksa koncentrāciju *PBS* šķīdumus (2.17 att.).

2.7.5. Lipīdu oksidēšanas inhibēšanas metode

Rapšu eļļu izmantoja kā substrātu, lai novērtētu pētāmo paraugu spēju inhibēt lipīdu oksidēšanos ar skābekli. 0.0250 (± 0.0001 g) antioksidanta (pētāmie lignīnu saturošie produkti vai *TBHQ* - *tert*-butilhidrohinons) iesvēra reakcijas trauciņā un pievienoja eļļu līdz reakcijas maisījuma masai 5.00 g. Reakcijas maisījumu 30 min. pakļāva ultraskaņas iedarbībai. Kontrolei izmantoja 5,00 g tās pašas eļļas bez antioksidanta (*TBHQ* vai pētāmie produkti)

piedevas. Lai novērtētu eļļas oksidēšanos, izmantoja *ML OXIPRES* (*Mikrolab Aarhus*) iekārtu ar divām mērīšanas šūnām. Reakcijas trauciņu pievienoja skābekļa balonam, skaloja ar skābekli un tad uzpildīja ar skābekli līdz noteiktam sākuma spiedienam. Reakcijas trauku ievietoja termostatā un sāka reģistrēt spiediena izmaiņas. Eksperimenta apstākļi bija: reakcijas maisījuma masa = 5,0 g; antioksidanta saturs = 0,5 %, sākuma spiediens reakcijas sistēmā = 5 bar; temperatūra 130 °C. Katru analīzi atkārtoja 3 reizes. Standartnovirze visos gadījumos bija 0.1-1% robežās. Paraugu bez antioksidanta analizēja tādos pašos apstākļos, tikai bez jebkādas piedevas. Indukcijas periodu aprēķināja kā laiku, kurā strauji sāk krist spiediens (2.19. att.). Eļļas aizsardzības faktora (*protection factor* - PF**)** un parauga antioksidatīvas aktivitātes (AA) vērtības aprēķināja pēc ((2.23.) un (2.24.) vienādojumiem).

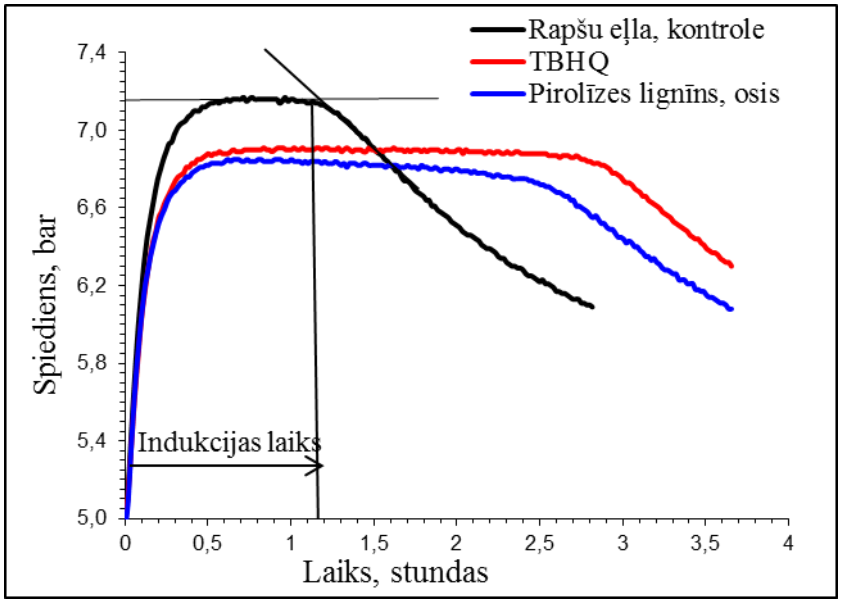
$$PF = IP_X/IP_K \quad (2.23.)$$

$$AA = (IP_X - IP_K)/(IP_{TBHQ} - IP_K) \quad (2.24.)$$

IP_X - eļļas ar pētāma antioksidanta piedevu indukcijas periods, stundas;

IP_K - eļļas bez antioksidanta piedevas indukcijas periods, stundas;

IP_{TBHQ} - eļļas ar sintētiska antioksidanta *TBHQ* piedevu indukcijas periods, stundas.



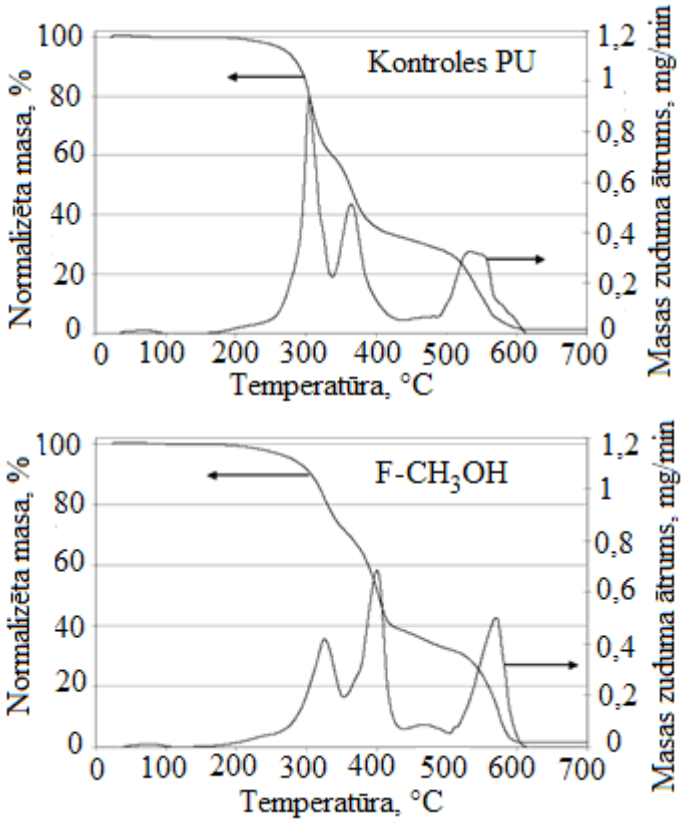
2.19. att. **Rapšu eļļas oksidēšanas indukcijas laika palielināšanās antioksidantu ietekmē**

2.7.6. Polimēru materiālu termooksidējošās destrukcijas inhibēšanas metode

Lignīnu saturošu ekstraktu ievietošana kompozītmateriālā. Poliuretāna (PU) elastomēru iegūšanai izmantoja literatūrā aprakstītu metodi [247]. PU elastomēru ieguva, sajaucot polietilēnglikolu (PEG) un 4,4-difenilmetāna diizacianāta polimēru (PMDI), kā

katalizatoru izmantojot alvas dibutillaurātu; kā šķīdinātāju lietoja ekstra-sausu tetrahidrofurānu (THF). PU elastomēra kopējā masa bija 9,5 grami, un no šīs masas rēķinaja antioksidanta masu, lai tā būtu 2,5% no kopējās PU elastomēra masas. 0,2375 gramus lignīna izšķīdināja THF, otrajā kolbā izšķīdinaja PMDI un trešajā kolbā izšķīdināja PEG. Visās trīs kolbās esošos maisījumus maisīja ar magnētiskajiem maisītājiem, pēc 5 min trešajā pievienoja katalizatoru un turpināja maisīt vēl 5 min. Tad apvienoja PEG šķīdumu ar PMDI šķīdumu un maisīja 2 - 3 min. Pēc tam pievienoja lignīna šķīdumu un maisīja vēl 10 min., tad ievietoja ultraskaņas vannā un pakļāva ultraskaņai 5 min. Iegūto maisījumu izlēja apaļā formā (22 cm diametrā), uz 1 stundu pārklāja ar stiklu. Pēc 1 dienas iegūto elastomēru noņēma no formas un 1 nedēļu žāvēja eksikatorā ar P_2O_5, pēc tam. žāvēja 8 stundas 95 °C. Kontroles PU plēves iegūšanai visas procedūras veica tāpat, tikai nepievienoja lignīnu saturošo ekstraktu.

Lignīnu saturošo ekstraktu ietekme uz PU oksidatīvo destrukciju. Modeļu PU plēvju termooksidēšanās destrukciju pētīja temperatūrās no 20°C līdz 700 °C.



2.20. att. **Termogravimetrijas līknes kontroles poliuretāna plēvei (bez antioksidanta piedevas) un plēvei ar pētāmā lignīna parauga metanolā šķīstošo frakciju**

Termogravimetrisko analīzi veica gaisa atmosfērā (plūsmas ātrums 50 mL•min^{-1}), izmantojot *Metler Toledo Star System TGA/DTA 851e* iekārtu, uzkarsēšanas ātrums bija 10 ºC min^{-1}. Sākotnējais parauga iesvars bija 8 - 10 mg. Tāpat analizēja materiālu bez

antioksidanta. Veica piecus paralēlus eksperimentus. Iegūto *TG* līkņu piemēri ir parādīti 2.20 attēlā.

2.7.7. Polifenolu ietekmes uz asins bioķīmiskajiem rādītājiem (*in vitro*) pētīšanas metodes

Pētījumi ir veikti sadarbībā ar RSU Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedru un Latvijas ārstnieciskās dietoloģijas zinātniski-praktisko centru. Asinis ņēma no brīvprātīgajiem pacientiem ar metabolisko sindromu. Izmantoja arī asins no pacientiem ar normālu metabolisma gaitu. Veica 40 sērijas eksperimentu *in vitro*. Asins bioķīmiskos rādītājus pirms un pēc inkubēšanas ar pētāmajiem polifenoliem noteica ar eiro-sertificētām metodēm, izmantojot *Random* testēšanas komplektus (*CAT, SD 125, RS 504 and NX 2332*).

Novērtēja polifenolu ietekmi uz lipīdu peroksidēšanas rādītāju (malondialdehīds) un proteīnu oksidēšanas rādītājiem (proteīnu aldehīdi un ketoni). Malondialdehīds (MDA) ir lipīdu peroksidēšanas produkts, tā koncentrācijas palielināšanās asinīs izraisa dažādus deģeneratīvus procesus, piemēram, aterosklerozes agresīvo attīstību. Malondialdehīda noteikšanas metode balstās uz MDA reakciju ar tiobarbitūrskābi un rekcijas produktu fotometrisko noteikšanu. Proteīnu aldehīdi un ketoni rodas proteīnu oksidēšanas rezultātā (aminoskābju sānķēžu tiešās oksidēšanas rezultātā). Šo savienojumu uzkrāšanās asinīs var izraisīt nevēlamus procesus. To noteikšanas metode balstās uz reakciju ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu un reakcijas produktu fotometrisko noteikšanu [248-251].

2.8. Hemometriskās analīzes metodes

Pētījumu datu drošības intervālu un standartnoviržu aprēķināšanai izmantoja *MS Excel 2010* un *IBM SPSS Statistics 21,0* programmatūru. Dažādu struktūras analīžu rezultātu savstarpējai izvērtēšanai izmantoja pāru korelācijas analīzi. Lai klasificētu paraugus pēc to struktūras īpašībām, ir izmantota *PCA* („*Principal Component Analysis*") metode (*XLSTAT 2013*). Kvalitatīvo struktūras-aktivitātes sakarību noteikšanai lietoja parciālās korelācijas analīzi (*IBM SPSS Statistics 21,0*). Kvantitatīvo struktūras-aktivitātes sakarību rakturošanai ir izmantotas daudzfaktoru regresijas analīzes metodes (*PLS, CCR* – korelējošo komponentu regresija) (*XLSTAT 2013*).

2.9. Molekulārās modelēšanas metodes

Lai iegūtu informāciju par pētamo polifenolu antioksidatīvās darbības mehānismiem, kā arī sakārtotu struktūras-antioksidatīvas aktivitātes sakarības, aprēķināja galvenos ar fenola savienojumu redoks-reaģētspēju saistītus deskriptorus:

1) O-H saišu disociācijas entalpijas (*BDE*) aprēķināja atņemot izejas fenola (ArOH) entalpiju no attiecīga fenoksilradikāļa ($ArO^{\bullet}$) un $H^{\bullet}$ entalpiju summas (skat. 1.13. vienādojumu);

2) Jonizācijas potenciālu (*IP*) aprēķināja kā starpību starp attiecīgā katjonradikāļa ($ArOH^{+\bullet}$) un izejas fenola (ArOH) entalpijām (skat. 1.15. vienādādojumu);

3) Elektrona pārneses entalpiju (*ETE*) no deprotonētas formas aprēķina kā starpību starp attiecīgā fenoksilradikāļa ($ArO^{\bullet}$) un izejas polifenola deprotonētas formas ArO^{-} entalpijām (skat. 1.17. vienādojumu).

Enerģijas aprēķināšanai un ģeometrijas optimizācijai izmantoja DFT B3P86/6-31+G(d,p) shēmu un DFT ωB97XD/6-31+G(d,p)//ωB97XD/6-31G(d) shēmu. Pirmā aprēķinu shēma ir ļoti labi piemērota polifenolu *BDE* aprēķināšanai, otrā shēma ir izmantota, lai ņemtu vērā nekovalentās mijiedarbības (galvenokārt *π-stacking* mūsu gadījumā) [51, 92-93].

Aprēķinus veica arī ņemot vērā šķīdinātāja ietekmi, izmantojot *PCM* (polarizable continuum model) pieeju. Visus aprēķinus veica, izmantojot *Gaussian09*® programmatūru no *Gauss Inc, USA.* Spina blīvuma sadalījumu $ArO^{\bullet}$ radikāļos raksturoja, balstoties uz *Mulliken* analīzēm, izmantojot Limožas Universitātes.programmatūru *ZOA.*

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

3.1. Antioksidatīvas aktivitātes noteikšanas metožu izvēle un pielāgošana pētāmajiem paraugiem

Struktūras-antioksidatīvas aktivitātes sakarību raksturošanai ir nepieciešams noskaidrot antioksidantu un radikāļu reakcijas stehiometriju. Pamatojoties uz literatūras analīzi, šim mērķim ir izvēlētas divas „reducēšanas" metodes: $DFPH^{\bullet}$ un $ABTS^{\bullet+}$ radikāļu dezaktivēšanas metodes, kas ir pielāgotas pētāmo polifenolu antioksidatīvas aktivitātes noteikšanai. Ir noskaidrots laiks, pēc kura reakcija starp antioksidantu un radikāli beidzas, izejas radikāļu koncentrācijas, ka arī šķīdinātājs, kas ļauj izšķīdināt dažādus polifenolus. Sakarā ar lielmolekulāra lignīna un citu dabas polifenolu ierobežotu šķīdību, to izšķīdināšanas iespējas limitē analīzes iespējamību. Viens no dotā darba uzdevumien ir salīdzināt un savstarpēji izvērtēt dažādu radniecīgo augu polifenolu antioksidatīvo aktivitāti, tāpēc vajadzētu izvēlēties iespējami universālāku šķīdinātāju. Pārbaudot dažādu šķīdinātāju ietekmi uz testu rezultātiem, ir pierādīts, ka izvēlētajos apstākļos optimāla ir DMSO lietošana. $DFPH^{\bullet}$ metode ir pielāgota darbam ar iespējami mazākām polifenolu koncentrācijām. Tas ir aktuāli savienojumiem, kas var absorbēt gaismu pie tā paša viļņa garuma kā $DFPH^{\bullet}$. Ir izpētīta katra savienojuma absorbcija izvēlētajās koncentrācijās pie darba viļņa garuma, lai pārliecinātos, ka tā būtiski neietekmē testa rezultātus. Dažiem paraugiem $DFPH^{\bullet}$ testa rezultāti ir parbaudīti *UV/VIS* detektora vietā izmantojot *EPR* detektoru. Iegūtie rezultāti sakrīt, bet sakarā ar *UV/VIS* detektora lielāko jūtību, salīdzinot ar *EPR*, darbā tas izrādījās daudz ērtāks.

Lai novērtētu kinētiskus faktorus, izvēlējāmies skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitātes (*ORAC*) metodi un fermentatīvajā sistēmā ģenerēto $O_2^{\bullet-}$ dezaktivēšanas metodes.

Darba gaitā ir izpētīta lignīnu ietekme uz asins bioķīmiskajiem rādītājiem *in vitro*. Lai realizētu šo testu, bija jāizstrādā metode ūdenī nešķīstoša lignīna ievadīšanai asinīs. Šīs metodes pamatā ir lignīna izšķīdināšana 0,01 M NaOH šķīdumā, šī šķīduma ievadīšana fizioloģiskajā šķīdumā (20 mL) un iegūtā šķīduma atšķaidīšana ar HCl līdz asins tuvajam pH (7,4). Ir pābaudīta iegūtā šķīduma stabilitāte, 7 dienu laikā mērot tā *UV/VIS* absorbciju. Izstrādātā metode palielina lignīna analīzes iespējas.

Radikāļu dezaktivēšanas aktivitātes rezultāti ir izteikti kā IK_{50}, kas parāda, kāda antioksidanta koncentrācija ir nepieciešama, lai uz pusi samazinātu izejas brīvā radikāļa koncentrāciju. Šo parametru visbiežāk izmanto literatūrā. Bet IK_{50} ir atkarīga no radikāļa izejas koncentrācijas (kuru rakstos bieži vien nenorāda), un tas apgrūtina dažādu pētniecosko institūciju rezultātu salīdzināšanu, kā arī neraksturo radikāļa un antioksidanta reakcijas

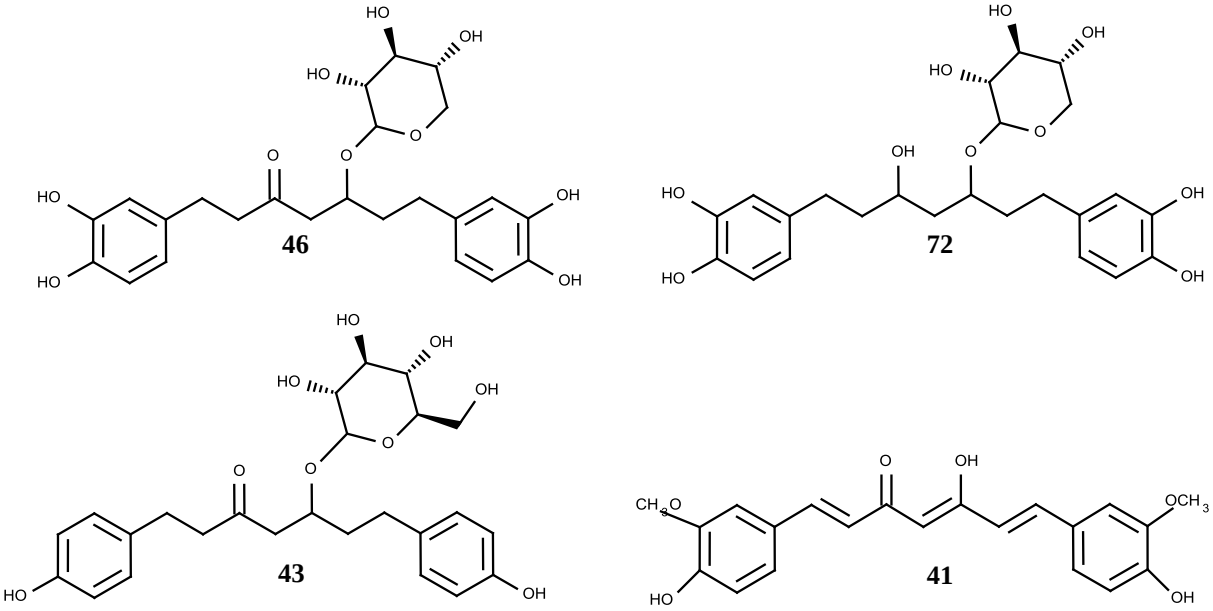
stehiometriju. Tāpēc šajā darbā ir izmantotas arī radikāļu dezaktivēšanas kapacitātes (RDK), kas parāda, cik radikāļu molus dezaktivē viens mols antioksidanta. Jo lielāka ir RDK vērtība, jo augstāka ir antioksidatīva aktivitāte. Radikāļu dezaktivēšanas indekss RDI (dezaktivēto radikāļu skaits, pārrēķināts uz fenola hidroksilgrupu skaitu), ļauj iegūt vairāk informācijas par pētāmo diarilheptanoīdu reaģētspēju un, papildus fenola hidroksilgrupām, pastiprina citu struktūras īpašību ieguldījumu. Tā kā termodinamiskie parametri tiek aprēķināti katrai fenola hidroksilgrupai, apvienojot teorētiskos un eksperimentālos pētījumus, ir jēga izmantot RDI parametru.

Lignīns ir polimērs ar precīzi nedefinējamu struktūru, tāpat nevar izmantot konkrētu molekulmasas vērtību. Tāpēc antioksidatīvas aktivitātes pētījumos izmanto masas koncentrācijas, līdzīgi kā daudziem polifenolu ekstraktiem, kad tie ir sarežģīti pēc sastāva un molekulmasas noteikšana nav iespējama. Šajā gadījumā IK_{50} parametram ir svarīga nozīme no praktiskās izmantošanas viedokļa, taču to nevar izmantot struktūras-aktivitātes sakarību pētījumos. Šo pētījumu veikšanai ir jāizmanto molārās koncentrācijas, jo tieši molekulu skaits nevis to svars nosaka aktivitāti [250]. Polifenolu gadījumā antioksidatīvo aktivitāti nosaka fenola hidroksilgrupas. Lignīna gadījumā nav iespējams izteikt antioksidatīvo aktivitāti uz 1 molu savienojuma, bet, pamatojoties uz funkcionālās analīzes rezultātiem un atrastām IK_{50} vērtībām, kā arī zinot precīzas radikāļu koncentracijas pirms un pēc reakcijas ar antioksidantu, var atrast radikāļu dezaktivēšanas indeksus, RDI.

3.2. Diarilheptanoīdu struktūras - antioksidatīvas aktivitātes sakarības

Diarilheptanoīdu antioksidatīvas aktivitātes pētīšanai izmantotie oregonīns **(46)** un platifilozīds **(43)** ir izdalīti no Latvijas lapkoku mizām, hidroksioregonīns **(72)** ir iegūts, reducējot oregonīnu **(46)** ar $NaBH_4$, kurkumīns **(41)** ir nopirkts no *Sigma Aldrich* (skat. 2.1. nodaļu).

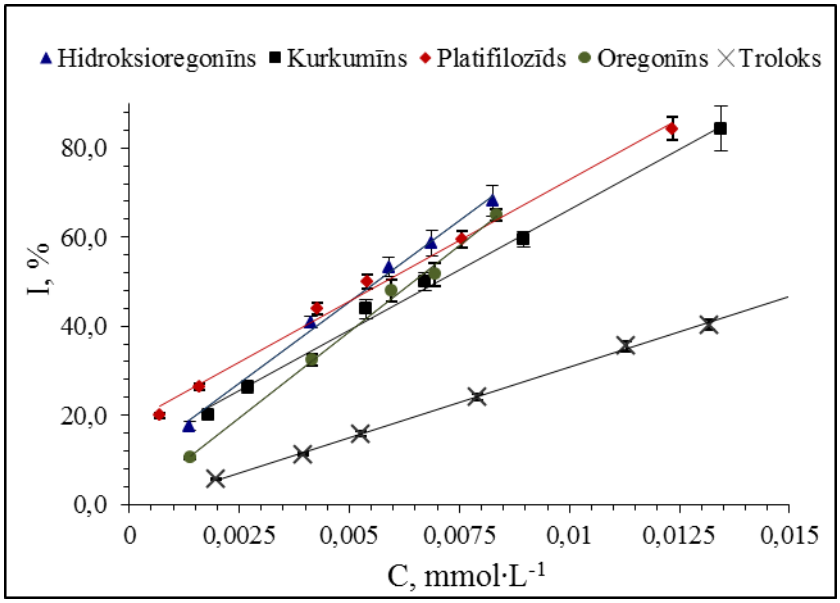
Šis darbs apvieno eksperimentālās analītiskās ķīmijas un teorētiskās ķīmijas pētījumus.



3.1. att. **Diarilheptanoīdu struktūras**

3.2.1. Diarilheptanoīdu antioksidatīvas aktivitātes raksturošana, izmantojot eksperimentālās analītiskās ķīmijas metodes

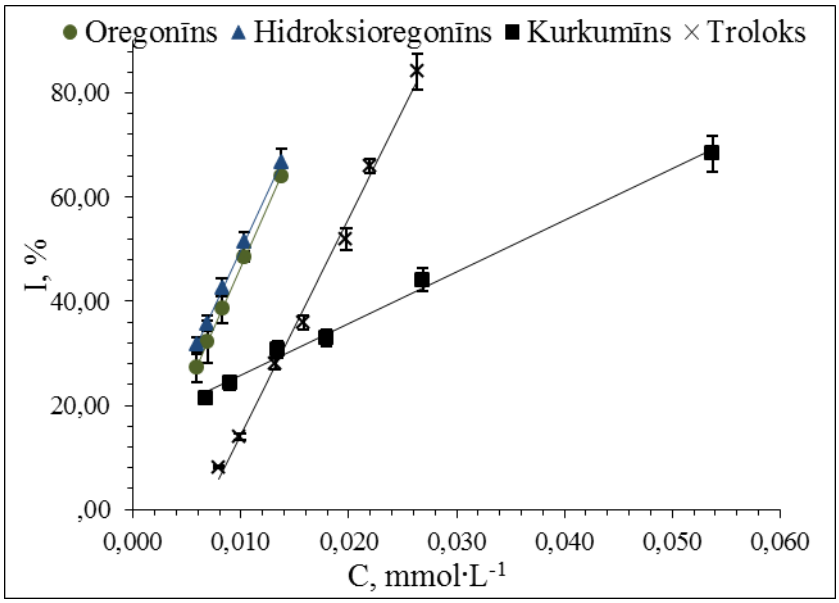
Ir izpetīta diarilheptanoīdu spēja dezaktivēt dažādus stabilus brīvos radikāļus atkarībā no koncentrācijas. Izejas $ABTS^{\bullet+}$ koncentrācija reakcijas maisījumā ir 0,037 (±0,001) mmol·L^{1}, mērījumi tika veikti pēc 10 minūtēm no reakcijas sākuma.



3.2. att. **$ABTS^{\bullet+}$ katjonradikāļu inhibēšana (I) atkarībā no diarilheptanoīdu vai Troloksa molārās koncentrācijas (C)**

Sakarība starp antioksidanta koncentrāciju un 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskābes katjonradikāļu dezaktivēšanu ir lineāra plašā koncentrāciju diapazonā (R^2>0,99) (*3.2. att.).*

Arī spēja dezaktivēt stabilus brīvos 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikāļus ($DFPH^{\bullet}$) atkarībā no koncentrācijas ir lineāra (R^2>0,99). Izejas $DFPH^{\bullet}$ radikāļu koncentrācija reakcijas maisījumā ir 0,099 (7±0,004) mmol•L^{-1}, mērījumus veica pēc 15 minūtēm no reakcijas sākuma.



3.3. att. **$DFPH^{\bullet}$ radikāļu inhibēšana atkarībā no diarilheptanoīdu vai Troloksa molārās koncentrācijas (C)**

Pētāmo savienojumu antioksidatīva aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ un $DFPH^{\bullet}$ testos būtiski atšķiras (3.1. tabula). Oregonīna **(46)** un hidroksioregonīna **(72)** radikāļu dezaktivēšanas kapacitātes ir tuvas. $DFPH^{\bullet}$ testā šo savienojumu RDK ir ievērojami augstāki, salīdzinot ar Troloksu **(31)** un kurkumīnu **(37)**, kas norāda uz lielāku aktivitāti (3.1. tabula). Platifilozīdam **(43) nav** novērota spēja dezaktivēt $DFPH^{\bullet}$ radikāļus (3.1. tabula). Dezaktivēto radikāļu skaits, pārrēķināts uz fenola hidroksilgrupu skaitu, ļauj iegūt vairāk informācijas par pētāmo diarilheptanoīdu redoksreaģētspēju un, papildus fenola hidroksilgrupām pastiprina citu struktūras īpašību ieguldījumu. Radikāļu dezaktivēšanas indeksa RDI - $DPPH/OH_{fenola}$ vērtības >1, norāda uz izveidoto fenoksilradikāļu kā otrējo antioksidantu piedalīšanos reakcijā ar radikāļiem. $ABTS^{\bullet+}$ testā nav novērota nozīmīga starpība starp diarilheptanoīdu RDK vērtībām, kas ir ievērojami lielākas, salīdzinot ar Troloksu **(68)**. Pārrēķinot rezultātus uz fenola hidroksilgrupām, var secināt, ka reakcijā ar $ABTS^{\bullet+}$ radikāļiem piedalās ne visas oregonīna **(46)** un hidroksioregonīna **(72)** fenola hidroksilgrupas (3.1. tabula). Diarilheptanoīdu antioksidatīva aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ un $DPPH^{\bullet}$ testos izteikta gan kā **IK_{50},** gan

kā RDK (dezaktivēto radikāļu molu skaits uz 1 molu savienojuma), gan kā **RDI (**dezaktivēto radikāļu skaits uz vienu fenola hidroksilgrupu**)** ir parādīta 3.1. tabulā.

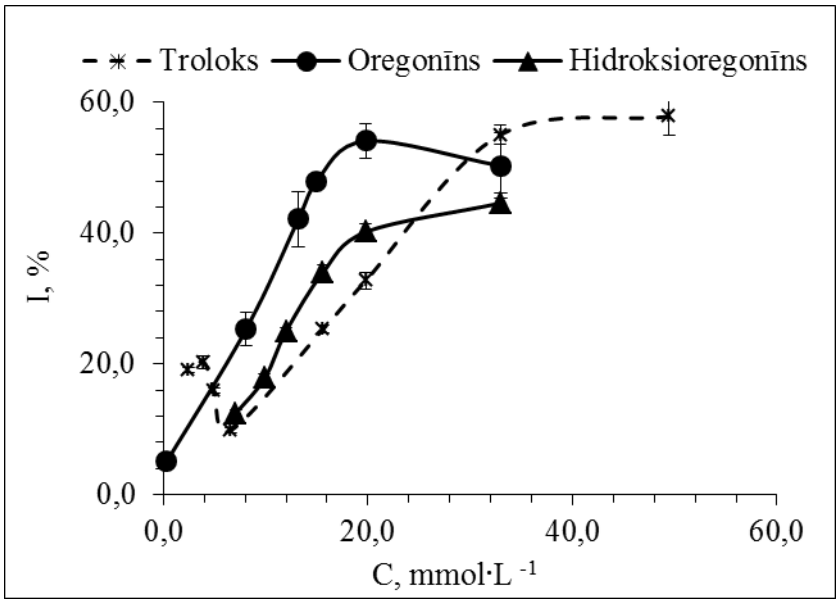
3.1. tabula

Diarilheptanoīdu antioksidatīva aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ un $DPPH^{\bullet}$ testos

Savienojums (skat. 3.1. att.)	**IK_{50}, μmol·L^{-1}**		**RDK**		**RDI**	
	$ABTS^{\bullet+}$	$DPPH^{\bullet}$	$ABTS^{\bullet+}$	$DPPH^{\bullet}$	$ABTS^{\bullet+}$	$DPPH^{\bullet}$
Oregonīns **(46)**	6,5±0,3	10,7±0,4	2,6±0,2	4,8±0,2	0,71±0,04	1,22±0,06
Hidroksioregonīns **(72)**	5,6±0,2	10,0±0,4	3,1±0,10	5,2±0,3	0,82±0,04	1,33±0,06
Platifilozīds **(43)**	5,8±0,3	n.a.*	3,0±0,2	n.a.*	1,52±0,08	n.a.*
Kurkumīns **(41)**	6,9±0,2	34,5±0,8	2,4±0,10	1,5±0,10	1,20±0,06	0,80±0,04
Troloks **(31)**	16,0±0,3	18,6±0,3	1,12±0,02	2,7±0,10	1,12±0,02	2,7±0,10

*n.a. – nav aktīvs

Spējai dezaktivēt aktīvā skābekļa formas ir svarīga loma veselības aprūpē [30-32]. Mizas diarilheptanoīdi (oregonīns **(46)** un hidroksioregonīns **(72)**, kas uzrādīja augstu antioksidatīvo aktivitāti abos iepriekšminētajos testos, ir pārbaudīti arī $O_2^{\bullet-}$ dezaktivēšanas testā. $O_2^{\bullet-}$ rodas hipoksantīns/ksantinoksidāze fermentatīvajā sistēmā reakcijas maisījumā antioksidanta klātbūtnē. Reakcijas laiks - 15 minūtes. Abi diarilheptanoīdi dezaktivē ~ 45-55% $O_2^{\bullet}$, tas pats efekts ir novērots Troloksam **(31)** (3.4. att.).

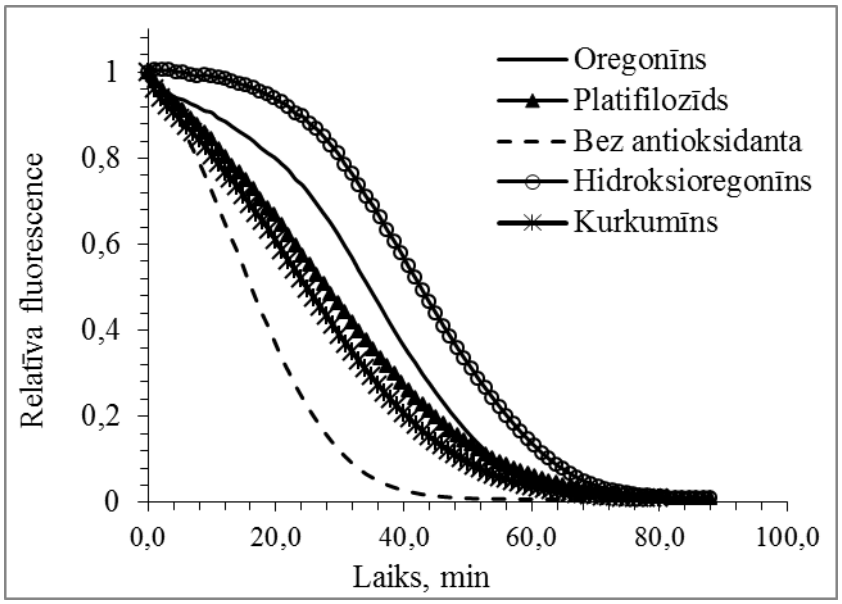


3.4. att. **$O_2^{\bullet-}$ inhibēšana (I), atkarībā no antioksidanta molārās koncentrācijas (C)**

Skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitāte (*ORAC*) sniedz informāciju par antioksidantu spēju aizsargāt substrātu (šajā testā fluoresceīnu) no oksidēšanas ar skābekļa peroksilradikāļiem. Pētot fluoresceīna oksidēšanās kinētiskās līknes ar vai bez antioksidantu klātbūtnes, var novērtēt oksidēšanas sākuma aizkavēšanos antioksidantu darbības rezultātā, kā arī oksidēšanas ātruma samazināšanos (3.5. att.). Antioksidantu darbības rezultātā palielinās laukumi zem fluoresceīna oksidēšanas kinētiskajām līknēm (*AUC*). Salīdzinot laukumus zem līknēm ar un bez antioksidantu klātbūtnes – *net AUC* (laukums zem līknes mīnus kontroles parauga laukums zem līknes), novērtē antioksidatīvo aktivitāti. No Troloksa **(68)** kalibrēšanas līknes iegūtā regresijas vienādojuma atrod Troloksa **(68)** koncentrāciju, kas atbilst analogai *net AUC* vērtībai (3.1).

$$C_{troloks}(\mu mol \cdot L^{-1}) = \frac{net\ AUC + 1{,}2364}{0{,}1776} \qquad (3.1.)$$

Aprēķinot, kāda pētāmā parauga koncentrācija dezaktivē radikāļus tāpat kā 1 mmol•L^{-1} Troloksa šķīdums, iegūst *TEAC* (Troloksam ekvivalenta antioksidatīva kapacitāte) vērtības, mmol•L^{-1}. Diarilheptanoīdu koncentrācija reakcijas maisījumā bija 0,001% w/v.



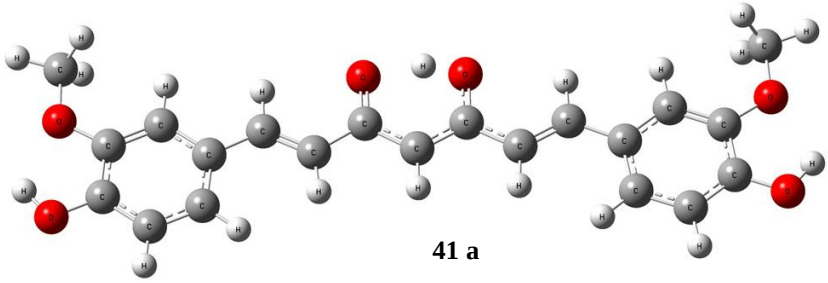
3.5. att. **Fluoresceīna oksidēšanas ar ROO˙ kinētiskās līknes ar un bez diarilheptanoīdu klātbūtnes**

Šī metode ļauj vienlaicīgi novērtēt gan substrāta oksidēšanās pakāpi, gan oksidēšanās kinētiku. Hidroksioregonīns **(72)** uzrādīja augstāko antioksidatīvo aktivitāti starp pētītajiem diarilheptanoīdiem. Hidroksioregonīna **(72)** klātbūtnē intensīva fluoresceīna oksidēšanās

sākās pēc indukcijas laika ~ 20 min.; tas pats indukcijas laiks ir oregonīna **(42)** klātbūtnē. Platifilozīda **(43)** un kurkumīna **(41)** klātbūtnē intensīva oksidēšanas sākās bez indukcijas laika. Pēc 40 minūtēm hidroksioregonīna **(72)** klātbūtnē ir oksidējies ~ 30% substrāta, oregonīna **(46)** klātbūtnē – 50%, platifilozīda **(43)** un kurkumīna **(41)** klātbūtnē – ~ 60%. Hidroksioregonīnam **(72)** ir aprēķināts *TEAC* = 0,13 ± 0,03 mmol•L^{-1}, oregonīna **(46)** un platifilozīda **(43)** antioksidatīva aktivitāte bija *TEAC*= 0,18 ± 0,02 mmol•L^{-1}, un TEAC = 0,22 ± 0,02 mmol•L^{-1} attiecīgi. Kurkumīna **(41)** *TEAC* = 0,28 ± 0,02 mmol•L^{-1}. Iegūtie rezultāti parāda, ka pētīto diarilheptanoīdu antioksidatīva aktivitāte ir ievērojami augstāka, salīdzinot ar Troloksu **(31)**.

3.2.2. Diarilheptanoīdu antioksidatīvas aktivitātes racionalizēšana, izmantojot molekulārās modelēšanas metodes

Konformācijas analīze parādīja, ka π-konjugācijas dēļ kurkumīna **(37)** molekula (enola forma, kas ir stabilākā) ir pilnīgi plakana (3.6. att.).

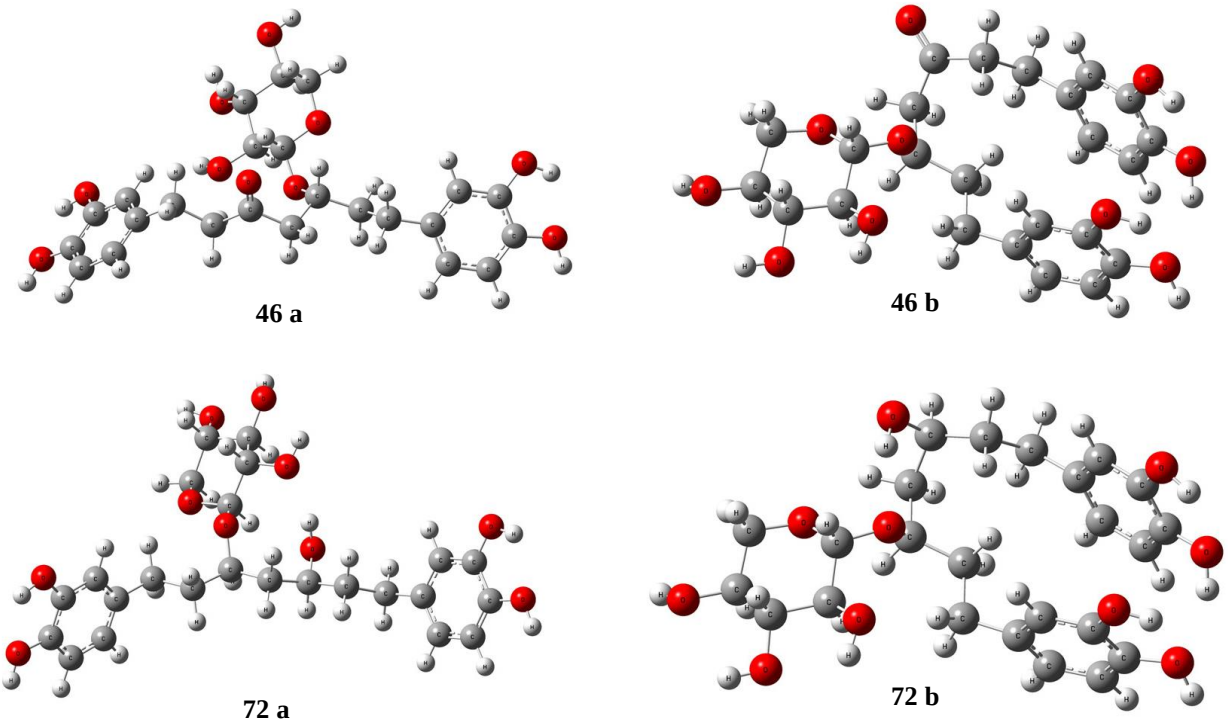


41 a

3.6. att. **Kurkumīna (41) stabilākais konformērs**

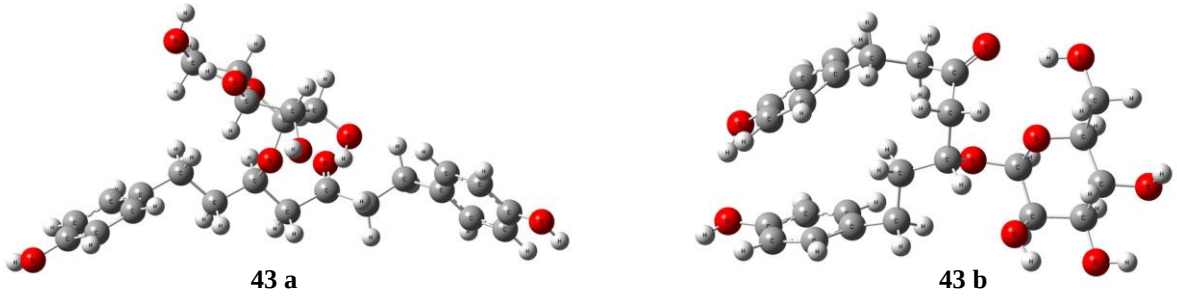
Citu diarilheptanoīdu alifātiskajās ķēdēs nav dubultsaišu un līdz ar to nav tādas π-konjugācijas, un molekulas ir lokāmas. Ir iegūti divi stabili konformēri: atvērts un salocīts (3.7. att.). Pēdējais ir stabilizēts, pateicoties nekovalentām mijiedarbībām (ūdeņraža saites un π-mijiedarbība) (3.7. att.).

Oregonīna **(46)** un hidroksioregonīna **(72)** gadījumos (katehola vienību klātbūtne) abu konformēru enerģijas ir tuvas (pirmais ir stabilāks par 0,6 kcal•mol^{-1}). Tas ir saistīts ar divu katehola vienību paralēlu novietojumu π-mijiedarbību. (3.7. att.).



3.7. att. **Oregonīna (46) un hidroksioregonīna (72) stabilākie konformēri: atvērts (46 a un 72 a) un salocīts (46 b un 72 b)**

Platifilozīda **(43)** gadījumā (fenola vienību klātbūtnē), π-mijiedarbība nav izdevīga, un salocītās formas stabilizācijā piedalās tikai ūdeņraža saites (3.8. att.). Šajā gadījumā H-saites ir stipras, un rezultātā salocītā forma, salīdzinot ar atvērto formu, ir stabilāka par 4.9 kcal•mol^{-1}.



3.8. att. **Platifilozīda (43) stabilākie konformēri : atvērts (43 a) un salocīts (43 b)**

Kā aprakstīts literatūras apskatā, ir trīs galvenie mehānismi, kā izpaužas fenola savienojumu spēja dezaktivēt brīvos radikāļus. Tie atbilst šādām reakcijām:

1) ArO-H + R$^{\bullet}$ → ArO$^{\bullet}$ + R-H (*PCET*) (3.2.)

Termodinamiskais deskriptors: *BDE* = $H°_{298K}(ArO^{\bullet}) + H°_{298K}(H^{\bullet}) - H°_{298K}(ArOH)$

2) $ArO\text{-}H + R^{\bullet} \rightarrow ArOH^{+\bullet} + R^{-} \rightarrow RH + ArO^{\bullet}$ (*ET-PT*) (3.3.)

Termodinamiskais deskriptors: *IP* = $H°_{298K}(ArOH^{+\bullet}) - H°_{298K}(ArOH)$

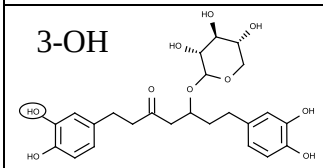
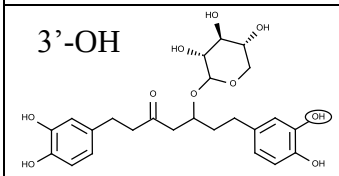
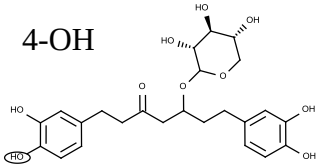
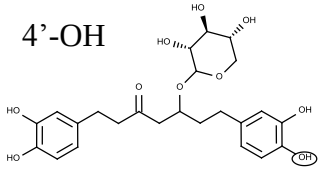
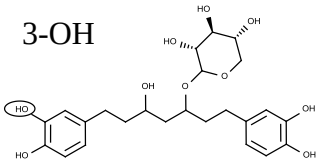
3) $ArO\text{-}H \rightarrow ArO^{-} + H^{+}$; $ArO^{-} + R^{\bullet} \rightarrow ArO^{\bullet} + R^{-}$; $R^{-} + H^{+} \rightarrow RH$ (*SPLET*) (3.4.)

Termodinamiskais deskriptors: *ETE* = $H°_{298K}(ArO^{\bullet}) - H°_{298K}(ArO^{-})$

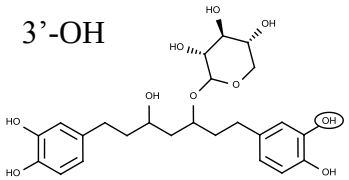
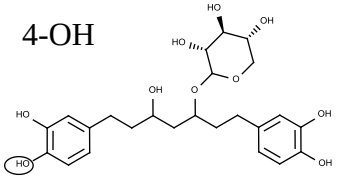
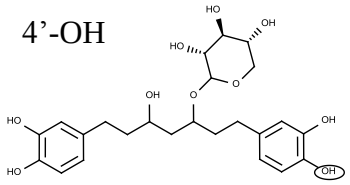
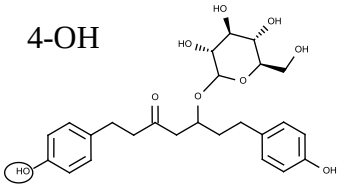
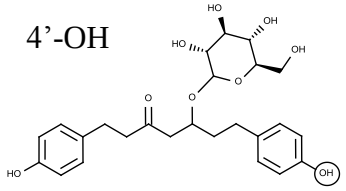
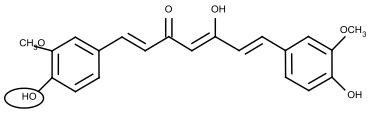
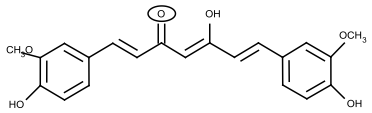
Pētītajiem diarilheptanoīdiem ir aprēķināti šo mehānismu norisi noteicošie termodinamiskie deskriptori (*BDE, IP, ETE*) (3.2. tabula). Ir ņemti vērā abi konformēri (atvērtais un salocītais).

3.2. tabula

Oregonīna (46), hidroksioregonīna (72), platifilozīda (43) un kurkumīna (41) O-H saišu disociācijas entalpijas (*BDE*), jonizācijas potenciāli (*IP*) un elektrona pārneses entalpijas (*ETE*)

Savienojums/OH grupa	**Konformērs**	***BDE*, kcal·mol^{-1}**	***IP*, kcal·mol^{-1}**	***ETE*, kcal·mol^{-1}**
3-OH 	*atvērts* (46 a)	76,3	172,9*	97,3
	salocīts (46 b)	77,9		97,6
3'-OH 	*atvērts* (46 a)	76,4		97,2
	salocīts (46 b)	77,2		103,0
4-OH 	*atvērts* (46 a)	75,3		95,2
	salocīts (46 b)	74,9		103,8
4'-OH 	*atvērts* (46 a)	75,5		96,0
	salocīts (46 b)	74,2		102,2
3-OH 	*atvērts* (72 a)	76,2	170,8*	97,5
	salocīts (72 b)	77,6		98,8

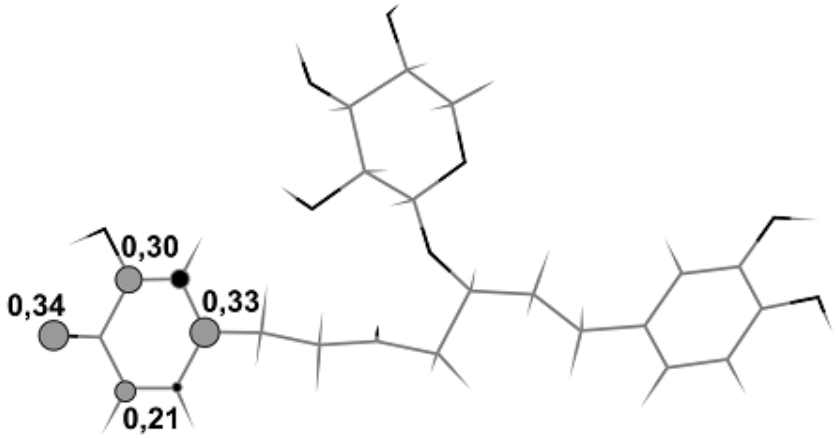
3.2. tabulas turpinājums

Savienojums/OH grupa	**Konformērs**	***BDE*, kcal•mol^{-1}**	***IP*, kcal•mol^{-1}**	***ETE*, kcal•mol^{-1}**
3'-OH 	*atvērts* (72 a)	76,0	170,8*	97,8
	salocīts (72 b)	77,7		102,9
4-OH 	*atvērts* (72 a)	74,6		96,2
	salocīts (72 b)	74,4		105,0
4'-OH 	*atvērts* (72 a)	75,3		96,6
	salocīts (72 b)	74,0		102,6
4-OH 	*atvērts* (43 a)	82,0	177,3*	97,6
	salocīts (43 b)	82,7		105,3
4'-OH 	*atvērts* (43 a)	82,1		98,1
	salocīts (43 b)	81,8		104,3
	(41 a)	81,2	166,7*	100,7
	(41 a)	106,9		113,2

* vidējās vērtības

DFPH$^{\bullet}$ dezaktivēšanas racionalizēšana - *BDE* aprēķinu rezultāti izskaido DFPH$^{\bullet}$ testā iegūtos rezultātus diarilheptanoīdiem ar piesātināto alkilķēdi (3.2. tabula). Zemākās O-H *BDE* vērtības ir iegūtas hidroksioregonīnam **(72)** un oregonīnam **(46)**. 4-OH un 4'-OH grupu *BDE* ir 74 - 75 kcal.mol^{-1}, kas ir polifenolu *BDE* zemo vērtību diapazonā, un atbilst ļoti aktīvām grupām, attiecībā uz radikāļu dezaktivēšanu [252-253]. 3-OH un 3'-OH grupām arī ir

zemas *BDE* vērtības (76-78 kcal•mol^{-1}). Tas apstiprina katehola vienības svarīgo lomu, kas ir plaši aprakstīta citiem polifenoliem. Katehola vienība spēj pārnest pat divus ūdeņraža atomus (*HAT*), secīgi veidojot fenoksilradikāli un *o*-hinonu. Izveidotā fenoksilradikāļa spina blīvuma sadalīšanās pa aromātisko gredzenu samazina *BDE* vērtības (piemēram, skat. 3.9. att.). Pārējo diarilheptanoīdu fenoksilradikāļu spina blīvuma sadalījumi ir doti 2. pielikumā. π-konjugācijas efekts samazina spina blīvumu uz skābekļa atoma, no kura tiek atņemts protons, padarot izveidoto radikāli stabilu un *BDE* zemu. Starp oregonīna **(46)** un hidroksioregonīna **(72)** fenoksilradikāļiem nav novērota nozīmīga starpība (skat. 2. pielikumu). Arī konformācija (atvērta vai salocīta) nozīmīgi neietekmē *BDE* vērtības. Tas nozīmē, ka intramolekulārā mijiedarbība nav pietiekoši stipra, lai nodrošinātu lādiņa pārnesi starp gredzeniem.



3.9. att. **Spina blīvuma sadalījums oregonīna (46) atvērtās formas fenoksilradikālī, kas ir izveidots no viena no aromātisko gredzenu 4-OH$_{fenola}$ grupas**

Kurkumīna **(41)** un platifilozīda **(43)** *BDE* vērtības ir ievērojami lielākas, salīdzinot ar oregonīnu **(46)** un hidroksioregonīnu **(72)** (~81-82 kcal.mol^{-1}). Tas rāda, ka šie savienojumi ir vāji DFPH$^{\bullet}$ radikāļu dezaktivātori. Ņemot vērā savienojumu veidošanās entalpijas, brīvo radikāļu dezaktivēšanas reakcijas (ArO-H + R$^{\bullet}$ → ArO$^{\bullet}$ + RH) termodinamisko bilanci var iegūt kā starpību starp antioksidantu O-H *BDE* un oksidētāju R-H *BDE*. Brīvo radikāļu dezaktivēšana notiek, ja *BDE*(ArO-H) < *BDE* (R-H).

Aprēķinātā DFPH-H *BDE* vērtība ir ~ 80 kcal•mol^{-1} (precīzāk 79.9 kcal•mol^{-1}, izmantojot ωB97XD/6-31+G(d,p) aprēķinus), kas padara šo testu efektīvu, lai atšķirtu dažādus polifenolus pēc to spējas dezaktivēt radikāļus. Tiešām, lielākajai daļai polifenolu *BDE* vērtības ir tieši diapazonā 70-90 kcal•mol^{-1}. Mūsu gadījumā oregonīns **(46)** un hidroksioregonīns **(72)** ir efektīvi DPPH$^{\bullet}$ dezaktivētāji (ar *BDE* << 80 kcal•mol^{-1}, skat. 3.2. tabulu), bet kurkumīns **(41)** un platifilozīds **(43)** ir neefektīvi (ar *BDE* nedaudz lielāku par 80 kcal•mol^{-1}, skat. 3.2. tabulu). Pētījumos sistēmātiski ir novērota korelācija starp *BDE* un

eksperimentāli noteiktajām DFPH$^{\bullet}$ dezaktivēšanas kapacitātēm, kā arī reaģētspējas zudums testā ar DFPH$^{\bullet}$ pie *BDE,* lielākām par noteikto robežvērtību [93, 252-254]. Dotajā pētījumā fenola O-H *BDE* robežvērtības nozīme apstiprinās platifilozīda **(43)** gadījumā un neapstiprinās kurkumīna **(41)** gadījumā. Tas parāda, ka neskatoties uz *BDE* parametra svarīgumu, tas nevar pilnībā izskaidrot fenolu spēju dezaktivēt brīvos radikāļus. *BDE* ir iekšējais parametrs, kas nevar viennozīmīgi raksturot uzvedību šķīdumos, kura ir atkarīga no polaritātes, pH un spējas disociēt. Starpība starp platifilozīdu **(43)** un kurkumīnu **(41)**, visticamāk, ir izskaidrojama ar kurkumīna **(41)** spēju deprotonēties un *o*-metoksilgrupu svarīgo lomu. Kurkumīna **(41)** pKa ir: 8,0; 9,3; un 9,9, kas nozīmē, ka eksperimenta apstākļos daļa no kurkumīna **(37)** ir mono-deprotonētajā formā. Šajā gadījumā, *SPLET* mehānismam var būt ieguldījums kā otrējam mehānismam [69].

Salīdzinot spina blīvuma sadalījumu kurkumīna **(41)** fenoksilradikāļos un piesātināto diarilheptanoīdu fenoksilradikāļos, var izdarīt secinājumu par α-dubultsaišu pozitīvo ietekmi uz izveidoto radikāļu stabilitāti (3.9. att., 2. pielikums). Fenoksilradikāļa stabilitāte pozitīvi ietekmē antioksidatīvo aktivitāti (samazina *BDE* vērtības), tomēr tās nozīme nav izšķiroša, ko apstiprina kurkumīna **(37)** un platifilozīda **(43)** antioksidatīva aktivitāte DFPH$^{\bullet}$ testā. Svarīga nozīme ir O-H saites spējai atdot H atomu. Saskaņā ar literatūras datiem, alkilķēdes ar elektrondonorām īpašībām pozitīvi ietekmē antioksidatīvo aktivitāti. To var izskaidrot ar šo grupu pozitīvo ietekmi uz fenola O-H saites disociāciju. Dubultsaitēm piemīt atvelkošs indukcijas efekts, kas var apgrūtināt H-atoma atraušanu no fenola OH. Tāpēc dubultsaišu klatbūtnes ietekme uz antioksidatīvo aktivitāti nav viennozīmīga. Kurkumīna **(41)** gadījumā nav novērota dubultsaites pozitīva ietekme uz *BDE*, tomēr π-konjugācija var ietekmēt spēju veidot aktīvus otrējos antioksidantus.

Dažām kurkumīna molekulām deprotonējoties, var tikt aktivēts *SPLET* mehānisms, veidojoties fenoksilradikāļiem, kas tālāk spina blīvuma sadalījuma dēļ var aktivēt alifātiskās ķēdes oglekļa atomus uz *HAT*. Tādā veidā vienas fenola grupas aktivēšanas rezultātā tiek pārnesti divi ūdeņraža atomi un dezaktivētas divas brīvo radikāļu molekulas. Ar to var izskaidrot lielāku dezaktivēto DFPH$^{\bullet}$ molekulu skaitu nekā sagaidāms, novērtējot kurkumīna pKa vērtības.

ABTS$^{\bullet+}$ un ROO$^{\bullet}$ dezaktivēšanas racionalizēšana. ROO-H *BDE* vērtības ir ~ 88 kcal•mol^{-1}. *BDE* vērtība ROO$^{\bullet}$ radikāļiem, kuri veidojas no AAPH (*ORAC* testā), ir 86,5 kcal•mol^{-1} (izmantojot ωB97XD/6-31+G(d,p) aprēķinus). Lielāka *BDE* vērtība, salīdzinot aktīvo un vidēji-aktīvo fenolu *BDE* vērtības, padara testu, kas balstās uz ROO$^{\bullet}$ dezaktivēšanu, mazāk svarīgu struktūras-antioksidatīvas aktivitātes sakarības noteikšanai. Tomēr šim testam ir liela praktiska nozīme, jo tas operē ar reālajās sistēmās eksistējošiem radikāļiem; tā ir

konkurences metode, izmantojama antioksidantu reakciju kinētikas pētījumos. Tā kā H atomu pārneses kinētika ir ļoti ātra [58], visi izpētītie diarilheptanoīdi uzrādīja augstu aktivitāti šajā testā. Hidroksioregonīnam **(72)** ir visaugstākā aktivitāte atbilstoši zemākai *BDE* vērtībai.

Pretēji aprēķinātajām *BDE* vērtībām, $ABTS^{\bullet+}$ testā hidroksioregonīna **(72)** un platifilozīda **(43)** aktivitātes ir gandrīz vienādas, tāpat arī oregonīna **(46)** un kurkumīna **(41)** antioksidatīvas aktivitātes. Šādu aktivitāti var racionalizēt, izmantojot otrējos deskriptorus: *IP* un *ETE* (3.2. tabula), kas parāda elektrona pārneses mehānisma nozīmīgo lomu. $ABTS^{\bullet+}$ testā brīvais radikālis ir pozitīvi lādēts, kas var ietekmēt ķīmisko mikrovidi un veicināt elektrona pārnesi no antioksidanta. Arī šķīdumā esošie anjoni kā Luisa bāzes var veicināt protona atņemšanu no fenola antioksidanta ar fenolāt-anjona veidošanos. Platifilozīda **(43)** nedaudz lielākā aktivitāte šajā testā korelē ar nedaudz zemākām *ETE* vērtībām (3.2. tabula). Tās parāda *SPLET* mehānisma ieguldījumu. Hidroksioregonīna **(69)** gadījumā, kas ir aktīvāks, salīdzinot ar oregonīnu **(46)**, vienīgā struktūras atšķirība ir pēdējā savienojuma OH grupa alifātiskajā ķēdē, salīdzinot ar oregonīna **(46)** karbonilgrupu. Tā nedaudz samazina hidroksioregonīna *IP* (3.2. tabula).

Darba gaitā ir parādīts, ka molekulārās modelēšanas metodes labi papildina eksperimentālo pētījumu rezultātus un ļauj daudz labāk aprakstīt struktūras-aktivitātes sakarības un darbības mehānismus. Pamatojoties uz deskriptoru aprēķinu rezultātiem, var izvēlēties perspektīvākus antioksidantus, kuru darbība jāpēta eksperimentāli. Tas ļauj ekonomēt laika un materiālos resursus.

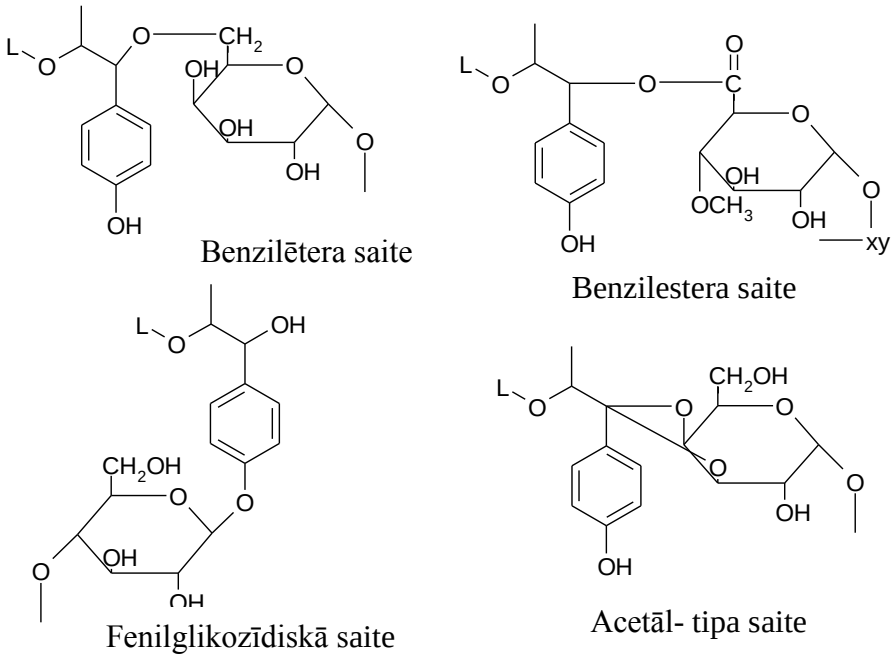
3.2.3. Diarilheptanoīdu antioksidatīva un biologiskā aktivitāte bioloģiskajās sistēmās

Pamatojoties uz šī darba gaitā iegūtajiem rezultātiem par mizas diarilheptanoīdu antioksidantīvo aktivitāti un to darbības mehānismiem attiecībā pret brīvajiem radikāļiem, zinot brīvo radikāļu negatīvo ietekmi uz dzīvajiem organismiem, kā arī ņemot vērā alkšņa mizas garo izmantošanas vēsturi tautas medicīnā un radniecīgā kurkumīna **(41)** plašo izmantošanu medicīnā un kā pārtikas komponentu, LV KĶI zinātnieki veica pētījumus par baltalkšņa mizas un citu lapkoku mizu diarilheptanoīdus saturošo ekstraktu izmantošanas iespējām vērtīgo produktu iegūšanai veselības kopšanai. Neskatoties uz dažiem fenoliem novēroto katehola vienības prooksidanto aktivitāti, oregonīns **(46)** uzrādīja zemu toksicitāti *in vivo* testos ar sālsūdens garnelēm un ar žurkām [255-256]. Sadarbībā ar Latvijas mediķiem, pirmkārt, ar RSU Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedras zinātniekiem, Latvijas zinātniski-praktiskās ārstnieciskas un kosmētiskās dietoloģijas centru, Rīgas 1. slimnīcu, kā arī Gēteborgas universitāti (Zviedrija), Limožas Universitātes Farmācijas fakultāti (Francija),

laboratorijas modeļu sistēmās un „*in vivo*" eksperimentos (izmantojot *Vistar* līnijas baltās žurkas) ir novērtēti oregonīna **(46)** un diarilheptanoīdu saturošo ekstraktu galvenie iedarbības virzieni uz dzīvo organismu. Pētījumu rezultāti ir atspoguļoti zinātniskajos rakstos un prezentēti specializētajās zinatniskajās konferencēs (skatīt 6. pielikumu) un kļuvuši par pamatu pārtikas piedevas (dabiska atveseļošanas līdzekļa) *Orvital*, kā arī pēcsauļošanas krēma-balzāma izstrādei un ražošanai (SIA *FIDE*). Starp pārtikas piedevas pozītīvajiem efektiem ir lipīdu un proteīnu oksidēšanas bremzēšana. Krēms-balzāms būtiski paātrina ādas šūnu reģenerācijas procesus un kavē fotonovecošanās procesu.

3.3. *Py-GC-MS-FID* metodes pielāgošana tehnisko lignīnu sastāva un dažādu struktūras īpašību raksturošanai

Pētāmie tehnisko lignīnu paraugi ir iegūti fitomasas ķīmiskajā pārstrādē (skat. 2.1. nodaļu). Tie kā pamatkomponentu satur lielmolekulāro polifenolu lignīnu, kā galvenos piemaisījumus – ogļhidrātus un ekstraktvielas. Ogļhidrātu piemaisījumi var ne tikai samazināt fenola hidroksilgrupu koncentrāciju paraugā, bet arī ietekmēt to reaģētspēju, jo ogļhidrāti var būt saistīti ar lignīnu ar ēteriskajām un glikozīdiskajām saitēm (3.10. att.) [257].



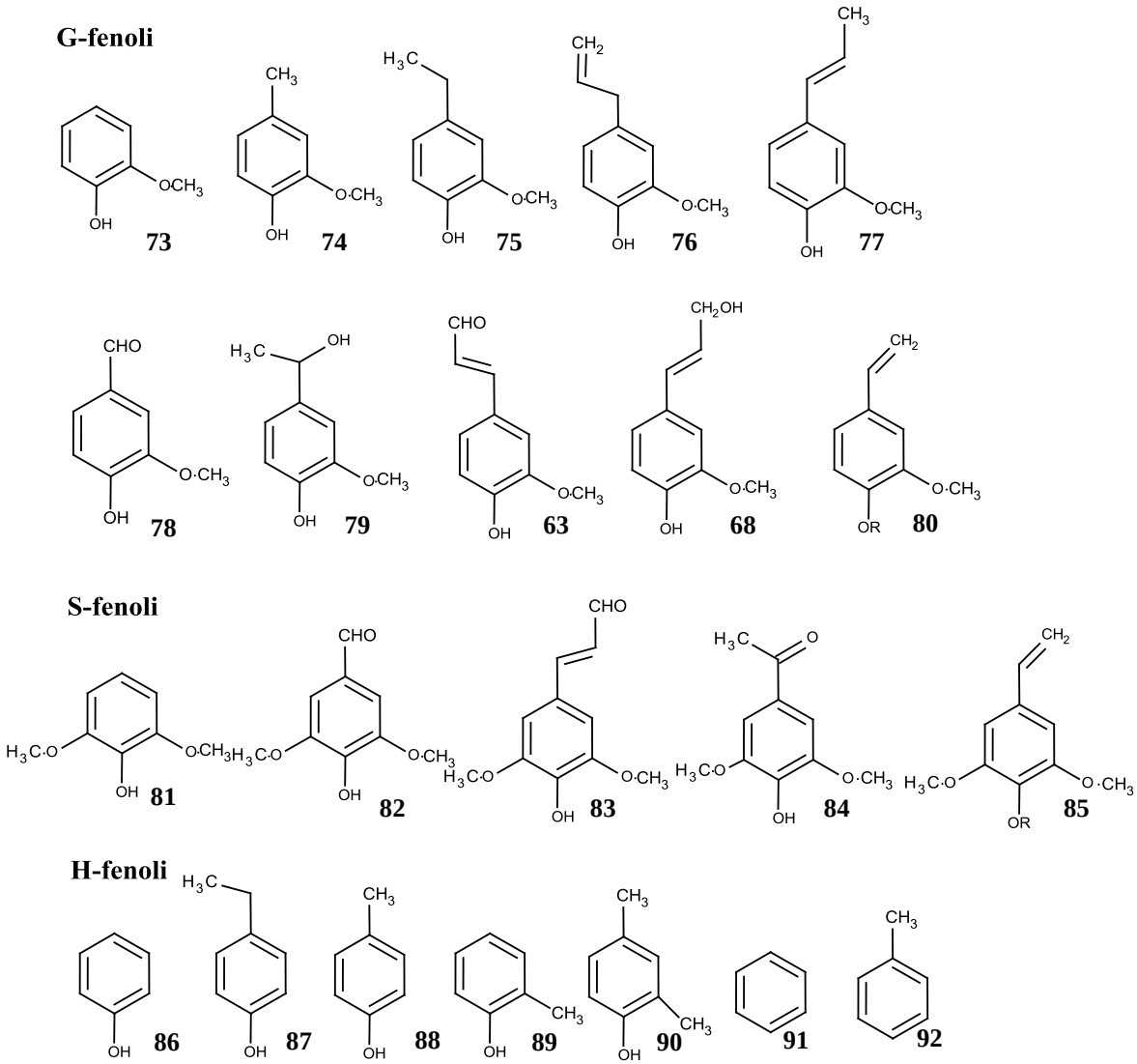
3.10. att. **Iespējamie saišu tipi starp lignīnu un ogļhidrātiem**

Parasti tehnisko lignīnu sastāva raksturošanai izmanto *Klasona* lignīna noteikšanas metodi, tomēr tai ir vairāki trūkumi. Literatūrā ir dati par *Py-GC-MS-FID* metodes veiksmīgo

izmantošanu fitomasas ķīmiskās parstrādes blakusproduktu sastāva raksturošanai. [258]. Pirolīzē molekula termiski tiek sašķelta specifiskās vietās ar zemām saišu enerģijām, veidojoties mazmolekulāriem savienojumiem. Šie savienojumi, to relatīvie daudzumi sniedz informāciju par parauga sastāvu un lignīna polimērās molekulas struktūru kopumā.

Pielikumā 2 ir parādīts *Py-GC-MS-FID* analīzē iegūto datu piemērs: identificētie savienojumi, to molekulmasas, (MM), izdalīšanās laiki un relatīvie smaiļu laukumi (konkrēta savienojuma smailes laukuma attiecība pret visu smaiļu laukumu summu, kuri noteikti, izmantojot *FID* detektoru). Pirolīzes produktus var sadalīt ogļhidrātu degradācijas produktos (O) (piemēram, furfurols, 2,5-dihidrofurāns, 2-propilfurāns u.c.); lignīna degradācijas produktos (L) (piemēram, fenols, 2-metoksifenols, 3-metilfenols, 1-metoksi-3-metilbenzols u.c.); kā arī degradācijas produktos, kas rodas no lipofīlajām ekstraktvielām (E) (piemēram, 3,7-dimetilnonāns, 3,8-dimetilundekāns, 3-oktadecēns). Šo produktu relatīvais saturs raksturo ogļhidrātu, lignīna un lipofīlo ekstraktvielu saturu pētāmajos paraugos. Pirolīzes produkti satur arī pirogenētisko ūdeni, oglekļa dioksīdu un metanolu, kas nav diagnostiskie savienojumi.

Lignīna modeļvielu un citu vienkāršo fenolu pētījumi parāda, ka *o*-metoksilgrupas (pret $–OH_{fenola}$) ievērojami palielina to antioksidatīvo aktivitāti un ievērojami samazina fenola O-H *BDE*. Neaizvietotas (īpaši α-stāvoklī) alkilsānķēdes arī palielina antioksidatīvo aktivitāti. Tas ir zināms uz *BHT*, *BHA*, dažādu vienkāršo fenolu piemēriem. Šajā darbā tas ir parādīts arī uz piesātināto koksnes diarilheptanoīdu piemēriem. Dažiem vienkāršiem fenoliem dubultsaites alifātiskajā ķēdē palielina šo polifenolu antioksidanto aktivitāti, tomēr dažos gadījumos – otrādi, samazina to. Ja dubultsaites neatrodas α-stāvoklī, ir novērota to pozitīvā ietekme uz antioksidatīvo aktivitāti [53, 55], savukārt karbonilgrupas sānķēdes α-stavoklī to ievērojami pazemina. Pētījumi par diarilheptanoīdiem (lignīniem radniecīgie polifenoli), kas ir veikti šī darba gaitā, parādīja, ka arī sānķēdes citās pozīcijās esošās karbonilgrupas ietekmē antioksidatīvo aktivitāti. To apliecina hidroksioregonīna **(72)** augstāka antioksidatīva aktivitāte, salīdzinot ar oregonīnu **(46)**. Arī hidroksilgrupām un ēteriskajām vai glikozīdiskajām saitēm sānķēdē var būt negatīva ietekme uz antioksidatīvo aktivitāti, jo elektronu atvelkošā indukcijas efekta dēļ tie var apgrūtināt fenola O-H saites disociāciju, kā arī var mainīt FPV skābes-bāzes īpašības. Lai iegūtu informāciju par minētajām struktūras īpašībām, kas ļautu novērtēt to ietekmi uz lignīnu antioksidatīvo aktivitāti, ir izmantota *Py-GC-MS-FID* analīze. Svarīgākie lignīna destrukcijas produkti ir parādīti (3.11. att.).



3.11. att. **Svarīgākie lignīna pirolīzes produkti**

73- gvajakols; **74**- 4-metilgvajakols; **75**- 4-etilgvajakols; **76**- eigenols; **77**- izoeigenols; **78**- vanilīns; **79**- acetovanilons; **63**- koniferilaldehīds; **68**- koniferilspirts; **81**- siringols; **82**- siringilaldehīds; **83**- sinapilaldehīds; **88**- *p*-krezols; **89**- *o*-krezols; **90**- 4-metilkrezols

Neskatoties uz to, ka literatūrā ir daudz datu par pirolīzes produktu struktūru atkarībā no izejas lignīna struktūras, līdz šim analītiskās pirolīzes metode gandrīz nav izmantota, lai raksturotu fenilpropāna vienību sānķēžu struktūru. Tomēr šī metode var būt ļoti piemērota dažādu lignīnu salīdzināšanai, kā arī to struktūras raksturošanai saistībā ar kādu mērķīpašību, mūsū gadījumā – antioksidatīvo aktivitāti [259-64].

Lai pielāgotu *Py-GC-MS-FID* metodi dažādu lignīna makromolekulas struktūras īpašību raksturošanai, ir apstrādātas 50 tehnisko lignīnu paraugu pirogrammas. Katram paraugam ir veiktas 3 paralēlas analīzes. Katra parauga pirogramma ir vidēji 130 smailes, kas atbilst 130 dažādiem savienojumiem, no kuriem atsevišķi ir analizēti lignīna izcelsmes pirolīzes produkti.

Šo produktu smaiļu laukumi tika normalizēti līdz 100%, un tika aprēķināts noteiktās struktūras lignīna degradācijas produktu relatīvais saturs (%) lignīna produktos.

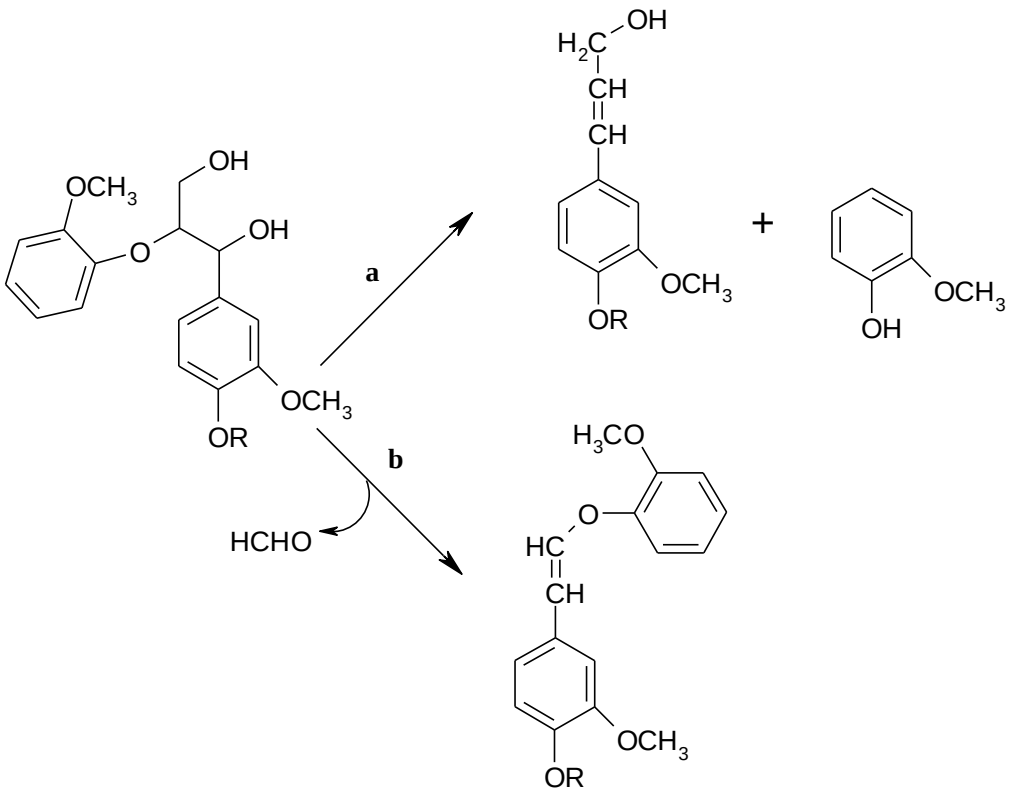
Gvajacil- un siringilfenoli. Lignīna pirolīzes rezultātā iegūtie aromātiskie savienojumi atšķiras pēc metoksilēšanas pakāpes, kas atspoguļo dažādi metoksilēto FPV klātbūtni lignīna makromolekulā. Tie satur vienu (G-tipa fenoli), divas (S-tipa fenoli) vai nesatur *o*-metoksilgrupas (3.11. att.) [258]. G+S noteikšanas rezultāti korelē ar metoksilgrupu satura noteikšanas rezultātiem, kas iegūti, izmantojot tetrimetrisko metodi. Literatūrā ir parādīts, ka ar *Py-GC-MS-FID* metodi noteiktais dažu struktūras vienību saturs, piemēram, dažādi metoksilēto fenilpropāna vienību saturs, labi sakrīt ar citu metožu rezultātiem [259].

Fenoli ar skābekli saturošām grupām fenilpropāna vienību sānķēdēs. Iegūtie pirolīzes produkti atšķiras pēc sānķēžu struktūras. Fenoli ar skābekli saturošām grupām sānķēdēs, piemēram, acetovanilons un acetosiringons u.c. (3.12. att.), raksturo galvenokārt karbonilgrupu saturu lignīna sānķēžu α- stāvokļos, jo tie veidojas no attiecīgajām FPV C_α–C_β vai C_β–C_γ saišu pārraušanas rezultātā [260]. Daži pirolīzes produkti satur arī alifātiskās hidroksilgrupas, tomēr pārsvarā tās tiek eliminētas, veidojoties jaunajām dubultsaitēm un ūdenim, hidroksilgrupas saturošo savienojumu saturs ir ļoti zems [260]. Dažādiem lignīniem šo grupu saturs korelē ar citu analīžu rezultātiem.

Fenoli ar CH_2- grupām fenilpropāna vienību sānķēžu α-stavoklī. Savienojumi ar CH_2- grupas fenilpropāna vienību sānķēžu α-stavoklī, piemēram, 4-metilgvajacils un 4-etilgvajacils u.c. (3.12. att.) veidojas sānķēžu C-C saišu pārraušanas rezultātā. To relatīvais saturs atspoguļo FPV saturu, kas sānķēdes α-stavoklī satur CH_2 grupu (alkilaizvietotāju *p*-stāvoklī pret fenola OH) [260]. Augstāks FPV saturs ar -CH_2 grupu sānķēdes α–stāvoklī ir raksturīgs lapkoku koksnes lignīniem, kā arī skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīnam.

Fenoli ar dubultsaitēm fenilpropāna vienību sānķēžu α-stāvoklī. Pirolīzes produkti ar dubultsaitēm alifātiskajā ķēdē (α–stāvoklī), piemēram koniferilspirts, izoeigenols u.c. (3.12. att.) veidojas gan no lignīna vienībām ar dubultsaitēm sānķēdē, gan no vienībām ar hidroksilgrupām sānķēžu α- vai β-stāvokļos dehidratēšanas rezultātā, gan ēterisko saišu pārraušanas rezultātā (skat. 3.12. att.) [261-263].

Eigenols (3.11. att.) veidojas no lignīna FPV ar γ-OH alifātiskajās ķēdēs [260].



3.12. att. **Lignīna β-O-4 ēterisko saišu pārraušana pirolīzes gaitā R = -OH vai –OCH_3**

Fenoli ar dažādu fenilpropāna vienību sānķēžu garumu. Savienojumi, kas veidojas no lignīna to pirolīzes gaitā, atšķiras arī pēc sānķēžu garuma (sānķēdes ar 1, 2 vai 3 oglekļa atomiem). Pirolīzes produktu sānķēžu garuma dažādība atspoguļo lignīna struktūras izmaiņas to izdalīšanas gaitā. Savienojumi ar saglabātajām C_3 sānķēdēm norāda uz mazām struktūras izmaiņām, salīdzinot ar *in situ* lignīnu. Savienojumi ar saīsinātām sānķēdēm (C_1 un C_2) savukārt norāda uz lignīna degradāciju to izdalīšanas gaitā [260-262, 264].

3.4. Tehnisko lignīnu struktūras īpašību un antioksidatīvas aktivitātes raksturošana

3.4.1. Sārma lignīni, *kraft*- lignīni un laboratorijā izdalītie lignīni

Augstāks lignīna degradācijas produktu saturs ir novērots *LignoBoost kraft* tehniskajiem lignīniem. No melnalkšņa un cukurniedrēm ar sārmu izdalītajiem tehniskajiem lignīniem ir raksturīgs augsts ogļhidrātu saturs (skat. 3.3. tabulu). No kaņepēm un liniem ar sārmu izdalītajiem tehniskajiem lignīniem ir raksturīgs augsts (20,4 un 24,7 %) lipofīlo ekstraktvielu degradācijas produktu saturs.

3.3. tabula

Dažādas izcelsmes produktu relatīvais saturs , % (ar standartnovirzēm) tehnisko lignīnu termiskās degradācija produktos

Tehniskais lignīns	Lignīna degradācijas produkti	Ogļhidrātu degradācijas produkti	Ekstraktvielu degradacijas produkti
Oša SL*	91,3 ± 0,7	7,9 ± 0,2	0,75 ± 0,10
Melnalkšņa SL*	70,7 ± 0,9	28,9 ± 0,9	0,44 ± 0,04
Abakas SL*	80,6 ± 0,5	16,4 ± 0,9	2,9 ± 0,4
Džutas SL*	88,3 ± 0,6	7,1 ± 0,4	4,6 ± 0,3
Cukurniedru SL*	70,1 ± 0,9	29,8 ± 0,3	0,09 ± 0,01
Kaņepju SL*	75,5 ± 1,1	4,1 ± 0,6	20,4± 0,2
Linu SL*	71,4 ± 0,4	3,9 ± 0,3	24,7 ± 0,4
Sizala SL*	84,5 ± 0,10	8,0 ± 0,4	7,6 ± 0,3
Kviešu salmu SL	87,8± 0,6	8,6 ± 0,10	3,5 ± 0,2
Etanola ražošanas no kviešu salmiem blakusprodukta sārmā šķīstoša frakcija	90,4± 0,7	9,2 ± 0,5	0,33 ± 0,02
Skuju koku KL**	94,0 ± 0,3	5,2 ± 0,7	0,86 ± 0,03
Skuju koku KL**-*LignoBoost*	97,0 ± 0,5	1,8 ± 0,3	1,23 ± 0,02
Lapkoku KL**-*LignoBoost*	97,4± 0,9	2,5 ± 0,2	0,18 ± 0,02
Skuju koku *MWL****	69,5 ± 0,7	20,0 ± 0,3	10,5 ± 0,2

* SL- sārma lignīns;

** KL – *kraft* lignīns;

*** *MWL* – maltas koksnes lignīns

Pētāmie tehnisko lignīnu paraugi ir heterogēni ne tikai pēc ķīmiskā sastāva, bet arī pēc molekulmasas sadalījuma (3.4. tabula). *MWL* lignīnam ir raksturīga daudz zemāka polidispersitāte, salīdzinot ar sārma un *kraft* lignīniem. Tas liecina par degradācijas un kondensācijas reakcijām, kas notiek ar lignīna makromolekulām, to izdalot *kraft* procesā vai ar sārmu.

3.4. tabula

Fitomasas ķīmiskās pārstrādes produktu (tehnisko lignīnu) masas vidēja molekulmasa (M_w) un polidispersitāte (M_w/M_n)

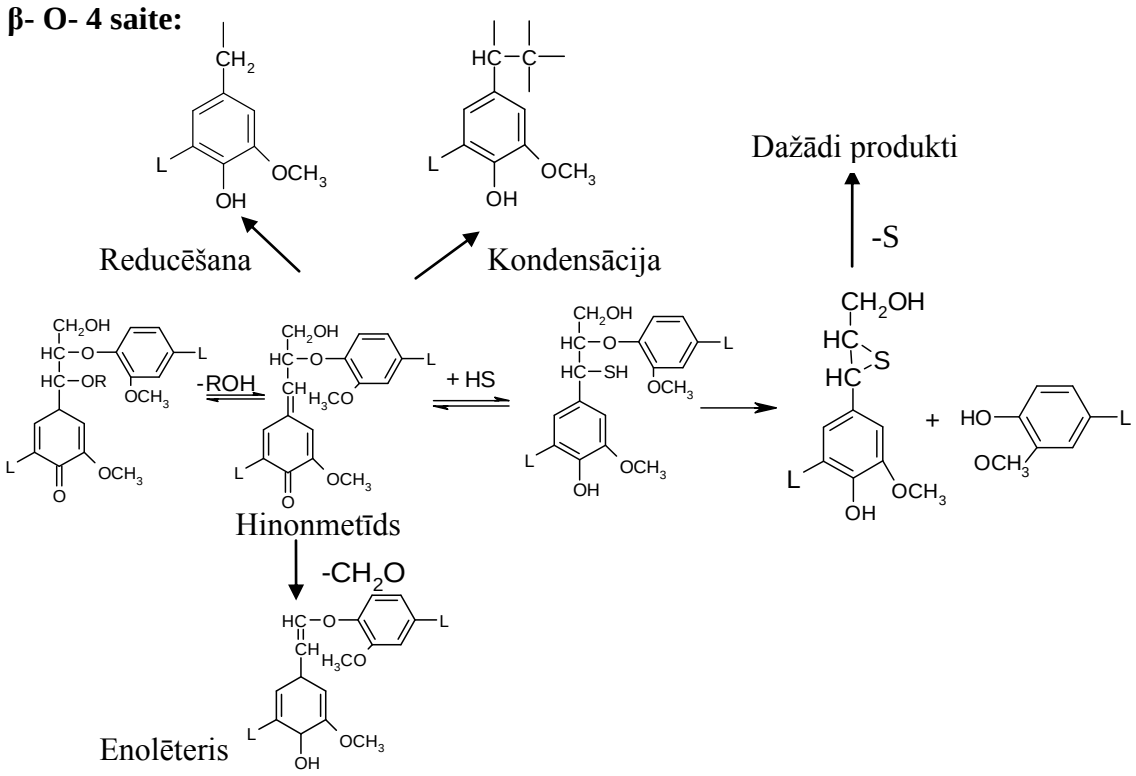
Tehniskais lignīns	M_w, g•mol^{-1}	M_w/M_n
Oša SL*	4505	14,2
Melnalkšņa SL*	7617	25,1
Abakas SL*	3127	6,3
Džutas SL*	3457	7,2
Cukurniedru SL*	4120	6,8
Kaņepju SL*	3897	7,6
Linu SL*	8358	8,6
Sizala SL*	3143	6,4
Kviešu salmu SL	4400	8,8
Etanola ražošanas no kviešu salmiem blakusprodukta sārmā šķīstoša frakcija	6100	6,7
Skuju koku KL**	13825	6,5
Skuju koku KL**-*LignoBoost*	12138	13,5
Lapkoku KL**-*LignoBoost*	4786	11,4
Skuju koku *MWL****	5720	1,8

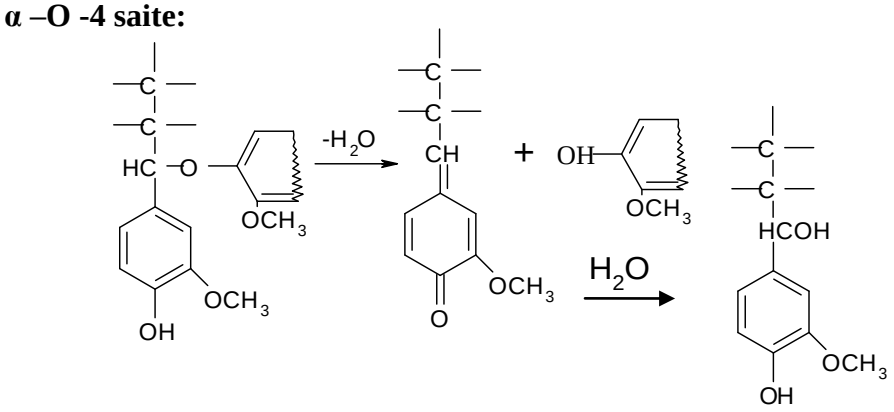
* SL- sārma lignīns;

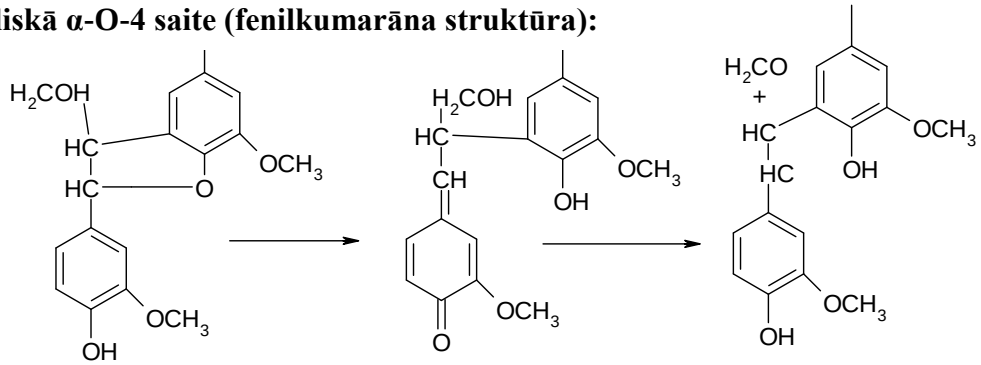
** KL – *kraft* lignīns;

*** *MWL* – maltas koksnes lignīns

Veicot delignifikāciju sārmainā vidē, notiek lignīna depolimerizācija, kas izraisa OH_{fenola} satura palielināšanos (salīdzinot ar *in situ* lignīnu). Iespējamo reakciju shēmas *kraft* procesā ir parādītas 3.13.attēlā.







3.13. att. **Ēterisko saišu sašķelšana sārmainā vidē (*kraft* procesā)**

Funkcionālās analīzes rezultāti apstiprina, ka tehniskajiem lignīniem ir augstāks fenola hidroksilgrupu saturs, salīdzinot ar *MWL* lignīnu (skuju koku koksnes *kraft*- lignīni un

skojkoksnes *MWL*). Fenola hidroksilgrupu saturs ievērojami atšķiras no dažādiem avotiem iegūtajiem lignīniem (3.5. tabula). Augstākais šo grupu saturs ir novērots no lapkoku koksnes izdalītajiem lignīniem. Ar sārmu un *kraft* metodē izdalītajiem lapkoku koksnes lignīniem ir tuvs fenola hidroksilgrupu saturs. No kaņepēm un kviešu salmiem izdalītajiem lignīniem šo grupu saturs ir viszemākais.

3.5. tabula.

Tehnisko lignīnu funkcionālo grupu saturs

Tehniskais lignīns	**-OH_{fenola}, %[a]**	**-OH_{fenola} uz FPV[b]**	**-OCH_3, %[a]**	**-OCH_3 uz FPV[b]**
Oša SL*	4,6±0,2	0,54±0,02	16,3±0,2	1,05±0,013
Melnalkšņa SL*	4,7±0,2	0,55±0,02	11,2±0,3	0,72±0,019
Abakas SL*	4.3±0,10	0,51±0,010	16,2±0,4	1,04±0,03
Džutas SL*	3,3±0,10	0,39±0,010	9, 5±0.5	0,61±0,03
Cukurniedru SL*	3,0±0,10	0,35±0,010	12,7±0.2	0,81±0,014
Kaņepju SL*	2,1±0,10	0,25±0,010	15,6±0.3	1,00±0,019
Linu SL*	2.5±0,10	0,29±0,010	8,1±0.4	0,52±0,03
Sizala SL*	3,2±0,3	0,38±0,04	14,1±0.2	0,91±0,013
Kviešu salmu SL	2,2±0,3	0,26±0,04	9,8±0.3	0,63±0,019
Etanola ražošanas no kviešu salmiem blakusprodukta sārmā šķīstoša frakcija	2,4±0,2	0,28±0,02	8,8±0,2	0,56±0,013
Skuju koku KL**	3,8±0,10	0,45±0,010	11,5±0,3	0,74±0,019
Skuju koku KL**-*LignoBoost*	3,7±0,10	0,44±0,010	13,4 ± 0,4	0,86±0,03
Lapkoku KL** *LignoBoost*	4,1±0,10	0,48±0,010	18,9±0,7	1,21±0,05
Skuju koku *MWL****	2,8±0,10	0,33±0,010	15,6±0,4	1,00±0,03

[a] Masas procenti

[b] FPV – fenilpropāna vienība, tās molekulmasa ir pieņemta par 200 $g \cdot mol^{-1}$

* SL- sārma lignīns;

** KL – *kraft* lignīns;

*** *MWL* – maltas koksnes lignīns

Metoksilgrupu satura dažādība (3.5. tabula) ir saistīta ar paraugu botānisko izcelsmi, bet tā var arī raksturot kondensācijas pakāpi. Gvajacil-tipa fenola savienojumi dominē lignīnos, kas ir izdalīti no egles, kaņepēm, liniem un kviešu salmiem. Ievērojams daudzums H-produktu ir novērots ne tikai lignīnos, kas ir izolēti no viendīgļlapju augiem (kviešu salmi, cukurniedres, abaka), bet arī no kaņepēm (divdīgļlapju augs). Tas sakrīt ar literatūras datiem, kas parāda, ka kaņepju lignīnam *in situ* ir atrastas H-lignīna vienības (2% no tipiskajiem lignīna izcelsmes savienojumiem), bet no kaņepēm izolētajam lignīnam šo produktu saturs ir 9% no lignīna pirolīzes produktiem (3.6. tabula). Lapkoku koksnes lignīns tiek raksturots ar lielāku metoksilētu lignīna atvasinājumu saturu (S un G vienības) (3.6. tabula). G un S produktu relatīvais saturs raksturo struktūrvienību saturu lignīnā, kas satur *o*-metoksilgrupas (3.6. tabula).

3.6. tabula

Fenola savienojumu bez metoksilgrupām (H-), ar vienu (G-) vai divām (S-) *o*- metoksilgrupām relatīvais saturs, % lignīna izcelsmes termiskās degradācijas produktos

Tehniskais lignīns	H-fenoli	G-fenoli	S-fenoli	G- un S- fenolu summa
Oša SL*	3,1±0,10	30,0±0,8	66,9±0,8	96,9±1,1
Melnalkšņa SL*	3,9±0,10	31,3±1,1	64,7±0,9	96,1±0,7
Abakas SL*	15,8±0,6	12,1±0,8	72,2±0,8	84,3±0,5
Džutas SL*	14,0±0,8	37,4±0,9	48,6±0,9	86,0±0,7
Cukurniedru SL*	22,7±0,9	45,5±1,1	31,9±0,5	77,3±0,4
Kaņepju SL*	23,4±1,4	58,0±1,9	18,6±0,6	76,6±0,8
Linu SL*	12,2±0,6	67,7±0,8	20,1±0,7	87,8±0,4
Sizala SL*	13,7±0,7	25,6±0,6	60,8±0,5	86,3±0,7
Kviešu salmu SL	21,2±0,6	55,2±0,9	23,6±0,7	78,8±0,9
Etanola ražošanas no kviešu salmiem blakusprodukta sārmā šķīstoša frakcija	6,2±0,4	56,5±0,5	37,3±0,8	93,8±0,4
Skuju koku KL**	13,5±0,3	85,2±0,5	1,40±0,05	86,5±0,7
Skuju koku KL**-*LignoBoost*	11,8±0,4	88,1±0,7	0,10±0,03	88,2±0,7
Lapkoku KL**-*LignoBoost*	4,1±0,3	26,8±0,4	69,1±1,1	95,9±0,6
Skuju koku *MWL****	10,0±0,3	90,0±0,4	n.d.	90,0±0,5

* SL- sārma lignīns;

** KL – *kraft* lignīns;

*** *MWL* – maltas koksnes lignīns

n.d. – nav detektēts

Laboratorijā ar sārmu izdalītajiem lignīnu saturošajiem produktiem G- un S-fenolu summa ir lielāka nekā tehniskajam *LigmoBoost kraft* lignīnam, kas izdalīts no lapkoku koksnes. Starp pētāmajiem lignīniem augstākais pirolīzes produktu saturs, kas satur skābekli saturošus aizvietotājus sānķēdēs (karbonil-, aldehīd-, hidroksilgrupas), ir raksturīgs oša un melnalkšņa sārma lignīniem, kā arī egles *MWL* lignīnam. Augstāks FPV saturs ar -CH_2 grupu sānķēdes α–stāvoklī ir raksturīgs lapkoku koksnes lignīniem, kā arī skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīnam.

3.7. tabula

Dažādu savienojumu relatīvais saturs (%) lignīna izcelsmes termiskās degradācijas produktos (ar standartnovirzēm)

Tehniskais lignīns	Lignīna izcelsmes pirolīzes produktu struktūras īpašība			
	CH_2- grupas sānķēdes α-stāvoklī	**Skābekli saturošas grupas sānķēdē**	**Dubultsaites sānķēdes α-stāvoklī**	**$(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$**
Oša SL*	36,2±0,7	21,7±0,3	15,6±0,3	9,0±0,2
Melnalkšņa SL*	31,3±0,9	22,1±0,3	18,3±0,2	6,2±0,2
Abakas SL*	13,6±0,6	8,1±0,3	18,4±0,2	2,6±0,2
Džutas SL*	18,2±0,9	9,0±0,4	20,2±0,2	3,4±0,10
Cukurniedru SL*	17,6±0,5	10,0±0,2	27,7±0,10	4,1±0,10
Kaņepju SL*	29,0±0,9	4,8±0,10	19,7±0,4	4,3±0,10
Linu SL*	19,8±0,7	4,4±0,3	13,3±0,4	3,2±0,10
Sizala SL*	16,5±0,2	5,9±0,2	18,7±0,4	3,8±0,10
Kviešu salmu SL	20,9±0,5	4,1±0,2	31,8±0,4	4,6±0,3
Etanola ražošanas no kviešu salmiem blakusprodukta sārmā šķīstoša frakcija	16,3±0,5	5,7±0,2	31,6±0,3	5,7±0,2
Skuju koku KL**	10,7±0,4	9,9±0,3	7,8±0,5	7,3±0,4
Skuju koku KL**-*LignoBoost*	36,9±0,3	13,7±0,5	12,3±0,4	3,2±0,4
Lapkoku KL**-*LignoBoost*	37,3±0,3	8,3±0,3	20,8±0,7	3,1±0,4
Skuju koku *MWL****	32,5±0,4	22,2±0,7	11,0±0,3	3,9±0,4

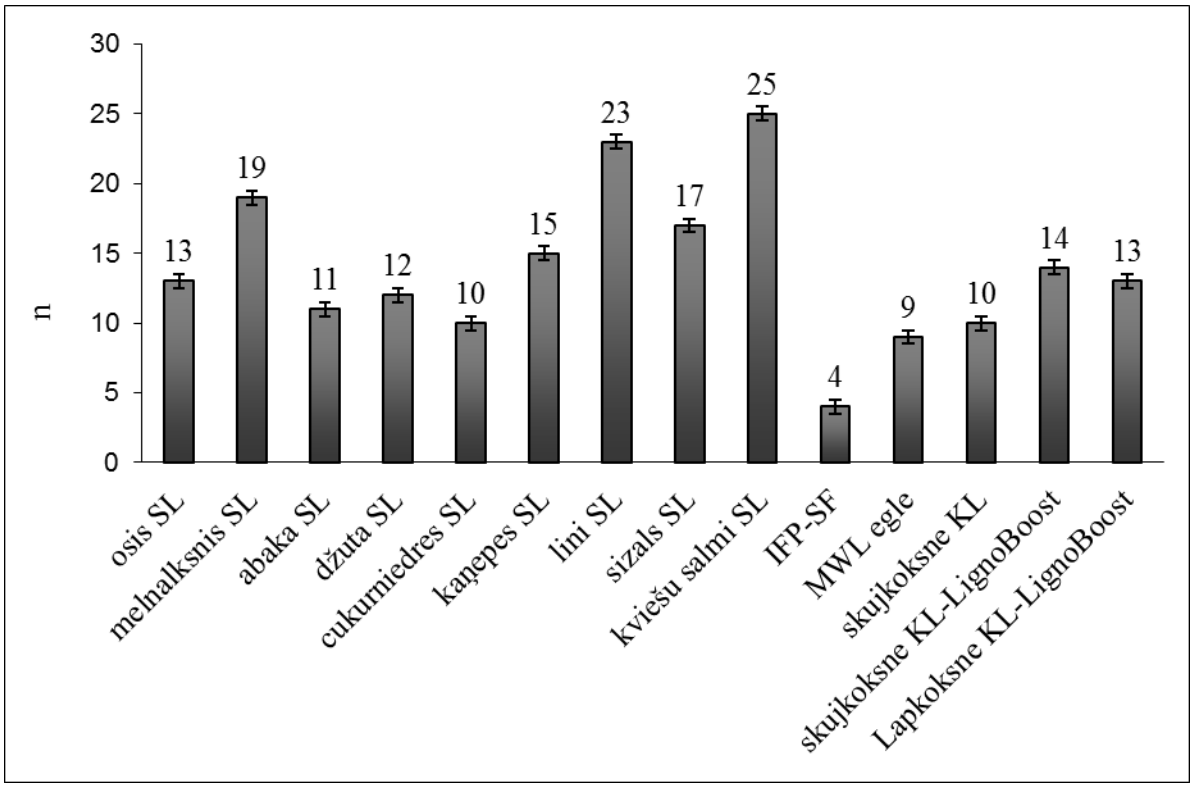
* SL- sārma lignīns;

** KL – *kraft* lignīns;

*** MWL – maltas koksnes lignīns

Tradicionālajā *kraft* procesā iegūtajam skuju koku koksnes lignīnam pēc pirolīzes ir daudz lielāks savienojumu ar saīsināto sānķēdi saturs, salīdzinot ar *LignoBoost kraft* lignīnu.

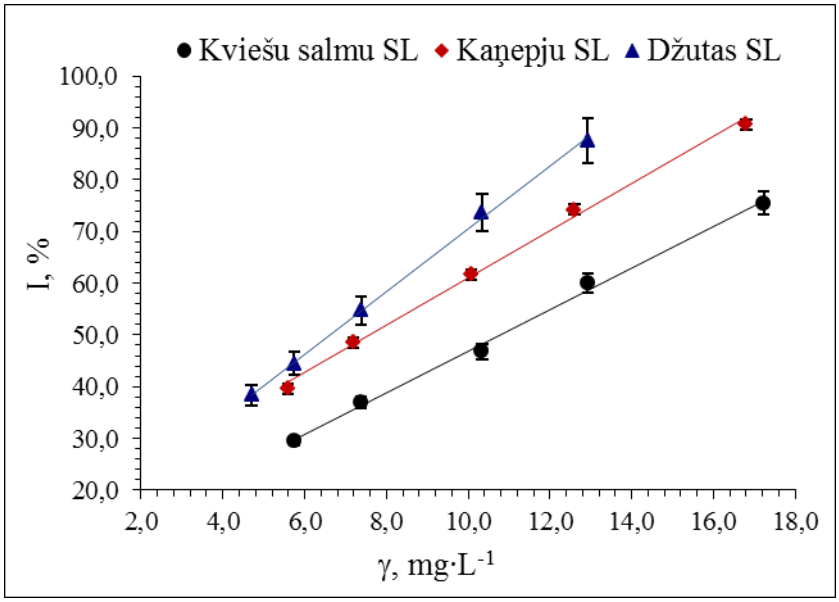
Tehniskie lignīni tiek raksturoti ar polikonjugēto π-saišu sistēmu veidošanos to makromolekulās. Šādu sistēmu piemēri ir stilbēni **(64)** un diarili **(65)**. Polikonjugēto sistēmu īpašība ir paramagnētisko centru klātbūtne ar augstu stabilitāti, kam var būt svarīga loma brīvo radikāļu dezaktivēšanā. Visiem pētāmajiem lignīniem ir intensīvs šaurais EPR spektrs-singlets, ar g-faktoru ~ 2,0030 un līnijas platumu ~ 0,3 – 0,5 mT, kas ir raksturīgs nesapārotam elektronam, kas ir lokalizēts konjugēta polimēra matricā. No EPR spektriem ir aprēķināts polikonjugēto sistēmu izmērs, n – atomu skaits, kas iekļauts nesapārota elektrona delokalizācijā (3.14. att.). Vislielākais konjugēto sistēmu izmērs ir kviešu salmu un linu sārma lignīniem. Tradicionalajā *kraft* procesā no skuju kokiem iegūtajam lignīnam konjugācijas sistēmu izmērs ir mazāks.



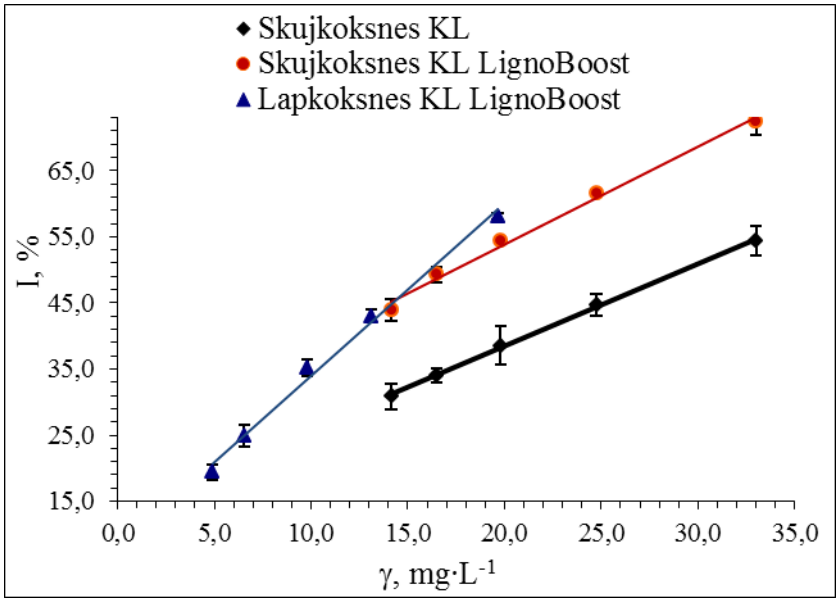
3.14. att. **π-konjugēto sistēmu izmērs (n-atomu skaits, kas iekļauts nesapārota elektrona delokalizācijā)**

SL - sārma lignīns; KL – *kraft* lignīns; SF – sārmā šķīstoša frakcija; *MWL* – maltās koksnes lignīns; IFP-SF – etanola ražošanas no kviešu salmiem blakusprodukta (saņemts no *IFP – Institute of France Petroleum*) sārma frakcija.

Lignīns ir polimērs ar struktūru, kuru nevar precīzi definēt, tāpat nevar izmantot konkrētu molekulmasas vērtību. Tāpēc antioksidatīvas aktivitātes pētījumos izmanto masas koncentrācijas, līdzīgi kā daudziem sarežģīta sastāva polifenolu ekstraktiem, molekulmasas definīcija nav iespējama. Ir izpētīta $ABTS^{\bullet+}$ un $DFPH^{\bullet}$ radikāļu dezaktivēšana atkarībā no lignīnu produktu koncentrācijas. Šīs sakarības ir lineāras. Skat. piemēru 3.15. attēlā un 3.16. attēlā. Visu iegūto regresijas vienādojumu R^2 vērtības ir lielākas par 0,99.



3.15. att. **$ABTS^{\bullet+}$ katjonradikāļu inhibēšanas (I) atkarība no kviešu salmu, kaņepju vai džutas sārma lignīnu (SL) masas koncentrācijām (γ)**



3.16. att. **$DFPH^{\bullet}$ radikāļu inhibēšanas (J) atkarība no dažādu *kraft* lignīnu (KL) masas koncentrācijām (γ)**

Antioksidanto aktivitāti $ABTS^{\bullet+}$ un $DFPH^{\bullet}$ testos bieži izsaka kā IK_{50}, $mg \cdot L^{-1}$, kas parāda, kāda antioksidanta koncentrācija ir nepieciešama, lai uz pusi samazinātu radikāļu koncentrāciju (3.8. tabula.).

3.8. tabula

Tehnisko lignīnu antioksidatīva aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ un $DFPH^{\bullet}$ testos, izteikta kā IK_{50}

Tehniskais lignīns	IK_{50}, $mg \cdot L^{-1}$	
	$ABTS^{\bullet+}$	$DFPH^{\bullet}$
Oša SL*	5,3±0,10	17,0±0,3
Melnalkšņa SL*	5,9±0,10	19,7±1,2
Abakas SL*	4,9 ± 0,3	36,4±1,3
Džutas SL*	6,6±0,10	58,7±0,9
Cukurniedru SL*	9,4±0,2	129,3±4,5
Kaņepju SL*	7,6±0,3	93,4±0,9
Linu SL*	7,1±0,4	28,5±0,7
Sizala SL*	4,6±0,9	45,7±0,9
Kviešu salmu SL	10,8±0,3	174,0±3,2
Etanola ražošanas no kviešu salmiem blakusprodukta sārmā šķīstoša frakcija	7,2±0,10	42,1±0,3
Skuju koku KL**	6,1±0,2	29,3±0,8
Skuju koku KL**-*LignoBoost*	3,8 ±0,2	17,4±0,5
Lapkoku KL**-*LignoBoost*	4,8±0,10	15,0±0,6
Skuju koku *MWL****	20,2±0,6	98 ±5,2
Troloks	4,01±0,07	4,66 ±0,07

* SL- sārma lignīns;

** KL – *kraft* lignīns;

*** *MWL* – maltas koksnes lignīns

Lielāka aktivitāte ir sizala, abakas un oša sārma lignīniem, kas korelē ar fenola hidroksilgrupu un *o*-metoksilgrupu augsto saturu. IK_{50} parametram ir svarīga nozīme praktiskai izmantošanai, taču to nevar izmantot struktūras-aktivitātes pētījumos. Lai veiktu struktūras-aktivitātes sakarību pētījumus, ir atrasti radikāļu dezaktivēšanas indeksi – RDI, kas parāda dezaktivēto $ABTS^{\bullet+}$ katjonradikāļu vai $DFPH^{\bullet}$ radikāļu molu skaitu uz 1 molu fenola hidroksilgrupu (3.9. tabula.).

3.9. tabula

Fenola hidroksilgrupu saturs tehniskajos lignīnos (OH fenola, mol•g^{-1}) un to antioksidatīva aktivitāte ABTS$^{\bullet+}$ testā, izteiktā kā dezaktivēto radikāļu skaits uz 1 g parauga (dezaktivēti ABTS$^{\bullet+}$, mol•g^{-1}) vai uz 1 molu fenola hidroksilgrupu (RDI)

Tehniskais lignīns	OH fenola, mol•g^{-1}	Dezaktivēti ABTS$^{\bullet+}$, mol•g^{-1}	RDI
Oša SL*	0,0027	0,0032	1,19±0,08
Melnalkšņa SL*	0,0028	0,0029	1,04±0,07
Abakas SL*	0,0025	0,0035	1,37±0,12
Džutas SL*	0,0019	0,0026	1,33±0,06
Cukurniedru SL*	0,0018	0,0018	1,02±0,06
Kaņepju SL*	0,0012	0,0022	1,81±0,17
Linu SL*	0,0015	0,0026	1,63±0,17
Sizala SL*	0,0019	0,0035	1,96±0,23
Kviešu salmu SL	0,0013	0,0016	1,22±0,23
Etanola ražošanas no kviešu salmiem blakusprodukta sārmā šķīstoša frakcija	0,0014	0,0024	1,67±0,18
Skuju koku KL**	0,0022	0,0028	1,25±0,08
Skuju koku KL**-*LignoBoost*	0,0022	0,0045	2,06±0,17
Lapkoku KL**-*LignoBoost*	0,0024	0,0035	1,47±0,07
Skuju koku *MWL****	0,0018	0,0008	0,51±0,04
Troloks	0,004	0,0042	1,1±0,12

* SL- sārma lignīns;

** KL – *kraft* lignīns;

*** *MWL* – maltas koksnes lignīns.

RDI parāda, ka reakcijā ar antioksidantu dezaktivēto ABTS$^{\bullet+}$ katjonradikāli molu skaits ir lielāks, nekā fenola hidroksilgrupu skaits. Tas nozīme, ka produktiem, kas veidojas no lignīniem pēc mijiedarbības ar ABTS$^{\bullet+}$, arī piemīt antioksidatīva aktivitāte. Augstākā aktivitāte (2,0) testā ar ABTS$^{\bullet+}$ katjonradikāļiem ir skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīnam. Sizala sārma lignīnam dezaktivēto radikāļu molu skaits ir gandrīz divas reizes lielāks nekā fenola hidroksilgrupu skaits. Citi lignīni ar augstu ABTS$^{\bullet+}$/OH$_{fenola}$ attiecību (RDI) ir kaņepju, linu tehniskie lignīni un etanola ražošanas no kviešu salmiem blakusprodukta sārma frakcija (3.9. tabula.). Šo lignīnu struktūras kopēja īpašība ir vienlaicīgi zems ogļhidrātu degradācijas produktu saturs, zems lignīna pirolīzes produktu saturs ar

skābekli saturošām grupām sānķēdēs, relatīvi liels produktu saturs ar nedegradēto propāna sānķēdi.

Antioksidatīvas aktivitātes testēšanas rezultāti ar DFPH$^{\bullet}$ radikāļiem ir doti 3.10. tabulā. Šajā testā pētāmo lignīna produktu antioksidatīva aktivitāte ir daudz zemāka, salīdzinot ar ABTS$^{\bullet+}$ testu, jo viens grams parauga spēj dezaktivēt mazāku radikāļu molu skaitu. Ir redzams, ka pārsvarā fenola hidroksilgrupu molu skaits ir lielāks nekā dezaktivēto DFPH$^{\bullet}$ radikāļu skaits (iepriekšējā testā bija otrādi). Diarilheptanoīdi, kas ir lignīniem radniecīgie polifenoli, reaģē ar ABTS$^{\bullet+}$ un DFPH$^{\bullet}$ radikāļiem pēc dažādiem mehānismiem. Acīmredzot, arī lignīnu gadījumā šajās reakcijās ir dažādi mehānismi, un spēju dezaktivēt ABTS$^{\bullet+}$ un DFPH$^{\bullet}$ radikāļus ietekmē dažādas struktūras īpašības. Kā bija parādīts diarilheptanoīdu gadījumā, DFPH-H ir salīdzinoši zema *BDE* vērtība. Lai reakcija ar šo radikāli notiktu, fenola O-H *BDE* vērtībai jābūt zemākai. Acīmredzot, ne visas lignīna fenola OH grupas atbilst šai prasībai. Piemēram, karbonilgrupas alifātiskajā ķēdē palielina *BDE*.

3.10. tabula

Fenola hidroksilgrupu saturs tehniskajos lignīnos (OH fenola, mol•g^{-1}) un to antioksidatīva aktivitāte DFPH$^{\bullet}$ testā, izteiktā kā dezaktivēto radikāļu skaits uz 1 g parauga (dezaktivēti DFPH$^{\bullet}$, mol•g^{-1}) vai uz 1 molu fenola hidroksilgrupu (RDI)

Tehniskais lignīns	OH fenola, mol•g^{-1}	Dezaktivēti DFPH$^{\bullet}$, mol•g^{-1}	RDI
Oša SL*	0,0027	0,0029	1,09±0,07
Melnalkšņa SL*	0,0028	0,0025	0,92±0,10
Abakas SL*	0,0025	0,0014	0,54±0,04
Džutas SL*	0,0019	0,0009	0,44±0,02
Cukurniedru SL*	0,0018	0,0004	0,22±0,010
Kaņepju SL*	0,0012	0,0005	0,43±0,03
Linu SL*	0,0015	0,0018	1,19±0,08
Sizala SL*	0,0019	0,0011	0,58±0,07
Kviešu salmu SL	0,0013	0,0003	0,22±0,04
Etanola ražošanas no kviešu salmiem blakusprodukta sārmā šķīstoša frakcija	0,0014	0,0012	0,84±0,08
Skuju koku KL**	0,0022	0,0017	0,76±0,05
Skuju koku KL**-*LignoBoost*	0,0022	0,0029	1,32±0,08

3.10. tabulas turpinājums

Tehniskais lignīns	OH fenola, $mol \cdot g^{-1}$	Dezaktivēti DFPH$^{\bullet}$, $mol \cdot g^{-1}$	RDI
Lapkoku KL**-*LignoBoost*	0,0024	0,0033	1,38±0,10
Skuju koku MWL***	0,0018	0,0005	0,31±0,03
Troloks	0,004	0,011	2,7±0,3

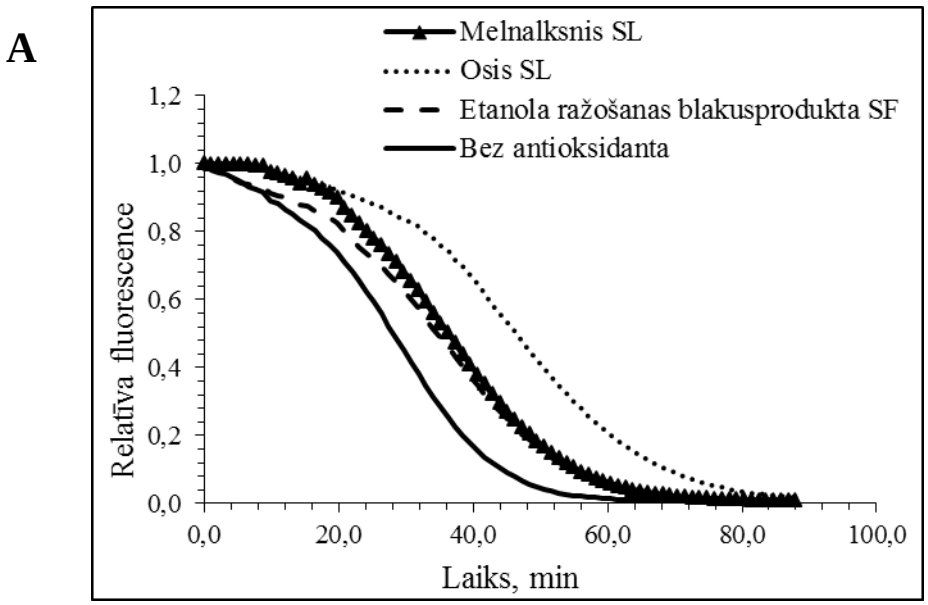
* SL- sārma lignīns;

** KL – *kraft* lignīns;

*** *MWL* – maltas koksnes lignīns.

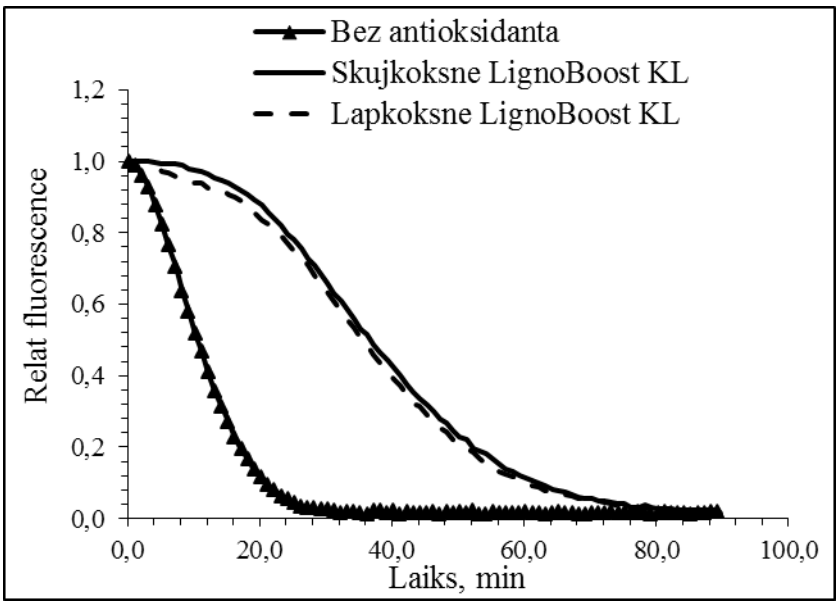
LignoBoost kraft lignīnu un linu sārma lignīna RDI vērtība, atšķirībā no pārējiem, ir >1. Tas norāda uz visu šo savienojumu sastāvā esošo fenola OH grupu zemām *BDE* vērtībām.

Skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitātes (*ORAC*) testa rezultāti ir redzami 3.17. attēlā. Antioksidantu koncentrācija reakcijas maisījumā bija 0,0025 % (w/v). Šajā testā tika veikti antioksidantu un peroksilradikāļu reakcijas kinētikas pētījumi.



3.17. att. **Fluorescīna oksidēšanas kinētiskās līknes ar ROO$^{\bullet}$ bez antioksidanta, sārma lignīnu (A) un *kraft* lignīnu (B) klātbūtnē**

B



3.17. att. **Fluorescīna oksidēšanas kinētiskās līknes ar ROO˙ bez antioksidanta, sārma lignīnu (A) un *kraft* lignīnu (B) klātbūtnē**

SF – sārmā šķīstošā frakcija

Lignīna produktu klātbūtnē palielinās laiks, pēc kura sākas substrāta intensīva oksidēšanās. Augstāko aktivitāti šajā testā uzrādīja *LignoBoost kraft* lignīni. No Troloksa kalibrēšanas līknes iegūtā regresijas vienādojuma atrod Troloksa koncentrāciju (mmol•L^{-1}), kas atbilst tādai pašai *net AUC* vērtībai, un aprēķina, cik Troloksa mmol ekvivalentiem atbilst 1 g pētāmā parauga.

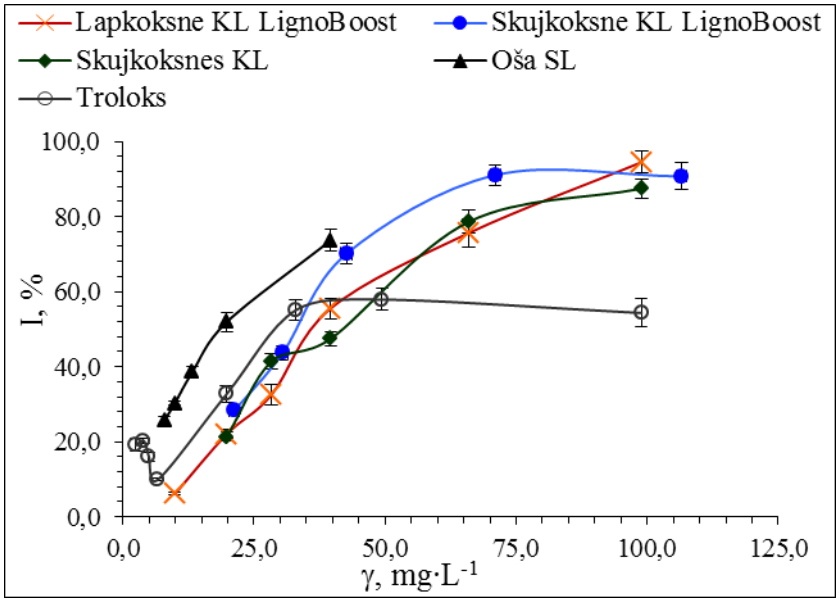
3.11. tabula

Tehnisko lignīnu antioksidatīva aktivitāte *ORAC* testā, mmol TE•g^{-1}

Lignīna paraugs	mmol TE•g^{-1}
Oša sārma lignīns (SL)	6,9±0,4
Melnalkšņa sārma lignīns (SL)	2,5±0,3
Etanola ražošans no kviešu salmiem blakusprodukta sārmā šķīstoša frakcija	2,1±0,3
Skuju koku *kraft* (KL) *LignoBoost*	5,8 0,3
Lapkoku *kraft* (KL) *LignoBoost*	5,6±0,5
Troloks	4,0±0,3

Šajā testā augstāka aktivitāte ir oša sārma lignīnam, kas parāda tā augsto antioksidatīvo potenciālu bioloģiskajās sistēmās.

Atšķirībā no mazmolekulārajiem fenoliem un Troloksa **(68)**, tehniskie lignīni spēj par 90% (vai vairāk) samazināt superoksīda anjonradikāļa $O_2^{\bullet-}$ koncentrāciju.



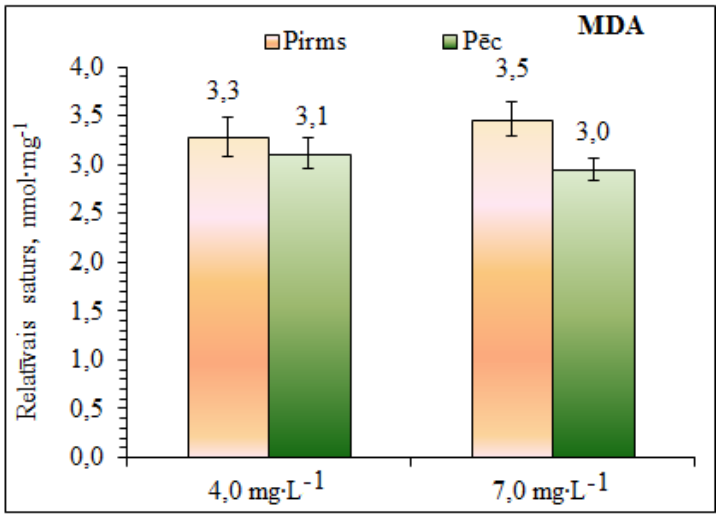
3.18. att. **$O_2^{\bullet-}$ inhibēšana (I), atkarībā no antioksidanta masas koncentrācijas (γ)**

KL- *kraft* lignīns; **SL** – sārma lignīns

Oša sārma lignīnam ir visaugstākā aktivitāte šajā testā, kas sakrīt ar *ORAC* testa rezultātiem. Oša sārma lignīna augstā aktivitāte testos ar skābekļa aktīvajām formām parāda, ka tas ir perspektīvs antioksidants izmantošanai veselības aprūpē. Lielmolekulārie polifenoli salīdzinājumā ar mazmolekulārajiem ir mazāk toksiski [80].

Lai pārbaudītu oša sārma lignīna ietekmi uz asins bioķīmiskajiem rādītājiem, ir veikti 49 sērijtesti *in vitro*. Pētījumā izmantoja asinis, kas tika ņemtas no pacientiem ar hiperglikēmijas diagnozi. Šie pacienti izgāja ārstniecisko kursu Kosmētiski ārstnieciskajā un dietoloģijas centrā. Vēl eksperimentā piedalījās brīvprātīgie ar diagnozi – dismetabolisms. Kontrolei izmantoja asinis no donoriem ar normālu metabolisma gaitu. Visi asins parametri tika noteikti gan pirms, gan pēc diarilheptanoīdu pievienošanas. Pētījumi ir veikti uz RSU eirosertificētas laboratorijas bāzes sadarbībā ar Cilvēka bioķīmijas un fizioloģijas katedru. Malondialdehīds (MDA) ir viens no lipīdu oksidēšanās galaproduktiem, tā koncentrācija asins plazmā ir lipīdu peroksidācijas intensitātes rādītājs. MDA koncentrācija asins plazmā samazinājās pēc inkubēšanas gan ar baltalkšņa mizas etilacetāta ekstraktu, gan ar oregonīnu **(42)** (3.19. att.). MDA norma ir < 3,25 nmol•ml^{-1}, tā koncentrācijas palielināšanās asinīs izraisa dažādus deģeneratīvus procesus, piemēram, aterosklerozes agresīvo attīstību. Pētījumi par oša sārma lignīna ietekmi uz asins bioķīmiskajiem rādītājiem parādīja, ka pēc inkubēšanas ar oša sārma lignīna šķīdumu (fizioloģiskajā šķīdumā) dažādās koncentrācijās,

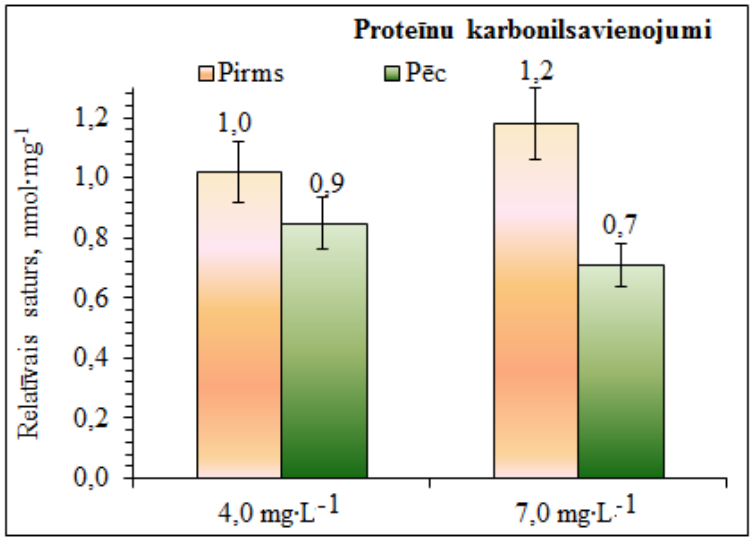
samazinās malondialdehīda koncentrācija asins plazmā. Izrādījās arī, ka lignīna preparāta ievadīšana nemaina asins pH.



3.19. att. **Malondialdehīda saturs (nmol•mg^{-1}) asins plazmā pirms un pēc inkubēšanas ar dažādas koncentrācijas oša sārma lignīna šķīdumu**

Proteīnu aldehīdi un ketoni rodas olbaltumvielu oksidēšanās rezultātā. Ar olbaltumvielu oksidējamības aktivāciju ir saistīts arterosklerozes attīstības periods, Alcheimera un Parkinsona slimības. Proteīnu karbonilsavienojumu norma ir < 0,70 nmol•mg^{-1}.

Inkubēšanā ar oša sārma lignīna šķīdumu (lignīns izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā, izmantojot speciāli izstrādātu metodi) samazina proteīnu aldehīdu un ketonu, kas ir olbaltumvielu oksidēšanās rādītājs, saturu asinīs (skat. 3.20. att.).



3.20. att. **Proteīnu oksidēšanās produktu saturs (nmol•mg^{-1}) asinīs pirms un pēc inkubēšanas ar dažādas koncentrācijas oša sārma lignīna šķīdumiem**

Struktūras-aktivitātes sakarību noskaidrošanai izmanto $DFPH^{\bullet}$ un $ABTS^{\bullet+}$ testu rezultātus. 3.12. tabulā ir parādītas pāru korelācijas starp noteiktām struktūras īpašībām un antioksidatīvo aktivitāti.

3.12. tabula

Pirsona korelācijas koeficienti starp dažādiem parametriem, kas raksturo lignīnu struktūras īpašības, un antioksidanto aktivitāti $ABTS^{\bullet+}$ un $DFPH^{\bullet}$ testos

Struktūras parametrs	Pirsona korelācijas koeficients (n=13, α=0,05)*	
	$DFPH^{\bullet}$ tests	$ABTS^{\bullet+}$ tests
G+S fenolu relatīvais saturx, %	**0,83**	-0,03
CH_2- grupas sānķēdes α-stāvoklī, %	**0,64**	0,11
Skābeklī saturošas grupas sānķēdē, %	0,42	-0,46
π-konjugēto sistēmu izmērs	-0,15	-0,05
Metoksilgrupas, moli uz FPV	0,38	0,11
Dubultsaites, sānķēdes α-stāvoklī, %	-0,28	-0,23
Ogļhidrātu relatīvais saturs, %	-0,38	**-0,71**
$(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$	0,11	-0,44
M_w	0,40	0,16
M_w/M_n	-0,04	0,08

***Statistiski nozīmīgās korelācijas vērtības ir izdalītas treknrakstā**

Pētāmajiem lignīniem $DFPH^{\bullet}$ testā ir atrasta nozīmīga pozitīva pāru korelācija starp antioksidatīvo aktivitāti un (G+S) fenolu saturu, kā arī nepiesātināto neaizvietoto alkilsānķēžu saturu. Tas atbilst lignīna modeļvielu un citu zemmolekulāro fenolu pētījumu rezultātiem. $ABTS^{\bullet+}$ testā šie parametri neietekmē antioksidatīvo aktivitāti. Šaja testā ir atrasta nozīmīga negatīva pāru korelācija starp ogļhidrātu saturu un antioksidatīvo aktivitāti. Tas parāda, ka lignīni reaģē ar $DPPH^{\bullet}$ un $ABTS^{\bullet+}$ radikāļiem pēc dažādiem mehānismiem. Arī diarilheptanoīdiem ir parādīts svarīgs *SPLET* mehānisma ieguldījums reakcijā ar $ABTS^{\bullet+}$ radikāļiem, bet reakcija ar $DPPH^{\bullet}$ radikāļiem notiek pēc *PCET* mehānisma.

3.4.2. Pirolīzes lignīni

Saskaņā ar literatūras datiem, pirolīzes lignīniem ir zemas molekulmasas, un tie salīdzinājumā ar citiem lignīniem ir lipofīlāki [178].

Izmantojot *Py-GC-MS-FID* analīzes metodi, pēc termiskās degradācijas produktu sastāva un dažādas izcelsmes savienojumu relatīvā satura (% no visiem degradācijas produktiem) var spriest par izejas parauga sastāvu (3.13. tabula).

3.13. tabula

Dažādas izcelsmes produktu relatīvais saturs (%) pirolīzes lignīnu (PyL) termiskās degradācijas produktos

Tehniskais lignīns	Lignīna degradācijas produkti	Ogļhidrātu degradācijas produkti	Ekstraktvielu degradacijas produkti
Alkšņa PyL	80,0±0,9	18,1±0,4	1,9±0,10
Oša PyL	83,2±1,4	15,5±0,5	1,3±0,10
Apses PyL	75,9±0,7	23,8±0,8	0,20±0,010
Jauktās lapkoku koksnes PyL	81,7±0,8	16,5±0,8	1,8±0,05
Skuju koku PyL	75,6±0,9	21,0±0,4	3,4±0,05

Salīdzinot ar citiem lignīniem, pirolīzes lignīnos ir augsts fenola hidroksilgrupu saturs (3.14. tabula). Noteiktais fenola hidroksilgrupu saturs sakrīt ar [177] datiem. Tiem ir arī lielāks atomu skaits, kas iekļauts nesapārota elektrona delokalizācijā.

3.14. tabula

Pirolīzes lignīnu (PyL) funkcionālo grupu saturs (%) un π-konjugēto sistēmu izmērs

Pētamais lignīna paraugs	-OH_{fenola} saturs, %[a]	-OH_{fenola} uz FPV[b]	-OCH_3 saturs, %[a]	-OCH_3 uz FPV[b]	π-konjugēto sistēmu izmērs
Alkšņa PyL	7,1±0,3	0,84±0,04	10,9±0,11	0,70±0,007	30
Oša PyL	7,3±0,2	0,86±0,02	12,2±0,12	0,79±0,008	30
Apses PyL	6,1±0,2	0,72±0,02	9,80±0,09	0,63±0,006	26
Jauktas lapkoku koksnes PyL	6,6±0,3	0,78±0,04	10,7±0,11	0,69±0,007	26
Skuju koku PyL	6,0±0,2	0,71±0,02	8,6±0,09	0,55±0,006	26

[a] Masas procenti

[b] FPV – fenilpropāna vienība, tās molekulmasa ir pieņemta par 200 $g \cdot mol^{-1}$

Izmantojot *Py-GC-MS-FID* analīzes datus, ir raksturotas lignīnu struktūras īpašības, kurām var būt svarīga loma to antioksidatīvajā aktivitātē (3.15. tabulas dati). G+S produktu summa raksturo *o*-metoksilgrupas saturošu fenilpropāna vienību (FPV) daudzumu.

3.15. tabula

Dažādu savienojumu relatīvais saturs (%) lignīna izcelsmes termiskās degradācijas produktos (ar standartnovirzēm)

Tehniskais lignīns	Lignīna izcelsmes pirolīzes produktu struktūras īpašība				
	G+S fenoli	CH_2- grupas sānķēdes α-stāvoklī	Skābekli saturošas grupas sānķēdē	Dubultsaites sānķēdes α-stāvoklī	$(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$
Alkšņa PyL*	90,1±0,9	22,8±0,2	8,3±0,7	16,8±0,2	1,3±0,3
Oša PyL*	89,5±0,4	24,8±0,4	9,0±0,7	17,3±0,5	1,3±0,3
Apses PyL*	88,2±0,5	26,7±0,3	7,7±0,3	20,4±0,7	1,8±0,10
Jauktas lapkoku koksnes PyL*	90,3±0,3	21,3±0,4	13,5±0,7	16,7±0,4	1,1±0,3
Skuju koku PyL*	87,6±0,3	28,7±0,5	6,8±0,6	15,7±0,6	1,8±0,2
Skuju koku MWL **	85,5±0,4	32,5±0,6	22,2±0,3	11,0±0,3	3,9±0,3

* SL- sārma lignīns;

** KL – *kraft* lignīns;

*** *MWL* – maltas koksnes lignīns.

Rezultāti ir parādīti ar standartnovirzēm.

Metoksilgrupu saturs ir atkarīgs no parauga botāniskās izcelsmes un izdalīšanas metodes. Lapkoku lignīni (*kraft*, sārma) satur ~ 1 metoksilgrupu uz 1 FPV, skujkoku lignīni – 0,7 (skat. 3.5. tabulu). Pirolīzes lapkoku un skuju koku lignīniem šīs vērtības ir ievērojami zemākas. Pirolīzes lignīniem ir raksturīgs ievērojami lielāks atomu skaits, kas iekļauts nesapārota elektrona delokalizācijā. Vienlaicīgi, saskaņā ar *Py-GC-MS-FID* datiem, α–dubultsaišu saturs nav lielāks, salīdzinot ar citiem lignīniem. Tas liecina par ievērojamo bifenila struktūru saturu, kas palielina π-konjugēto sistēmu izmērus. Saskaņā ar literatūras datiem, pirolīzes lignīniem ir raksturīgs augsts kondensēto struktūru saturs. Pirolīzes lignīniem ir zemākas $(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$ vērtības, salīdzinot ar sārma, *kraft* un *MWL* lignīniem. Tas liecina par ievērojamu ēterisko saišu destrukciju pirolīzes lignīnos.

2,2’-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskābes ($ABTS^{\bullet+}$) katjonradikāļu dezaktivēšanas atkarība no pirolīzes lignīnu koncentrācijas ir lineāra. Saskaņā ar iegūtajiem rezultātiem (3.16. tabula) ne katra pirolīzes lignīna fenola hidroksilgrupa piedalās reakcijā ar $ABTS^{\bullet+}$ radikāļiem.

3.16. tabula

Pirolīzes lignīnu (PyL) antioksidatīva aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ testā, izteikta kā IK_{50}, un radikāļu dezaktivēšanas indekss (RDI)*

Pētamais lignīna paraugs	IK_{50}, $mg \cdot L^{-1}$	OH fenola, $mol \cdot g^{-1}$	Dezaktivēti $ABTS^{\bullet+}$, $mol \cdot g^{-1}$	RDI
Alkšņa PyL	5,2±0,2	0,0042	0,0033	0,78±0,07
Oša PyL	5,2±0,3	0,0043	0,0033	0,76±0,07
Apses PyL	6,5±0,2	0,0036	0,0026	0,73±0,05
Jauktas lapkoku koksnes PyL	6,7±0,4	0,0039	0,0025	0,65±0,07
Skuju koku PyL	6,7±0,2	0,0035	0,0025	0,72±0,05

* IK_{50}, parāda, kāda antioksidanta koncentrācija ir nepieciešama, lai uz pusi samazinātu radikāļu koncentrāciju, un radikāļu dezaktivēšanas indekss (RDI) parāda dezaktivēto radikāļu skaitu uz vienu OH_{fenola}

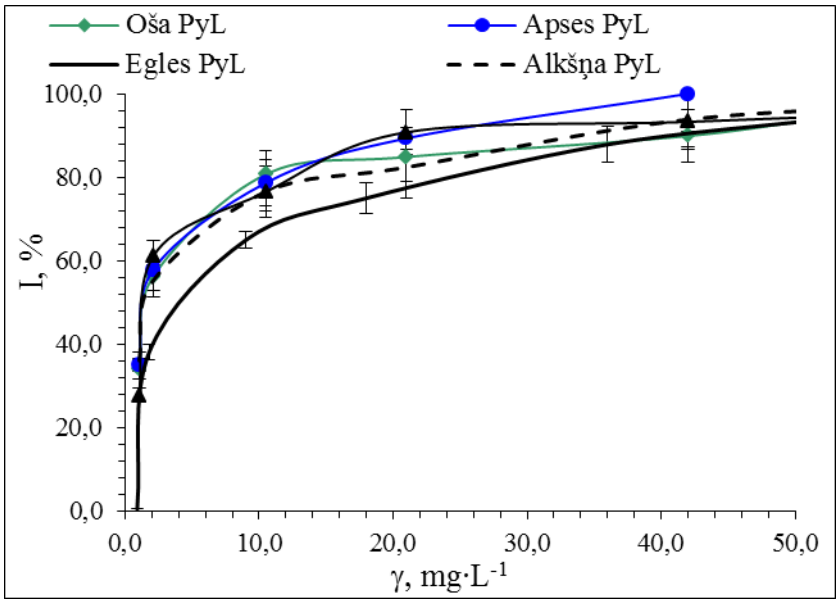
Pirolīzes lignīnu antioksidatīva aktivitāte $DFPH^{\bullet}$ testā, izteiktā gan kā IK_{50}, gan kā RDI (radikāļu skaits uz OH_{fenola}) ir tuva dažādu sārma lignīnu aktivitātei. Toties to aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ testā, izteikta kā RDI ($ABTS^{\bullet+}/OH_{fenola}$) ir zemāka, salīdzinot ar sārma un *kraft* lignīniem. Tas var būt saistīts ar salīdzinoši augstu ogļhidrātu saturu, kuram iepriekš šajā darbā ir parādīta ievērojama negatīva ietekme uz antioksidatīvo aktivitāti $ABTS^{\bullet+}$ testā un nav novērots tas pats efekts kā $DFPH^{\bullet}$ testā (3.17. tabula).

3.17. tabula

Pirolīzes lignīnu (PyL) antioksidatīva aktivitāte $DFPH^{\bullet}$ testā, izteiktā kā IK_{50} un radikāļu dezaktivēšanas indekss (RDI)

Tehniskais lignīns	IK_{50}, $mg \cdot L^{-1}$	Dezaktivēti $DFPH^{\bullet}$, $mol \cdot g^{-1}$	RDI
Alkšņa PyL	16,7 ± 0,4	0,0030	0,72±0,05
Oša PyL	15,4 ± 1,3	0,0032	0,76±0,09
Apses PyL	18,5 ± 0,8	0,0027	0,75±0,06
Jauktās lapkoku koksnes PyL	15,0 ± 0,9	0,0033	0,86±0,10
Skuju koku PyL	24,2 ± 0,5	0,0021	0,59±0,03

Alkšņa un oša pirolīzes lignīni uzrādīja augstāko aktivitāti abos testos. Testā $O_2^{\bullet-}$ pirolīzes lignīni dezaktivē līdz 100 % skābekļa aktīvo formu (3.21. att.). Lapkoku koksnes pirolīzes lignīniem piemīt augstākā aktivitāte. To var izskaidrot ar lielāku fenola hidroksilgrupu un vienlaicīgi lielāko metoksilgrupu saturu šajos lignīnos. Egles pirolīzes lignīnam, kuram ir zemākais fenola hidroksilgrupu un zemākais metoksilgrupu saturs, ir zemākā aktivitāte visos iepriekšminētajos testos.



3.21. att. **$O_2^{\bullet-}$ inhibēšana (I), atkarībā no pirolīzes lignīnu (PyL) masas koncentrācijas (γ)**

Pateicoties pirolīzes lignīnu augstajai spējai dezaktivēt brīvos radikāļus, kā arī to labajai savietojamībai ar nepolārājiem substrātiem, tie darbojas kā inhibitori eļļas oksidēšanas procesā ar skābekli**.** Rapšu eļļas oksidēšanas kinētiskā līkne ar un bez antioksidantu klātbūtnes ir parādīta 2.19. attēlā. No šīm līknēm ir aprēķināti indukcijas laiki, aizsardzības faktori un antioksidatīva aktivitāte, % no plaši izmantojama *TBHQ* references antioksidanta. Iegūtie rezultāti parāda, ka oša pirolīzes lignīna aktivitāte eļļas oksidēšanas testā ir 80 % no *TBHQ* aktivitātes (3.18. tabula). Neskatoties uz augsto antioksidatīvo aktivitāti citos testos, oša sārma lignīns eļļas oksidēšanas testā neuzrāda antioksidatīvo aktivitāti. Veiktie pētījumi parāda, ka antioksidanta izmantošanas iespējas nosaka ne tikai augsta radikāļu dezaktivēšanas spēja, bet arī savietojamība ar materiālu.

3.18. tabula

No oša ar dažādām metodēm izdalīto lignīnu antioksidatīva aktivitāte (AA) un aizsardzības faktors (PF) rapšu eļļas oksidēšanas testā

Paraugs	**Indukcijas laiks, h**	**PF**	**AA**
Rapšu eļļa, kontrole	1,22	1,0	0,0
TBHQ	2,82	2,3	1,0
Oša sarma lignīns	1,36	1,1	0,1
Oša pirolīzes lignīns	2,49	2,0	0,8

3.4.3. *LignoBoost kraft* lignīnu frakcijas

Pirolīzes lignīns, kas ir uzrādījis augstu aktivitāti testā ar eļļu, ir iegūts, frakcionējot koksnes pirolīzes produktu hidrofīlajās un hidrofobajās frakcijās. Pateicoties *LignoBoost kraft* lignīnu augstai antioksidatīvai aktivitātei dažādos testos, augstai termiskai stabilitātei, ko apstiprina termogravimetrijas analīzes rezultāti (2.13. att.), tiem ir liels potenciāls kā antioksidantiem dažādos kompozītmateriālos. Frakcionēšana ar organiskajiem šķīdinātājiem ļauj iegūt no tehniskajiem lignīniem frakcijas, kas ir savietojamas ar dažādiem substrātiem. Frakcionējot ir iespējams ietekmēt OH-grupu ~~saturu~~ (polāras grupas) un karbonilgrupu (salīdzinoši nepolāras grupas) saturu.

Izmantojot organiskos šķīdinātājus, no *Lignoboost kraft* tehniskajiem lignīniem ir iegūtas četras frakcijas: dihlormetānā šķīstoša frakcija (**F-CH_2Cl_2**), n-propanolā šķīstoša frakcija (**F-C_3H_7OH**), metanolā šķīstoša frakcija (**F-CH_3OH**) un izvēlētajos šķīdinātājos nešķīstoša frakcija (**F-X**) (iznākumi – eksperimentālajā daļā). Izvēlētajos šķīdinātājos šķīstošajām frakcijām skuju koku *LignoBoost kraft* lignīnam ar lielāko iznākumu ir iegūta metanolā šķīstoša frakcija (≈ 13%), bet lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīnam – n-propanolā šķīstoša frakcija (≈ 48%).

FTIR spektoskopijas rezultāti apstiprina, ka iegūtajām lignīnu frakcijām ir dažāds ķīmiskais sastāvs. Lignīna un to frakciju *FTIR* spektri ir parādīti 3. pielikumā. F-CH_2Cl_2 frakcijai ir raksturīga paaugstināta absorbcija metil- un metilēngrupu C-H svārstību reģionā starp 3045-2780 cm^{-1}, ko var interpretēt kā paaugstinātu lipofīlo vielu saturu šajā frakcijā. Saskaņā ar Faix (1991) aprēķinātais spektrālās kondensācijas indekss, palielinās rindā: F-CH_2Cl_2 (0.37) < F-C_3H_7OH (0.44) < F-CH_3OH (0.50) < F-X (0.58). Paaugstināto absorbciju C-O un O-H grupu svārstību reģionā starp 3420 cm^{-1} un 1050 cm^{-1} frakcijā F-X varētu skaidrot ar paaugstinātu cukuru piemaisījumu daudzumu tajā (3.19. tabula.).

Izmantojot *Py-GC-MS-FID* analīzi, ir kvantitatīvi novērtēts dažādu frakciju sastāvs. Frakcijas atšķiras arī pēc ogļhidrātu un lipofilo ekstraktvielu piemaisījumu satura (3.19. tabula).

3.19. tabula.

Dažādas izcelsmes produktu relatīvais saturs , % (ar standartnovirzēm) pētāmo paraugu termiskās degradācija produktos

Paraugs, frakcija	**Lignīna degradācijas produkti**	**Ogļhidrātu degradācijas produkti**	**Ekstraktvielu degradācijas produkti**
Skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns			
Nefrakcionēts	97,0±0,9	1,80±0,05	1,22±0,03
F-CH_2Cl_2	92,3±0,8	2,20±0,08	5,60±0,04
F-C_3H_7OH	95,5±0,7	2,40±0,09	2,10±0,09
F-CH_3OH	97,3±0,8	1,61±0,09	1,11±0,02
F-X	97,5±0,6	1,80±0,03	0,63±0,02
Lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns			
Nefrakcionēts	97,4±0,5	2,52±0,04	0,23±0,010
F-CH_2Cl_2	97,9±0,8	0,72±0,02	1,52±0,010
F-C_3H_7OH	98,6±0,5	0,73±0,03	0,70±0,03
F-CH_3OH	97,4±0,8	2,21±0,03	0,53±0,05
F-X	91,5±0,2	8,50±0,09	< 0.01

Abu *LignoBoost kraft* tehnisko lignīnu frakciju vidējās molekulmasas pieaug secībā: dihlorometānā šķīstošā frakcija < n-propanolā šķīstošā frakcija < metanolā šķīstošā frakcija < izvēlētajos šķīdinātājos nešķīstošā frakcija. Neskatoties uz izejas lignīnu vidējo molekulmasu lielo starpību, ar vienādiem organiskajiem šķīdinātājiem no šīm lignīniem iegūto frakciju molekulmasas ir tuvas (3.20. tabula).

Dihlormetāna frakcijai ir relatīvi zemas M_n un M_w vērtības, kas parāda, ka tā sastāv, galvenokārt, no oligomēriem lignīna izcelsmes savienojumiem. Visām frakcijām ir raksturīgi 2-4 reizes zemāki polidispersitātes indeksi (M_n/M_w), salīdzinot ar nefrakcionētiem paraugiem (3.20. tabula). Metanola frakcija ir vishomogēnākā pēc molekulmasas sadalījuma.

3.20. tabula

***LignoBoost kraft* lignīnu un to frakciju masas vidējā molekulmasa (M_w), vidējās skaitliskās molekulmasas (M_n) un polidispersitāte (M_w/M_n)**

Paraugs, frakcija	**M_w**	**M_n**	**M_w/M_n**
Skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns			
Nefrakcionēts	12138	899	13,5
F-CH_2Cl_2	698	138	5,1
F-C_3H_7OH	2087	518	4,0
F-CH_3OH	4465	1202	3,7
F-X	18636	4441	4,2
Lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns			
Nefrakcionēts	4786	421	11,4
F-CH_2Cl_2	799	184	4,3
F-C_3H_7OH	1996	392	5,1
F-CH_3OH	4488	2137	2,1
F-X	18396	4959	3,7

Lai novērtētu minēto frakciju izmantošanas iespējas polimēru kompozītos, svarīgs raksturlielums ir lignīna produktu stiklošanās temperatūra (T_s). Salīdzinot izejas *LignoBoost kraft* blakusproduktu un to frakciju T_s vērtības, var secināt, ka tās pieaug līdz ar pieaugošu molekulmasu (3.21. tabula).

3.21. tabula

***DSK* un *DTG* analīžu rezultāti *LignoBoost kraft* lignīniem un to frakcijām**

Paraugs	**T_s,°C**	**$T_{sākuma}$, °C**	**T_{maks}, °C**	**Atlikums 500 °C, %**
Skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns				
Nefrakcionēts	157	272	378	55.5
F-CH_2Cl_2	55	219	370	36
F-C_3H_7OH	121	282	380	62
F-CH_3OH	176	280	394	49.9
F-X	162	286	384	56
Lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns				
Nefrakcionēts	113	214	365	43
F-CH_2Cl_2	63	223	377	30
F-C_3H_7OH	123	234	365	49
F-CH_3OH	164	240	354	50
F-X	169	239	340	54

F-CH_2Cl_2 frakcijas stiklošanās temperatūras lielā atšķirība no izejas parauga un citām frakcijām var būt saistīta ar šīs frakcijas lignīna oligomēro dabu. Lipofīlās ekstraktvielas, kuru saturs šajās frakcijās ir palielināts, var kalpot kā plastifikātors. Nefrakcionēto paraugu un citu frakciju stiklošanās temperatūras sakrīt ar dažādu lignīnu T_s, kas ir norādīti literatūrā. F-CH_2Cl_2 frakcijas stiklošanās temperatūras pazeminātā vērtība parāda, ka tai var būt liels potenciāls kā nepolāro substrātu antioksidantam (piemēram, polimēru kompozīti, eļļas). Vērtējot izmantošanas iespējas polimēru kompozītmateriālos, ir jāņem vērā dihlormetānā šķīstošās frakcijas daudz zemākā termiskā stabilitāte, salīdzinot ar izejas lignīniem un pārējām frakcijām. Tas ierobežo šīs frakcijas izmantošanas iespējas polimēros, kas tiks pakļauti augstas temperatūras iedarbībai. Frakcionēšanas rezultātā mainās funkcionālo grupu saturs.

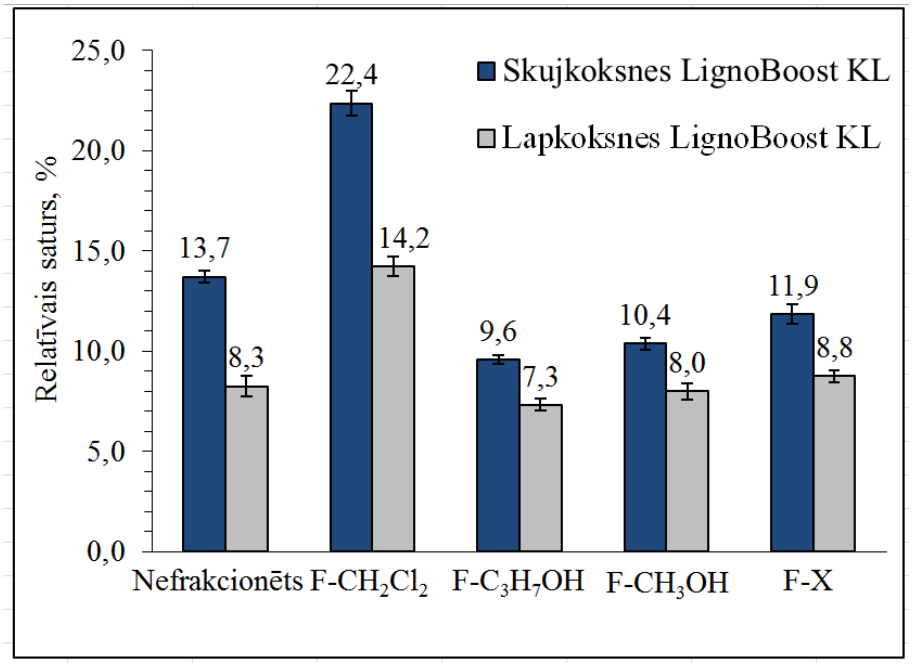
3.22. tabula

Funkcionalo grupu saturs *LignoBoost kraft* lignīnos un to frakcijās

Paraugs	**-OH_{fenola} saturs, %[a]**	**-OH_{fenola} uz FPV[b]**	**-OCH_3 saturs, %[a]**	**-OCH_3 uz FPV[b]**
Skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns				
Nefrakcionēts	3,72±0,04	0,44±0,002	13,40±0,02	0,86±0,001
F-CH_2Cl_2	5,84±0,09	0,68±0,010	12,52±0,05	0,80±0,003
F-C_3H_7OH	4,53±0,02	0,53±0,0002	16,77±0,04	1,08±0,003
F-CH_3OH	4,30±0,09	0,51±0,010	14,10±0,05	0,91±0,003
F-X	3,82±0,05	0,45±0,006	13,53±0,12	0,87±0,008
Lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns				
Nefrakcionēts	4,12±0,05	0,48±0,006	18,87±0,09	1,21±0,006
F-CH_2Cl_2	4,91±0,03	0,58±0,004	18,40±0,06	1,18±0,004
F-C_3H_7OH	4,13±0,02	0,48±0,002	19,76±0,08	1,27±0,005
F-CH_3OH	3,85±0,05	0,45±0,002	19,94±0,04	1,28±0,0010
F-X	3,01±0,04	0,35±0,005	16,29±0,08	1,05±0,0010

[a] Masas procenti[b] FPV – fenilpropāna vienība, tās molekulmasa ir pieņemta par 200 g•mol^{-1}

Dihlormetānā šķīstošajā frakcijā ir palielināts lignīna izcelsmes pirolīzes produktu relatīvais saturs ar skābekli saturošajām grupām sānķēdē (pārsvarā karbonilgrupas) (3.22. att.). Tas norāda uz šādu grupu palielinātu saturu lignīna makromolekulā.



3.22. att. **Savienojumu ar skābekli saturošajām grupām sānķēdē relatīvais saturs (%) lignīna izcelsmes termiskās degradacijas produktos**

KL- kraft lignīns

Karbonilgrupas ir mazāk polāras, salīdzinot ar hidroksilgrupām, karboksigrupām un ogļhidrātu atvasinājumiem, tāpēc lignīna makromolekulas ar šo apakšvienību paaugstināto saturu labāk šķīst salīdzinoši nepolārajā dihlormetānā. Savienojumu ar *o*-metoksilgrupām (G+S fenoli); CH_2- grupām sānķēdes α-stāvoklī; dubultsaitēm sānķēdes α-stāvoklī relatīvais saturs (%) lignīna izcelsmes termiskās degradācijas produktos, kā arī termiskās degradācijas produktu (fenolu) ar saīsinatām sānķēdēm pret C_3 sānķēdēm attiecība ((ArC_1+ArC_2)/ArC_3) un π-konjugēto sistēmu izmērs ir doti tabulā (3.23.). Dihlormetānā šķīstošajai frakcijai ir raksturīgi mazāki π-konjugēto sistēmu izmēri.

3.23. tabula

Dažādas izcelsmes produktu relatīvais saturs , % (ar standartnovirzēm) *LignoBoost kraft* lignīnu termiskās degradācija produktos

Tehniskais lignīns	Lignīna izcelsmes pirolīzes produktu struktūras īpašība				
	G+S fenoli	**CH_2- grupas sānķēdes α-stāvoklī**	**Dubultsaites sānķēdes α-stāvoklī**	**$ArC_1+ArC_2)/ ArC_3$**	**π-konjugēto sistēmu izmērs**
Skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns					
Nefrakcionēts	88,2±0,7	36,9±0,9	12,3±0,6	3,2±0,10	14±1
F-CH_2Cl_2	93,7±0,6	28,5±0,7	12,2±0,7	2,8±0,10	8±1
F-C_3H_7OH	88,0±1,1	41,9±0,8	14,0±0,8	4,6±0,10	18±1
F-CH_3OH	87,8±0,5	38,1±0,4	14,5±0,5	4,5±0,10	16±1
F-X	87,8±0,8	37,3±0,4	13,4±0,8	3,4±0,10	12±1
Lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns					
Nefrakcionēts	95,9±0,4	37,3±0,7	20,8±0,4	3,1±0,10	13±1
F-CH_2Cl_2	96,9±0,4	33,6±0,5	16,7±0,5	4,6±0,10	10±1
F-C_3H_7OH	95,7±0,3	38,2±0,8	19,5±0,4	3,6±0,10	16±1
F-CH_3OH	94,9±0,6	38,0±0,4	19,7±0,3	4,3±0,10	14±1
F-X	94,8±0,8	34,0±0,8	27,5±0,9	2,3±0,10	13±1

Ir izpētīta *LignoBoost kraft* lignīnu frakciju antioksidatīva aktivitāte testos ar dažādiem radikāļiem. $ABTS^{\bullet+}$ un $DFPH^{\bullet}$ radikāļu inhibēšana atkarībā no pētamā antioksidanta masas koncentrācijas ir lineāra plašā koncentrāciju diapazonā. 3.24. tabulā ir parādītas aprēķinātās IK_{50} vērtības, kā arī aktivitāte, kas izteikta kā RDI (dezaktivēto radikāļu skaits uz vienu OH_{fenola}).

Frakciju aktivitātes testos ar dažādiem radikāļiem ir tuvas. Viszemākā aktivitāte ir F-X, izvēlētajos šķīdinātājos nešķīstošai frakcijai. Ja RDI ir > 1, tas parāda otrējo antioksidantu aktivitāti, kuri veidojas no lignīniem.

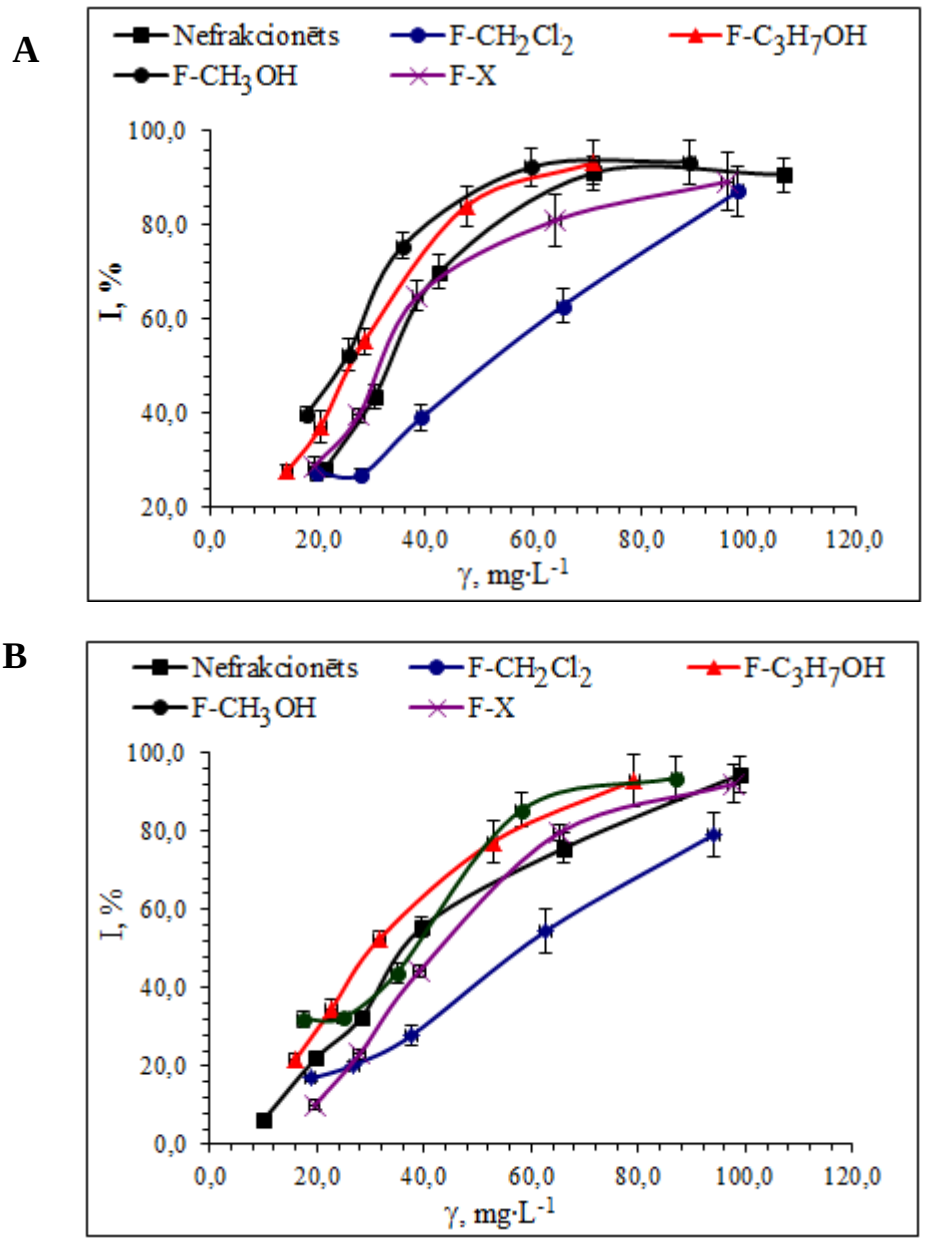
3.24. tabula

LignoBoost kraft* lignīnu un to frakciju antioksidatīva aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ un $DFPH^{\bullet}$ testos, izteikta kā IK_{50}un radikāļu dezaktivēšanas indekss (RDI)

Paraugs	$ABTS^{\bullet+}$		$DFPH^{\bullet}$	
	IK_{50}, $mg \cdot L^{-1}$	RDI	IK_{50}, $mg \cdot L^{1}$	RDI
Skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns				
Nefrakcionēts	3,81 ± 0,05	2,05±0,04	17,4±0,5	1,32±0,05
F-CH_2Cl_2	4,08 ±0,08	1,22±0,05	21,0 ±0,8	0,70±0,04
F-C_3H_7OH	3,1 ±0,2	2,07±0,14	11,0 ±0,7	1,72±0,11
F-CH_3OH	3,80 ±0,10	1,77±0,09	13,0 ±0,7	1,52±0,13
F-X	4,70 ±0,10	1,62±0,06	21,1 ±0,4	1,06±0,04
Lapkoku koksne *LignoBoost kraft* lignīns				
Nefrakcionēts	4,8 ±0,2	1,47±0,08	15,0 ±0,6	1,38±0,08
F-CH_2Cl_2	4,05 ±0,08	1,46±0,04	17,6 ±1,4	0,99±0,09
F-C_3H_7OH	3,70 ±0,2	1,91±0,12	11,3 ±0,3	1,83±0,06
F-CH_3OH	4,23 ±0,07	1,80±0,04	12,0 ±0,3	1,86±0,06
F-X	6,4 ±0,2	1,51±0,07	17,4 ±0,7	1,63±0,09

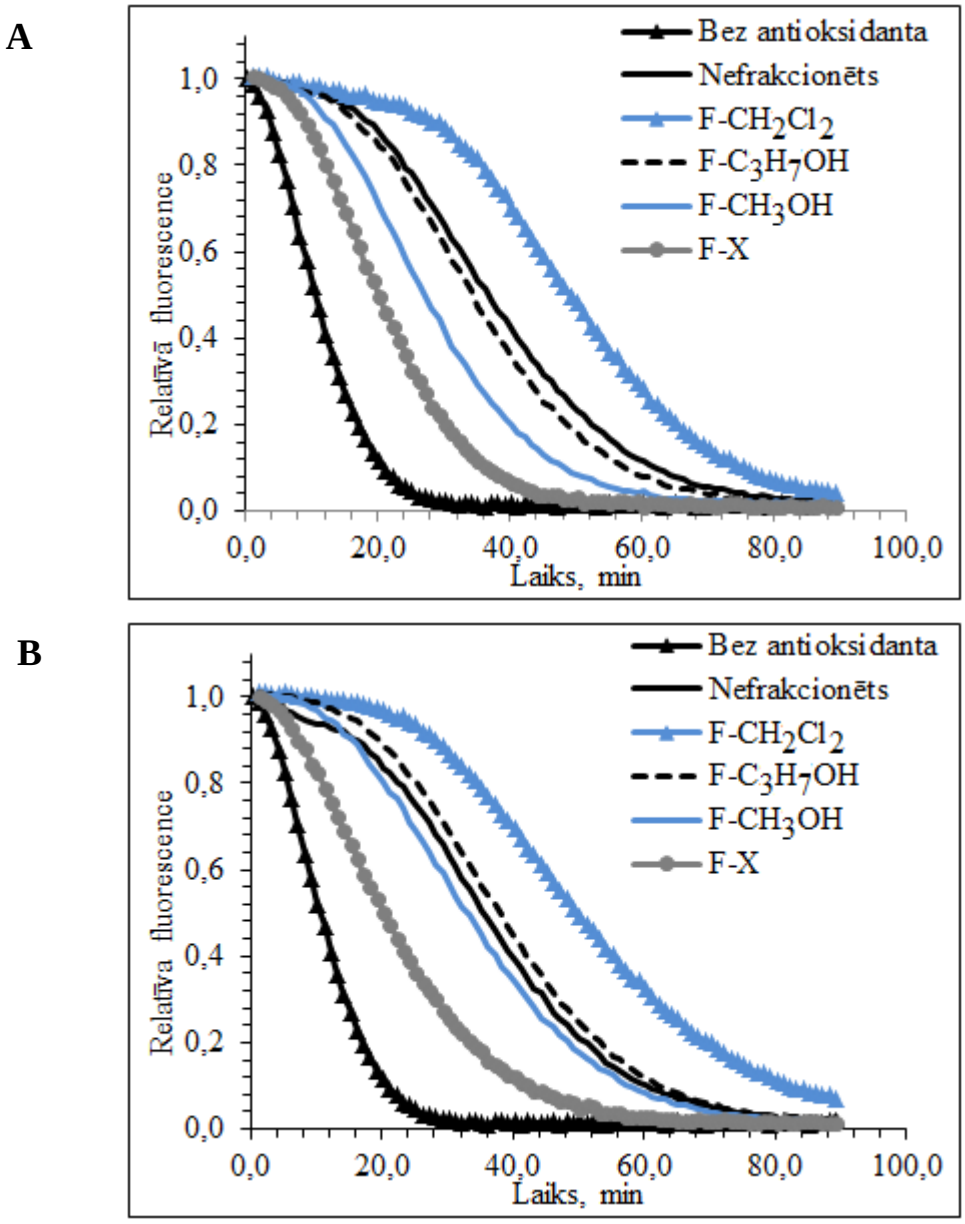
* IK_{50}, parāda, kāda antioksidanta koncentrācija ir nepieciešama, lai uz pusi samazinātu radikāļu koncentrāciju, un radikāļu dezaktivēšanas indekss (RDI) parāda dezaktivēto radikāļu skaitu uz vienu OH_{fenola}

Skābekļa anjonradikāļu inhibēšanas atkarība no antioksidanta masas koncentrācijas nav lineāra (3.23. att.). Izpētītie *LignoBoost kraft* lignīni un to frakcijas inhibē līdz 90% vai pat vairāk $O_2^{\bullet-}$**.** Tas ir vairāk nekā, Troloksam **(68)** un diarilheptanoīdiem.



3.23. att. **$O_2^{\bullet-}$ inhibēšana (I), atkarībā no skuju koku koksnes (A) vai lapkoku koksnes (B)** ***LignoBoost kraft*** **lignīnu frakciju masas koncentrācijām (γ)**

Ir izpētīta dažādu frakciju ietekme uz fluoresceīna oksidēšanās kinētiku ar peroksilradikāļiem (*ORAC*) (3.24. att.).



3.24. att. **Fluorescīna oksidēšanas kinētiskās līknes ar ROO˙ bez antioksidanta, skuju koku koksnes (A) un lapkoku koksnes (B) *LignoBoost kraft* lignīnu un to frakciju klātbūtnē**

Šajā testā augstāko aktivitāti uzrādīja abu lignīnu dihrormetānā šķīstošās frakcijas. Frakciju antioksidatīva aktivitāte šajā testā samazinās līdz ar pieaugošu molekulmasu.

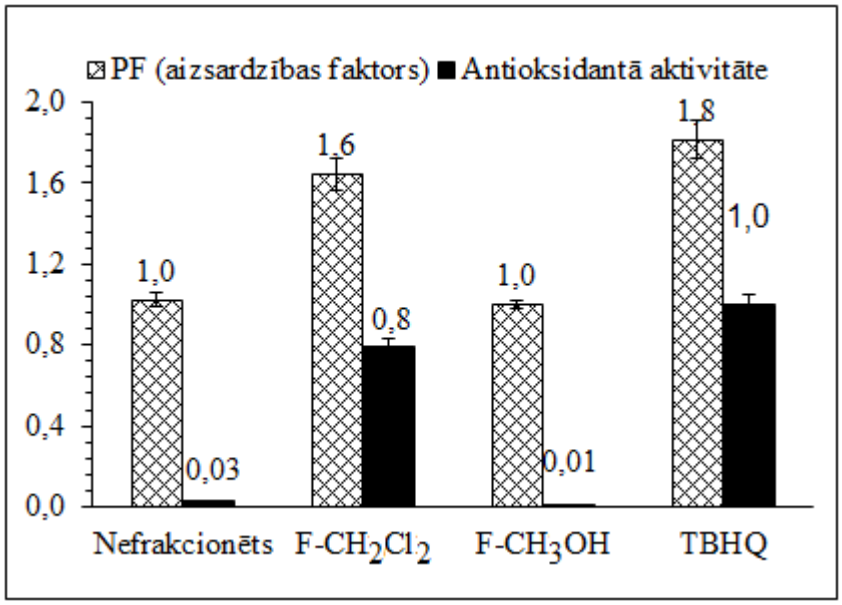
Ir apreķināti laukumi zem līknēm ar un bez antioksidanta klatbūtnes. Rezultāti ir izteikti kā mmol TE uz 1 g parauga (3.25. tabula).

3.25. tabula

***LignoBoost kraft* lignīnu un to frakciju antioksidatīva aktivitāte *ORAC* testā, mmol TE•g^{-1}**

Paraugs	**mmol TE•g^{-1}**
Skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns	
Nefrakcionēts	5,8±0,3
F-CH_2Cl_2	8,6±0,6
F-C_3H_7OH	5,1±0,2
F-CH_3OH	3,5±0,4
F-X	1,7±0,2
Lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns	
Nefrakcionēts	5,6 ±0,5
F-CH_2Cl_2	8,1±0,6
F-C_3H_7OH	5,7±0,4
F-CH_3OH	4,8±0,3
F-X	2,4±0,2

Neskatoties uz *LignoBoost kraft* lignīna augsto antioksidatīvo aktivitāti dažādos testos, tas uzrādīja ļoti zemu antioksidatīvo aktivitāti attiecībā uz rapšu eļļas oksidēšanu ar skābekli. To var skaidrot ar zemo šī salīdzinoši polarā lignīna savietojamību ar eļļu – nepolāru vidi. Tajā paša laikā dihlormetānā šķīstošā frakcija, kurai arī ir augsta antioksidatīva aktivitāte dažādos testos, ir daudz lipofīlāka. Salīdzinot šīs frakcijas antioksidatīvo aktivitāti ar izejas lignīna un hidrofīlākas frakcijas (F-CH_3OH) spēju samazināt un aizkavēt eļļas oksidēšanos, var secināt, ka savietojamībai ar substrātu ir svarīga loma. Kā references antioksidants ir izmantots sintētiskais fenols *TBHQ*. Izejas lignīns un F-CH_3OH frakcija nepalielina eļļas oksidēšanas indukcijas laiku, to aizsardzības faktors ir =1 (tāpat ka rapšu eļļai bez antioksidanta piedevas) un antioksidatīva aktivitāte, salīdzinot ar *TBHQ* ir = 0. F-CH_2Cl_2 ievērojami palielina eļļas oksidēšanas indukcijas laiku. Tai aprēķinātais aizsardzības faktors ir 1,6 , un antioksidatīva aktivitāte ir 80% no *TBHQ* aktivitātes (3.25. att.).



3.25. att. **Skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīna un tā frakciju antioksidatīva aktivitāte rapšu eļļas oksidēšanas testā**

Antioksidatīva ietekme uz poliuretānu plēvju termooksidēšanas destrukciju

Skuju koku koksnes un lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīni un to frakcijas tika ievadītas plēvēs, saturs 2,5 % (pēc masas). Iegūtās PU plēves bija caurspīdīgas, bez cietajiem ieslēgumiem un viendabīgi biezas (ap 200 µm). Plēves sildīja gaisa atmosfērā un pētīja to termo-oksidēšanās destrukciju. *TGA* dati skaidri parādīja pētāmo paraugu antioksidatīvo efektu, kas izpaužas kā PU plēvju oksidēšanās sākuma ($T_{sākuma}$) un maksimālās (T_{maks}) temperatūras nobīde, kā arī PU termooksidēšanās destrukcijas procesa ātruma samazināšanās pirmajā degradācijas etapā (3.26. tabula). Ir zināms, ka poliuretāniem uz poliēteru bāzes (kas ir izmantoti dotajā pētījumā kā modelēšanas elastomēri) šis pirmais degradācijas etaps ietver sevī PU molekulas sadalīšanos par pirmējiem amīniem, kas notiek pēc radikāļu mehānisma (ķēdes reakcijas) [11]. Antioksidantu, īpaši telpiski traucēto fenolu, pievienošana var stabilizēt PU pret oksidēšanos [20]. Augstāko antioksidatīvo efektu uzrādīja propanolā šķīstošā frakcija.

3.26. tabula

***LignoBoost kraft* lignīnu ietekme uz poliuretāna plēvju termooksidēšanas destrukciju**

Pleves paraugs	**$T_{sākuma}$, °C**	**T_{maks}, °C**	**Maksimālais degradācijas ātrums, mg•min^{-1}**
Bez piedevas	270	300	0,96
Skuju koku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns			
Ar nefrakcionēta parauga piedevu	280	320	0,57
Ar F-CH_2Cl_2	290	320	0,64
Ar F-C_3H_7OH	303	330	0,47
Ar F-CH_3OH	295	325	0,50
Lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīns			
Ar nefrakcionēta parauga piedevu	290	321	0,56
Ar F-CH_2Cl_2	290	320	0,59
Ar F-C_3H_7OH	305	330	0,34
Ar F-CH_3OH	301	325	0,40

DFPH$^{\bullet}$ un ABTS$^{\bullet+}$ testu rezultāti bija veiksmīgi izmantoti struktūras-aktivitātes pētījumos. 3.27. tabulā ir parādītas Pirsona korelācijas koeficienta vērtības, kas raksturo dažādu struktūras īpašību ietekmi uz *LignoBoost kraft* lignīnu antioksidatīvo aktivitāti ABTS$^{\bullet+}$ un DFPH$^{\bullet}$ testos.

3.27. tabula

Pirsona korelācijas koeficienti starp dažādiem parametriem, kas raksturo lignīna produktu struktūras īpašības un antioksidatīvo aktivitāti ABTS$^{\bullet+}$ un DFPH$^{\bullet}$ testos

Struktūras parametrs	**Pirsona korelācijas koeficients* (n=10, α=0,05)**	
	DFPH$^{\bullet}$	**ABTS$^{\bullet+}$**
G+S fenolu relatīvais saturx, %	0,08	-0,50
CH_2- grupas sānķēdes α-stāvoklī, %	**0,71**	**0,87**
Skābekli saturošas grupas sānķēdē, %	**-0,87**	-0,55
π-konjugēto sistēmu izmērs	**0,82**	**0,89**
Metoksilgrupas, moli uz FPV	**0,68**	0,24
Dubultsaites, sānķēdes α-stāvoklī, %	0,55	-0,06
Ogļhidrātu relatīvais saturs, %	0,17	-0,24
$(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$	0,27	0,51
M_w	-0,06	-0,03
M_w/M_n	-0,18	0,11

***Statistiski nozīmīgas korelācijas koeficientu vērtības ir atzīmētas treknrakstā**

LignoBoost kraft lignīnu frakciju antioksidatīvo aktivitāti DFPH$^{\bullet}$ un ABTS$^{\bullet+}$ testos ievērojami ietekmē π-konjugēto sistēmu izmēri. Tas var būt saistīts ar to, ka π-konjugācija stabilizē izveidotos fenoksilradikāļus, kā arī ar α– dubultsaišu ieguldījumu otrējo antioksidantu veidošanā no fenoksilradikāļiem. Viena no struktūras īpašībām, kas pozitīvi ietekmē antioksidatīvo aktivitāti, ir alkilaizvietotāju klātbūtne (bez skābekli saturošajiem aizvietotājiem vai dubultsaitēm). Alkilaizvietotāju pozitīvais efekts ir saistīts ar to elektron-donorajām īpašībām un pozitīvo indukcijas efektu, kas atvieglo H atoma atņemšanu no fenola hidroksilgrupas. CH_2- grupas arī var piedalīties reakcijā ar radikāļiem kā H-atoma donori. DFPH$^{\bullet}$ testā ir novērots arī skābekli saturošo aizvietotāju sānķēdē (pārsvarā karbonilgrupas) negatīvais efekts. Ir zināms, ka šīs grupas palielina vienkāršo fenolu *BDE* un samazina antioksidatīvo aktivitāti. DFPH$^{\bullet}$ testā ir novērota metoksilgrupu nozīmīga pozitīva ietekme uz antioksidatīvo aktivitāti.

3.4.4. *Biolignīna*^{TM} frakcijas

Biolignīns^{TM} ir iegūts kā blakusprodukts celulozes un degvielas etanola ražošanā no kviešu salmiem, izmantojot organiskos šķīdinātājus (etiķskābes un skudrskābes maisījumu. Tam ir ļoti zema šķīdība, tāpēc tā izmantošana par antioksidantu nav iespējama. Veicot secīgu frakcionēšanu ar organiskajiem šķīdinātājiem, var izdalīt šķīstošas frakcijas, kurām turklāt piemīt augsta reaģētspēja. Frakcionēšanai tika izmantota shēma: dihlormetāns, metanols un dihlormetāna-metanola maisījums (3:4). Iegūto frakciju iznākumi ir parādīti 2.2. tabulā.

Saskaņā ar *Py-GC-MS-FID* rezultātiem, lielākais lignīna saturs ir dihlormetāna/metanola šķīdinātāju maisījumā šķīstošajai frakcijai (3.28. tabula.).

3.28. tabula

Dažādas izcelsmes produktu relatīvais saturs (%) *Biolignīna*^{TM} frakciju termiskās degradācijas produktos

Paraugs	Lignīna degradācijas produkti	Ogļhidrātu degradācijas produkti	Ekstraktvielu degradacijas produkti
Biolignīns^{TM} F-CH_2Cl_2	50,9±0,7	21,0±0,8	28,1±0,3
Biolignīns^{TM} F-CH_3OH	57,1±0,9	34,2±0,5	8,70±0,09
Biolignīns^{TM} F-CH_2Cl_2/CH_3OH	67,0±0,6	31,3 ±0,8	1,70±0,09

No *Biolignīna*^{TM} iegūto frakciju molekulāro masu sadalījums un funkcionālo grupu saturs ievērojami atšķiras (3.29. tabula).

3.29. tabula

***Biolignīna*^{TM} frakciju masas vidēja molekulmasa (M_w), vidējas skaitliskās molekulmasas (M_n) un polidispersitāte (M_w/M_n)**

Paraugs	M_n, g•mol^{-1}	M_w, g•mol^{-1}	M_w/M_n
Biolignīns^{TM} F-CH_2Cl_2	334	1973	5,9
Biolignīns^{TM} F-CH_3OH	541	2201	4,1
Biolignīns^{TM} F-CH_2Cl_2/CH_3OH	1094	5295	4,8

Salīdzinot ar citiem pētāmajiem lignīniem, *Biolignīna*^{TM} frakcijām ir raksturīgs zems metoksilgrupu saturs (3.30.tabula) un vienlaicīgi liels atomu skaits, kas piedalās nesapārota elektrona delokalizācijā.

3.30. tabula

Funkcionālo grupu saturs un π-konjugēto sistēmu izmērs *Biolignīna*^{TM} frakcijās

Paraugs	-OH_{fenola} saturs, %[a]	-OH_{fenola} uz FPV[b]	-OCH_3 saturs, %[a]	-OCH_3 uz FPV[b]	π-konjugēto sistēmu izmērs
Biolignīns^{TM} F-CH_2Cl_2	3,6±0,05	0,42±0,006	9,2±0,10	0,59±0,006	29
Biolignīns^{TM} F-CH_3OH	3,6±0,10	0,42±0,010	11,0±0,2	0,71±0,013	25
Biolignīns^{TM} F-CH_2Cl_2/CH_3OH	2,8±0,10	0,33±0,010	11,4±0,2	0,73±0,013	25

[a] Masas procenti [b] FPV – fenilpropāna vienība, tās molekulmasa ir pieņemta par 200 g•mol^{-1}

Izmantojot *Py-GC-MS-FID* analīzes datus, ir raksturotas lignīnu struktūras īpatnības, kurām var būt svarīga loma to antioksidatīvajā aktivitātē (3.31. tabulas dati).

3.31. tabula

Dažādu savienojumu relatīvais saturs (%) lignīna izcelsmes termiskās degradācijas produktos (ar standartnovirzēm)

Tehniskais lignīns	Lignīna izcelsmes pirolīzes produktu struktūras īpašība				
	G+S fenoli	CH_2- grupas sānķēdes α-stāvoklī	Skābekli saturošas grupas sānķēdē	Dubultsaites sānķēdes α-stāvoklī	$(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$
Biolignin^{TM} F-CH_2Cl_2	90,9±0,8	10,7±0,5	20,7±0,2	33,4±0,9	4,0±0,10
Biolignin^{TM} F-CH_3OH	85,9±0,9	13,6±0,7	5,5±0,3	39,8±0,7	5,1±0,10
Biolignin^{TM} F-CH_2Cl_2/CH_3OH	83,8±0,7	16,6±0,4	6,8±0,4	28,6±0,5	3,9±0,10

Tāpat kā *kraft* lignīniem, šī lignīna dihlormetāna frakcijā ir novērots palielināts karbonilgrupu saturs. Šī lignīna frakcijām ir raksturīgs ievērojami lielāks pirolīzes produktu saturs ar dubultsaitēm alifātiskās ķēdes α-stāvoklī, kā arī augsts tādu produktu saturs, kas liecina par ēteriskajām saitēm.

3.32. tabula

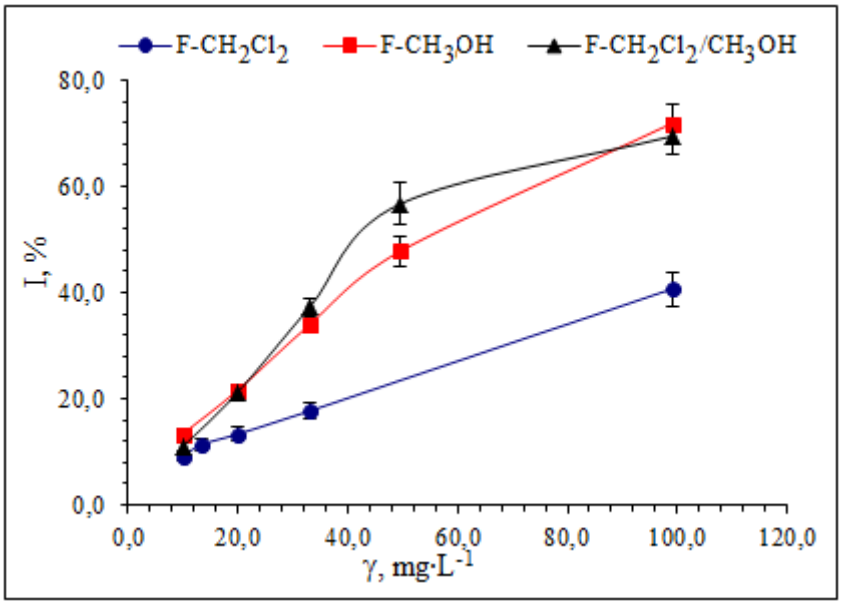
Biolignīna*^{TM} frakciju antioksidatīva aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ un $DFPH^{\bullet}$ testos, izteikta kā IK_{50} un radikāļu dezaktivēšanas indekss (RDI)

Paraugs	$ABTS^{\bullet+}$		$DFPH^{\bullet}$	
	IK_{50}, mg•L^{-1}	RDI	IK_{50}, mg•L^{-1}	RDI
Biolignīna^{TM} F-CH_2Cl_2	10,7 ±0,3	0,75±0,03	50,0±1,4	0,47±0,02
Biolignīna^{TM} F-CH_3OH	7,1 ± 0,3	1,13±0,08	42,7±0,8	0,55±0,03
Biolignīna^{TM} F-CH_2Cl_2/CH_3OH	9,1± 0,3	1,13±0,08	42,8±1,0	0,71±0,04

* $IK_{50,}$ parāda, kāda antioksidanta koncentrācija ir nepieciešama, lai uz pusi samazinātu radikāļu koncentrāciju, un radikāļu dezaktivēšanas indekss (RDI) parāda dezaktivēto radikāļu skaitu uz vienu OH_{fenola}

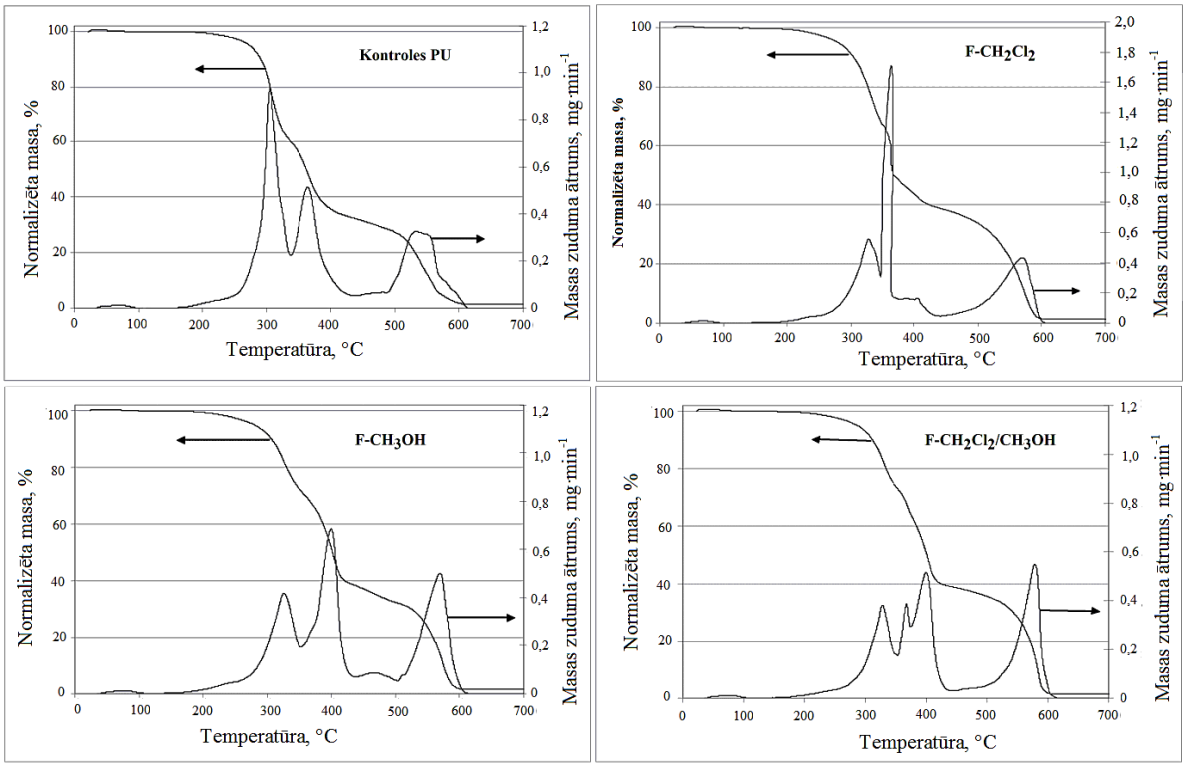
Šīm lignīna frakcijām ir raksturīga ievērojami lielāka aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ testā, salīdzinot ar $DFPH^{\bullet}$ testu. $DFPH^{\bullet}$ testā RDI ir ievērojami zemāki par 1, kas norāda, ka lielai daļai no lignīna fenola hidroksilgrupām ir augstas *BDE* vērtības.

Antioksidatīva aktivitāte testā ar superoksīda radikāļiem ir ievērojami zemāka, salīdzinot ar *kraft* un sārma lignīniem (3.26. att). Dihlormetānā šķīstošajai frakcijai ir zemākā aktivitāte visos testos ar brīvajiem radikāļiem.



3.26. att. **$O_2^{\bullet-}$ inhibēšana (I), atkarībā no *Biolignīna*^{TM} frakciju masas koncentrācijām (γ)**

Biolignīna^{TM} šķīdība ir ļoti zema, tapēc šo produktu nav mērķtiecīgi ievadīt polimēra kompozītā kā antioksidantu. Frakcionēšana deva iespēju iegūt aktīvas frakcijas ar lielu potenciālu kā antioksidantiem poliuretānos. Lignīna frakcijas tika ievadītas poliuretānu kompozīcijā priekšpolimerizēšanas stadijā, 5 % pēc masas. Šīs frakcijas spēj aizsargāt poliuretāna materiālu no termooksidēšanās destrukcijas. Augstākā antioksidatīva aktivitāte ir frakcijai, kas iegūta, izmantojot dihrormetāna/metanola maisījumu (3:4). Lignīna frakcijas nobīda materiāla degradācijas sākuma un maksimālās degradācijas temperatūru uz augstākas temperatūras pusi attiecīgi no 7ºC uz 22ºC un no 9ºC uz 70ºC, kā arī 1,5 - 2,4 reizes samazina maksimālo degradācijas ātrumu (3.27. att.).



3.27. att. ***Biolignīna*** ^{TM} **frakciju ietekme uz PU plēvju termooksidēšanās destrukciju**

DTA dati parādīja arī izmaiņas PU modeļplēvju termooksidēšanā: eksotermiskie maksimumi, kas ir saistīti ar PU destrukcijas gaistošo produktu oksidēšanos, nobīdījās uz augstākas temperatūras reģionu (uz 20-30 K) (3.33. tabula).

3.33. tabula

Biolignīna^{TM} **frakciju ietekme uz poliuretāna plēvju termooksidēšanas destrukciju**

Paraugs	**$T_{sākuma}$, K**	***DTG*** **T_{maks},, K**	**Maks. masas zudums, mg•min^{-1}**	**$T_{50\%}$*, K**	***DTA* ekso-smailes temperatūra, K**		**T_{maks}, K**
PU bez lignīna piedevas	536 ± 2	577 ± 2	0,94 ± 0,05	633 ± 2	580 ± 2	639 ± 2	804 ± 3
PU ar *Biolignīna*^{TM} F-CH_2Cl_2	544 ± 2	616 ± 2	0,56 ± 0,02	638 ± 2	590 ± 2	639 ± 2	834 ± 3
PU ar *Biolignīna*^{TM} F-CH_3OH	552 ± 2	624 ± 2	0,44 ± 0,03	675 ± 2	603 ± 2	675 ± 2	841 ± 3
PU ar *Biolignīna*^{TM} F-CH_2Cl_2/CH_3OH	559 ± 2	675 ± 2	0,27 ± 0,02	675 ± 2	608 ± 2	675 ± 2	852 ± 3

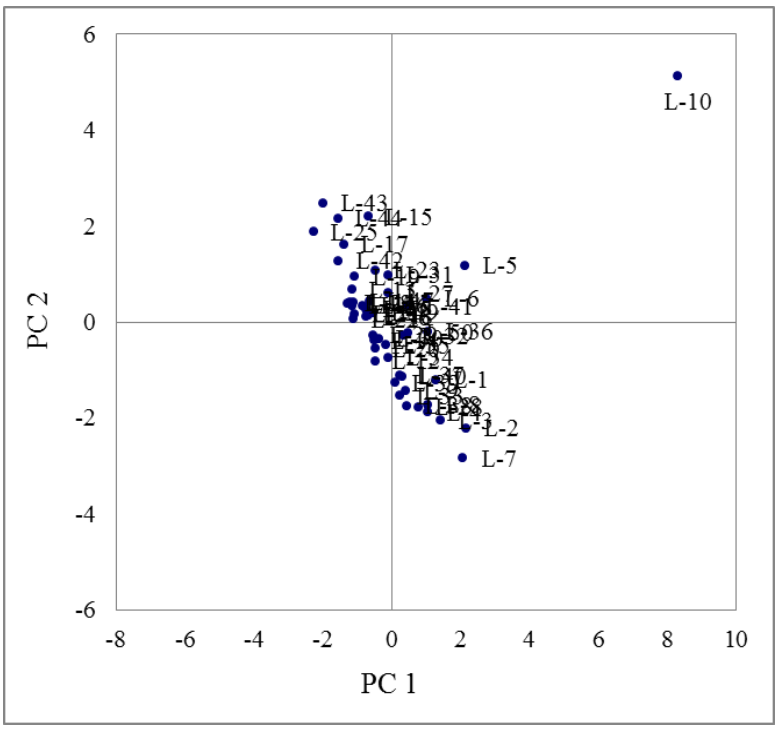
* Temperatūra, kas atbilts 50% parauga masas zudumam.

3.5. Pētāmo lignīnu kopas *SAR* un *QSAR* noteikšana

Pētījumos ir izmantoti visi iepriekš aprakstītie lignīna produkti, struktūras-antioksidatīvas aktivitātes pētījumiem iegūtas arī sārma lignīnu (izdalīti no abakas, liniem, melnalkšņa un oša) un skujkokiem *Curan kraft* lignīna (tradicionālā izdalīšanas metode) frakcijas (skat. 2.5.3. nodaļu). Pavisam ir izpētīti 50 lignīna paraugi. 5. pielikumā ir aprakstīti promocijas darbā noteiktie šo lignīnu struktūras parametri, un antioksidatīva aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ un $DFPH^{\bullet}$ testos.

Lai korekti veiktu struktūras-aktivitātes sakarības pētījumus, ir jāņem vērā objektu heterogenitāte. Dotajā pētījumā ir izvēlēti dažādas izcelsmes lignīni, kuru struktūra ir ietekmēta dažādos pārstrādes procesos. Lai klasificētu paraugus pēc to struktūras īpašībām, ir izmantota *PCA* („*Principal Component Analysis*") metode (*XLSTAT 2013*). *PCA* ir veikta, izmantojot 9 struktūras īpašības: G+S fenolu saturs, FPV vienību saturs ar $-CH_2$ aizvietotājiem sānķēžu α–stāvoklī, FPV vienību saturs ar O saturošiem aizvietotājiem sānķēdēs, ogļhidrātu saturs, $(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$ attiecība, π-konjugēto sistēmu izmēri, M_w, metoksilgrupu saturs (uz FPV), FPV saturs ar dubultsaitēm sānķēžu α-stāvoklī (5. pielikums). Lai izskaidrotu ~ 80% stuktūras dažādības, ir nepieciešamas 4 komponentes (PCs), piecas komponentes izskaidro ~ 87% struktūras dažādības. Pirmās divās *PC* izskaidro 27,5% un 21,9%, attiecīgi. Izvēlētās struktūras īpašības kopā ar paraugu skaitu ļauj apvienot pētāmos paraugus vienā grupā, nesadalot tos klāsteros atkarībā no botāniskās izcelsmes un/vai pārstrādes metodes. Pētāmo lignīnu klasifikācija PC1 un PC2 koordinātēs ir parādīta 3.28. attēlā. Katrs lignīna paraugs ir apzīmēts ar numuru 1-50, kuru atšifrējumus skat. 5. pielikumā. Analizējot datus citās principiālo komponentu koordinātēs, arī nebija iespējams izdalīt atsevišķas grupas.

Paraugs L 10, kas stipri atšķiras no pārējiem, ir melnalkšņa sārma lignīnu nešķīstošā frakcija (F-X), kas iegūta pēc ekstrakcijas ar organiskajiem šķīdinātājiem; tās saturā ir daudz ogļhidrātu piemaisījumu, un tai ir sārma lignīniem neraksturīgi lielas molekulmasas.



3.28. att. **Pētāmo lignīnu klasifikācija PC1 un PC2 koordinātēs**

Lignīnu struktūras-antioksidatīvas aktivitātes sakarību noteikšanai ir izmantota Pirsona korelācijas analīze. Dažas no pētāmajām struktūras īpašībām nozīmīgi korelē sava starpā (3.34. tabula). Molekulmasa pozitīvi korelē ar ogļhidrātu saturu, kas norāda uz to, ka ogļhidrāti ir kompleksos ar lignīnu.

3.34. tabula

Lignīna struktūras deskriptori un to savstarpējā korelācija

Parametrs	Pirsona korelācijas koeficients* (n=50)								
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9
G+S fenolu relatīvais saturs, % , X_1	**1,00**	**0,37**	**0,51**	-0,07	**0,32**	-0,24	-0,18	**0,35**	0,08
CH_2- grupas sānķēdes α-stāvoklī, %, X_2	**0,37**	**1,00**	-0,11	0,03	0,19	-0,09	-0,06	**0,60**	0,17
Skābekli saturošas grupas sānķēdē, %, X_3	**0,51**	-0,11	**1,00**	-0,03	**0,34**	-0,46	-0,23	0,03	-0,08
Ogļhidrāti, %, X_4	-0,07	0,03	-0,03	**1,00**	**0,61**	0,14	0,27	-0,16	**0,53**
$(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$, X_5	**0,32**	0,19	**0,34**	**0,61**	**1,00**	**-0,31**	-0,08	0,18	**0,57**
Dubultsaites sānķēdes α–stāvoklī, % X_6	-0,24	-0,09	**-0,46**	0,14	-0,31	**1,00**	0,21	-0,08	-0,11
π-konjugēto sistēmu izmērs , X_7	-0,18	-0,06	-0,23	0,27	-0,08	0,21	**1,00**	**-0,36**	-0,05
mol OCH_3/mol FPV, X_8	**0,35**	**0,60**	0,03	-0,16	0,18	-0,08	**-0,36**	**1,00**	-0,08
M_w, g•mol^{-1} X_9	0,08	0,17	-0,08	**0,53**	**0,57**	-0,11	-0,05	-0,08	**1,00**

***Vērtības, apzīmētas ar treknrakstu, ir nozīmīgi atšķirīgas no 0, ar α=0,05.**

Molekulmasas nozīmīgi pozitīva korelācija ar $(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$ norāda uz lignīna kondensācijas reakcijām tā izdalīšanas gaitā. Ogļhidrātu satura nozīmīgi pozitīva korelācija ar $(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$ liecina par to, ka ogļhidrāti var ķīmiski saistīties ar lignīnu fitomasas ķīmiskās pārstrādes gaitā, kas sakrīt ar literatūras datiem.

Parcialās korelācijas analīze ļauj novērtēt katra faktora ietekmi uz antioksidatīvo aktivitāti, novēršot citu faktoru ietekmi (3.35. tabula). Lielāka pozitīva ietekme uz antioksidatīvo aktivitāti $DFPH^{\bullet}$ testā ir (G+S) fenolu un metoksilgrupu saturam, kā arī fenolu ar CH_2- sānķēžu α-stāvoklī saturam. Tas sakrīt ar lignīna modeļvielu un citu mazmolekulāro fenolu struktūras-aktivitātes pētījumu rezultātiem. Antioksidatīvo aktivitāti $DFPH^{\bullet}$ testā nozīmīgi negatīvi ietekmē skābekļa aizvietotāju (pārsvarā aldehīd- un karbonil- grupas) klātbūtne alkilsānķēdēs un palielināti π-konjugēto sistēmu izmēri, kas raksturo fenolpropāna vienības ar α– dubultsaitēm un diarilus. Lignīna modeļvielu pētījumos ir novērota α–karbonilgrupu negatīva ietekme uz antioksidatīvo aktivitāti un α–dubultsaišu neviennozīmīga ietekme uz to. No vienas puses, fenoksilradikāļa stabilitāte samazina *BDE* vērtības, no otras puses, pārāk lielai stabilitātei var būt negatīva ietekme [4].

3.35. tabula

Antioksidatīvas aktivitātes ($DFPH^{\bullet}$ un $ABTS^{\bullet+}$ testos) korelācija ar lignīna struktūras deskriptoriem

Parametrs, kas raksturo struktūras īpašību	Pirsona korelācijas koeficients* (n=50, α=0,05)			
	Pāru korelācija		Parciāla korelācija	
	$DFPH^{\bullet}$	$ABTS^{\bullet+}$	$DFPH^{\bullet}$	$ABTS^{\bullet+}$
G+S fenolu relatīvais saturx, %	**0,54**	0,25	**0,58**	-0,18
CH_2- grupas sānķēdes α-stāvoklī, %,	**0,72**	**0,37**	**0,47**	0,22
Skābekli saturošas grupas sānķēdē, %,	-0,11	0,08	**-0,48**	-0,27
π–konjugēto sistēmu izmērs, n C	-0,31	-0,50	**-0,34**	**-0,45**
Dubultsaites, sānķēdes α-stāvoklī, %	-0,04	-0,24	0,013	0,21
Ogļhidrāti, %	-0,12	-0,08	-0,096	**-0,58**
$(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$	0,16	**0,52**	0,08	**0,74**
$-OCH_3$/FPV	**0,63**	**0,54**	0,19	0,05
M_w, $g \bullet mol^{-1}$	0,14	0,22	0,04	-0,11

*****Vērtības, apzīmētas ar treknrājumu, ir nozīmīgi atšķirīgas no 0, ar α=0,05.

Svarīgākais faktors, kas pozitīvi ietekmē antioksidatīvo aktivitāti $ABTS^{\bullet+}$ testā, ir lielāka $(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$ attiecība, kas raksturo lignīna *in situ* struktūras izmaiņas izdalīšanas gaitā. Nozīmīgākie negatīvie faktori ir ogļhidrātu saturs un palielināti π-konjugēto sistēmu izmēri.

Kā parādīts diarilheptanoīdu gadījumā, antioksidatīvo aktivitāti $DFPH^{\bullet}$ testā izskaidro *PCET* deskriptori, bet $ABTS^{\bullet+}$ testā nozīmīgs ir *SPLET* ieguldījums. Arī lignīnu gadījumā struktūras parametri, kas ietekmē antioksidatīvo aktivitāti $DFPH^{\bullet}$ testā, ir viegli izskaidrojami no *PCET* mehānisma viedokļa. $ABTS^{\bullet+}$ aktivitāti noteicošos faktorus ir grūtāk izskaidrot, un tie parāda citu mehānismu ieguldījumu.

Korelācijas analīzes rezultāti ir izmantoti, lai izvēlētos struktūras deskriptorus un aprakstītu struktūras-antioksidtīvas aktivitātes sakarības, izmantojot daudzfaktoru lineārās regresijas vienādojumu. $DFPH^{\bullet}$ testā iegūtie regresijas vienādojuma deskriptori un to koeficientu vērtības ir parādītas 3.36. tabulā, $R^2 = 0,75$.

3.36. tabula

$DFPH^{\bullet}$ testā iegūtā struktūras-aktivitātes regresijas (parasta daudzfaktoru lineāra regresija) vienādojuma koeficientu vērtības

Struktūras deskriptors	Vienādojuma koeficienti		Standartizētie koeficienti	
	Koeficienta vērtība	Standartkļūda	Koeficienta vērtība	Standartkļūda
Brīvas loceklis	-3,12	0,70		
G+S fenolu relatīvais saturx, %	0,045	0,008	0,53	0,10
CH_2- grupas sānķēdes α–στāvoklī, %,	0,022	0,004	0,46	0,09
Skābekli saturošas grupas sānķēdē, %,	-0,018	0,004	-0,40	0,10
π–konjugēto sistēmu izmērs, n C	-0,017	0,005	-0,27	0,08

Lai izveidotu ticamāku struktūras-aktivitātes sakarību vienādojumu, ir izmantota arī daudzfaktoru „*Correlated Component Regression*" (*CCR*) analīze. Tāpat kā *PLS* (*partial least square*) metode, *CCR* analīze pieder pie metodēm, kas ļauj vienlaicīgi „noregulēt" (*regularization*) rezultātus, ņemot vērā to savstarpējo korelāciju, kā arī nepieciešamības gadījumā izslēgt no modeļa nenozīmīgus faktorus. Atšķirībā no parastās daudzfaktoru regresijas analīzes, *CCR* analīzē faktoru (deskriptoru) skaits var būt liels (salīdzinājumā ar novērojumu skaitu). Korelējošo komponentu regresijas metode (*CCR*) izmanto ātru šķērsenisku validāciju, lai iegūtu sakārtotu algoritmu ticama modeļa iegūšanai. Lai iegūtu regresijas vienādojumu, *CCR* analīzē ir izmantotas 9 lignīna struktūras īpašības. Aprēķinu

rezultāti parādīja, ka starp 9 struktūras īpašībām tikai 5 būtiski ietekmē antioksidatīvo aktivitāti DFPH$^{\bullet}$ testā (to koeficienti regresijas vienādojumā nozīmīgi atšķiras no 0. Iegūtais regresijas vienādojums:

$$\mathbf{Y_1 = -3{,}08+0{,}043\times X_1+0{,}018\times X_2-0{,}018\times X_3-0{,}014\times X_7+0{,}24\times X_8} \quad (3.5.)$$

Y_1 – antioksidatīva aktivitāte DFPH$^{\bullet}$ testā (mol dezaktivēto DFPH$^{\bullet}$/mol OH_{fenola})

X_1 – G+S fenolu relatīvais saturs, %

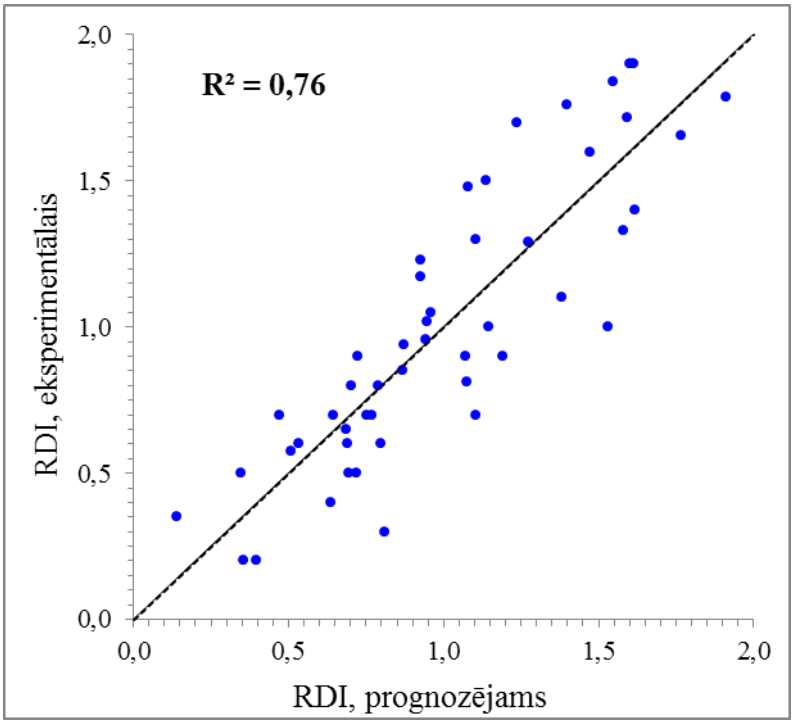
X_2 – fenilpropāna vienību ar CH_2- grupām sānķēdes α-stāvoklī relatīvais saturs%

X_3 – fenilpropāna vienību ar skābekli saturošajām grupām sānķēdēs relatīvais saturs, %

X_7 – π-konjugēto sistemu izmērs (atomu skaits)

X_8 – OCH_3/FPV

Iegūtais modelis labi apraksta zināmo deskriptoru ietekmi uz antioksidatīvo aktivitāti (3.29. att.). Determinācijas koeficients R^2=0,76 parāda, ka vienādojumā iekļautie struktūras deskriptori izskaidro ~ 80% no antioksidatīvas aktivitātes variācijas. Tas norāda uz svarīgo struktūras deskriptoru esamību, kurus neizdevas noteikt. Starp šādiem deskriptoriem var būt telpiskie faktori.



3.29. att. **Prognozējamās un eksperimentāli noteiktās RDI vērtības DFPH$^{\bullet}$ testā**

Tomēr šim *QSAR* vienādojumam ir liela nozīme, jo tas parāda, kā lignīnu antioksidatīvo aktivitāti (reakcijās pēc *PCET* mehānisma) nosaka tās pašas struktūras īpašības kā lignīna modeļvielām un radniecīgajiem mazmolekulārajiem polifenoliem, kas līdz šim nebija parādīts. Ir noskaidrots, ka polifenolu molekulmasa neietkmē termodinamiku to reakcijā ar radikāļiem.

Regresijas vienādojuma koeficienti parāda, kā izmainīsies rezultatīvais faktors (antioksidatīva aktivitate), ja dotais deskriptors (struktūras īpašība) izmainīsies par vienu vienību, pārējiem faktoriem paliekot nemainīgiem. Tie nedod priekštatu par katra deskriptora relatīvo svarīgumu un ieguldījumu antioksidatīvajā aktivitātē. Lai klasificētu deskriptorus pēc to ietekmes uz antioksidatīvo aktivitāti, ir jāizmanto standartizēto koeficientu vērtības. Saskaņā ar parastas daudzfaktoru lineārās regresijas analīzes rezultātiem, antioksidatīvo aktivitāti noteicošie struktūras deskriptori pēc to ieguldījuma ir klasificējami sekojoši: **G+S fenilpropāna vienību relatīvais saturs** (0,53) >**fenilpropāna vienību ar CH_2- grupām sānķēdes α-stāvoklī relatīvais saturs** (0,46) > **fenilpropāna vienību ar skābekli saturošajām grupām sānķēdēs relatīvais saturs** (-0,40) > **π-konjugēto sistemu izmērs** (-0,27). Saskaņā ar *CCR* analīzes rezultātiem antioksidatīvo aktivitāti noteicošie struktūras deskriptori pēc to ieguldījuma ir klasificējami sekojoši: **G+S fenilpropāna vienību relatīvais saturs** (0,51) > **fenilpropāna vienību ar CH_2- grupām sānķēdes α-stāvoklī relatīvais saturs** (0,37) > **fenilpropāna vienību ar skābekli saturošajām grupām sānķēdēs relatīvais saturs** (-0,40) > **π-konjugēto sistemu izmērs** (-0,23) > **-OCH_3/FPV** (0,16). Abas šīs analīzes vienādi klasificē deskriptoru ieguldījumus, bet *CCR* analīze ļāva labāk atšķirt tos savā starpā. *CCR* analīze parādīja, ka augstāko šķērsēniskās validācijas koeficienta vērtību (0,70) iegūst, ja vienādojumā iekļauj 5 deskriptorus. Parastās daudzfaktoru lineārās regresijas analīze nedeva iespēju novērtēt piektā deskriptora (-OCH_3/FPV) svarīgumu.

Antioksidatīvo aktivitāti noteicošas struktūras īpašības norāda uz lignīnu reakciju ar $DFPH^{\bullet}$ pēc *PCET* mehānisma. Lielākais ieguldījums ir deskriptoram, kas raksturo *o*-metoksilgrupu saturu. Metoksilgrupas (*o*-stāvoklī) ievērojami pazemina fenola O-H *BDE*, kā arī palielina vienkāršo fenolu antioksidatīvo aktivitāti. Svarīgs ieguldījums ir CH_2-aizvietotāju klātbūtnei sānķēdes α– stāvoklī. Šīs grupas darbojas kā elektronu donori, atvieglojot fenola O-H saites heterolītisko disociāciju. Skābekli saturošās grupas fenilpropāna vienību sānķēdēs negatīvi ietekmē lignīnu antioksidatīvo aktivitāti. Tas var būt saistīts ar šo grupu elektronatvelkošu indukcijas efektu, kas palielina *BDE*.

Pētījumos par diarilheptanoīdu antioksidatīvo aktivitāti ir parādīts, ka $ABTS^{\bullet+}$ tests var dot vērtīgu informāciju par struktūras īpašībām, kas nosaka *SPLET* mehānisma norisi. Izmantojot CCR analīzi, ir iegūts regresijas vienādojums:

$$\mathbf{Y_2 = 1{,}46 - 0{,}013 \times X_3 - 0{,}015 \times X_4 + 0{,}050\ X_5 - 0{,}018 \times X_7 + 0{,}32 \times X_8} \quad (3.6.)$$

Y_2 - antioksidatīva aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ testā (moli dezaktivēto $ABTS^{\bullet+}$/moli OH fenola)

X_3 – fenilpropāna vienību ar skābekli saturošajām grupām sānķēdēs relatīvais saturs, %

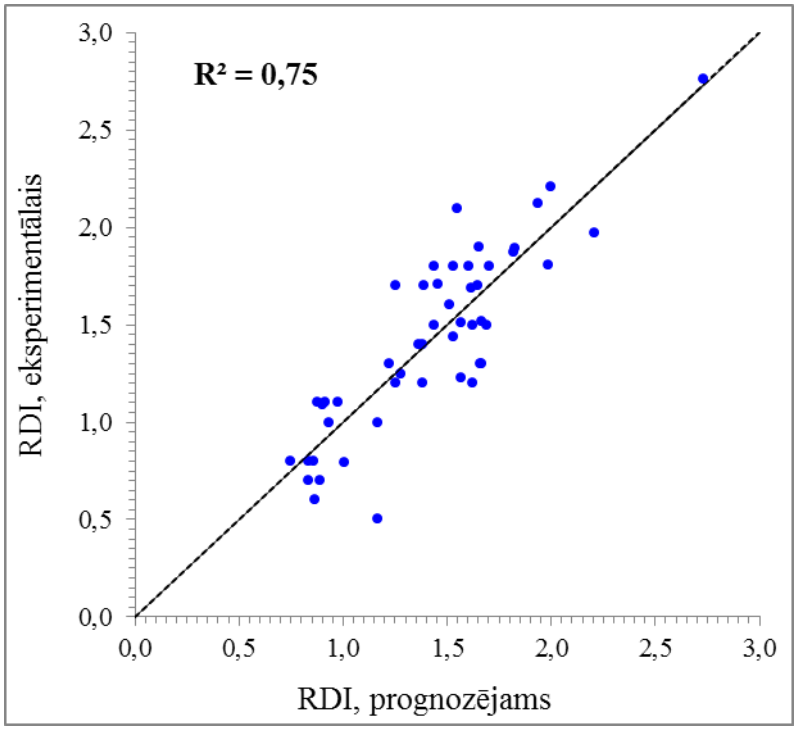
X_4 – ogļhidrātu relatīvais saturs, %

X_5 – $(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$ attiecība

X_7 – π–konjugēto sistemu izmērs (atomu skaits)

X_8 – OCH_3/FPV

Saskaņā ar *CCR* analīzes rezultātiem, antioksidatīvo aktivitāti noteicošie struktūras deskriptori pēc to ieguldījuma ir klasificējami sekojoši (iekavās ir dotas standartizēto koeficientu vērtības): **$(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$** (0,92) > **ogļhidrātu relatīvais saturs** (-0,51) > **fenilpropāna vienību ar skābekli saturošajām grupām sānķēdēs saturs** (-0,33) > **π–konjugēto sistemu izmērs** (-0,32) > **– OCH_3/FPV** (0,16). Atšķirībā no iepriekšējā modeļa, svarīgākais struktūras deskriptors, kas pozitīvi ietekmē antioksidatīvo aktivitāti $ABTS^{\bullet+}$ testā, ir $(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$ attiecība, kas raksturo lignīna struktūras izmaiņas tā izdalīšanas gaitā, tai skaitā ēterisko saišu destrukciju.



3.30. att. **Prognozējamās un eksperimentāli noteiktās RDI vērtības $ABTS^{\bullet+}$ testā**

Antioksidatīvā aktivitāte $ABTS^{\bullet+}$ testā nav atkarīga no G+S fenilpropāna vienību satura un CH_2- aizvietotāju sānķēdes α– stāvoklī satura, kas nosaka fenola O-H saites heterolītisko

disociāciju, toties tā ir atkarīga no fenilpropāna vienību ar skābekli saturošajām grupām sānķēdēs satura un π–konjugēto sistemu izmēra, kas nosaka elektrona pārnesi no polifenola uz radikāli. Tas norāda uz lignīnu reakciju ar $ABTS^{\bullet+}$ pēc *SPLET* vai *ET-PT* mehānisma. Lignīna un diarilheptanoīdu pKa vērtību salīdzinājums liecina *SPLET* mehānisma labā. Arī ogļūdeņražu ievērojama negatīva ietekme var būt saistīta ar to ietekmi uz lignīnu pK_a vērtībām, kam ir svarīga nozīme *SPLET* mehānismā. Determinācijas koeficients, kas parāda,. kādu daļu no rezultatīvā faktora variācijas izskaidro modelī iekļautie parametri, ir 0,75 (3.30. att.). Starp faktoriem, kuriem var būt svarīga loma reakcijā ar $ABTS^{\bullet+}$, ir α-, β- un γ-alifātiskās hidroksilgrupas, sfēriskie faktori, iekšmolekulārās ūdeņraža saites. Pētījumu rezultāti parāda, ka $ABTS^{\bullet+}$ un $DFPH^{\bullet}$ testu kombinācija palīdz aprakstīt diarilheptanoīdu un lignīnu struktūras-aktivitātes sakarības, ņemot vērā gan ar protonu saistītu elektronu pārneses, gan atsevišķo elektronu pārneses mehānismus. *CCR* analīze ir labi piemērota lignīnu *QSAR* noteikšanai.

SECINĀJUMI

1) Izstrādāta metodoloģija augu mazmolekulāro un lielmolekulāro polifenolu antioksidatīvas aktivitātes vispusīgai raksturošanai, kura apvieno eksperimentālās analītiskās ķīmijas, hemometrijas un molekulārās modelēšanas metodes, ļauj iegūt plašāku informāciju par polifenolu struktūras un antioksidatīvas aktivitātes sakarībām un prakstiskās izmantošanas iespējām. Tam ir svarīga nozīme dabas resursu izmantošanas racionalizācijā, kā arī dabas polifenolu izmantošanas optimizācijā.

2) Pierādīts, ka testā ar stabilajiem brīvajiem radikāļiem, izsakot augu polifenolu antioksidatīvo aktivitāti kā dezaktivēto radikāļu skaitu uz fenola hidroksilgrupu, vislabāk var aprakstīt struktūras un aktivitātes sakarības.

3) Apvienotie eksperimentālie un teorētiskie pētījumi parādīja mizas diarilheptanoīdu katehola vienības kā H-atoma donora svarīgumu efektīvai radikāļu dezaktivēšanai. Ir apstiprināta citām polifenolu klasēm zināmā *o*-metoksilgrupu pozitīvā ietekme uz antioksidatīvo aktivitāti, kā arī alifātiskās ķēdes karbonilgrupu negatīvā ietekme. Ir parādīts, ka dubultsaites alifātiskās ķēdes α-stāvoklī ievērojami palielina izveidoto fenoksilradikāļu stabilitāti, bet nepalielina antioksidatīvo aktivitāti. *PCET (*protonu saistītā elektronu pārnese) ir galvenais mehānisms diarilheptanoīdu reakcijās ar brīvajiem radikāļiem, svarīgs ieguldījums ir arī *SPLET* (secīgā protona zaudēšanas elektronu pārnese) mehānismam.

4) Visas lignīna modeļvielu antioksidatīvo aktivitāti ietekmējošās struktūras īpašības nosaka arī lielmolekulāro lignīnu antioksidatīvās īpašības, un parādītas kopīgas struktūras un antioksidatīvas aktivitātes sakarības radniecīgajiem dabas mazmolekulārajiem un lielmolekulārajiem polifenoliem, kā arī to līdzīgie darbības mehānismi. Nav konstatēta molekulmasas palielināšanas negatīvā ietekme uz pētāmo polifenolu antioksidatīvo aktivitāti.

5) Svarīgākās struktūras īpašības, kas ietekmē lignīnu reaģētspēju pēc *PCET* mehānisma, ir: *o*-metoksilgrupas, CH_2-grupas alifātiskās ķēdes α-stāvoklī, karbonilgrupas alifātiskajā ķēdē, π-konjugēto sistēmu izmērs. Svarīgākās struktūras īpašības, kas nosaka lignīnu reaģētspēju pēc mehānismiem, kas ir saistīti ar atsevišķa elektrona pārnesi (*SPLET; ET-PT* - elektronu pārnese - protonu pārnese), ir ēteriskās saites alifātiskajās ķēdēs, ogļūdeņražu

saturs, metoksilgrupu skaits uz fenilpropāna vienību, π–konjugēto sistēmu izmērs. Pirmo reizi iegūti analītiskie modeļi, kas kvantitatīvi raksturo lignīnu struktūras un aktivitātes sakarības dažādos testos.

6) Frakcionējot lignīnu ar organiskajiem šķīdinātājiem, var iegūt antioksidantu virkni, mainot to īpašības (T_s, polidispersitāte, molekulmasas sadalījums) un dažādu struktūras vienību proporcijas, tādā veidā regulējot to efektivitāti dažādās sistēmās/materiālos un rezultātā paplašinot lignīnu izmantošanas iespējas par antioksidantiem. Piemēram, ir parādīts, ka *kraft* lignīnu polimērās frakcijas ap 2 % uzrāda ievērojamu inhibējošo aktivitāti attiecībā uz poliuretānu plēvju termooksidēšanās destrukciju, bet to oligomērā frakcija efektīvi stabilizē rapšu eļļu pret oksidēšanos ar skābekli.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. **Boersma A.** Predicting the efficiency of antioxidants in polymers. *Polymer Degradation and Stability,* **2006**, *91*, 472 - 478.
2. **Ковтун Г.А.** Реакционная способность взаимодействия фенольних антиоксидантов с пероксильными радикалами. *Катализ и нефтехимия*, **2000**; 1-8.
3. **Malik J., Krohnke, C.** Polymer stabilization: present status and possible future trends. *Comptes Rendus Chimie*, **2006**, *9* (11-12), 1330-1337.
4. **Рогинский В. А.** Фенолъные антиоксиданти: реакционная способность и эффективность, Москва, Наука, **1988**; 51 - 95.
5. **Ragnar M., Lindgren C. T., Nivebrant N. O.** pKa-values of Guaiacyl and Syringyl Phenols Related to lignin. *Wood Chem. Technol.,* **2000**, *20* (3), 277-305.
6. **Scott G.** Atmospheric Oxidation and Antioxidants; Elsevier: Amsterdam, **1993**, *1*;
7. Haliwell, B. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, *49*, 1341 - 1348.
8. **Pospishil J.** Mechanistic Action of Phenolic Antioxidants in Polymers - A Review. *Polym. Degrad. Stab.,* **1988**, *20*, 181 - 202
9. **Scott. G.** Developments in polymer stabilisation, **1982**, *20* (10), *10-240.*
10. **Heiserman W. M.; Can S. Z.; Walker R. A.; Begley T. H.; Limm W.** Interfacial behavior of common food contact polymer additives. *J. Colloid. Interface Sci.,* **2007**, *311*, 587 - 594.
11. **Chattopadhyay D. K.; Webster D. C.** Thermal stability and flame retardancy of polyurethanes. *Prog. Polym. Sci.,* **2009**, *34*, 1068 - 1133.
12. **Xiu-Qin L.; Chao J.; Yan-Yan S.; Min-Li Y.; Xiao-Gang C.** Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. *Food Chem.* **2009**, *113*, 692 - 700.
13. **Rajeev K.** Global Antioxidants Market: Trends & Opportunities (2013-2018), *Daedal Research,* Delhi, Publish Date:July **2013**, No. of Pages:58
14. **Butti M.; Vischetti A.** Songwon looks to emerging markets & Middle East for growth; expands portfolio to inlude HALS in tie-up with SABO. Polymer stabilizers, *Chemical Weekly,* **2013**, 209 - 210.
15. **Saad B.; Sing Y. Y.; Nawi M. A.; Hashim N.; Ali A. S. M.; Saleh M. I.; Sulaiman S. F.; Talib K. M.; Ahmad K.** Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chem.,* **2007**, *105*, 389 - 394.

16. **Karovičová J.; Šimko P.** Determination of synthetic phenolic antioxidants in food by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., A.* **2000**, *882*, 271 - 281.
17. Perrin C.; Meyer, L. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection. *Food Chem.* **2002**, *77*, 93 - 100.
18. **Cirillo, G.; Iemma F.** Antioxidant Polymers: Synthesis, Properties and Applications; Wiley and Scrivener, **2012**, 493.
19. **Foldes E.; Szigeti - Erdei A.** Migration of Additives in Polymers. *J. Vinyl Addit. Technol.* **1997**, *3*, 220 - 224.
20. **Gray R. L.; Lee R. E.; Sanders B. M.** Low volatility antioxidants for scorch protection of polyurethane foams. *J. Vinyl Addit. Technol.*, **1996,** *2*, 265 - 269.
21. **Marcato B.; Guerra S.; Vianello M.; Scalia S.** Migration of antioxidant addirives from various polyolefinic plastics into oleaginous vehicles. *Int. J. Pharm.*, **2003**, *257*, 217 - 225.
22. **Jamshidian M.; Tehrany E. A.; Desobry S.** Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film. *Food Control,* **2012**, *28*, 445 - 455.
23. **Malik J.; Krohnke C.** Polymer stabilization: present status and possible future trends. *C. R. Chim.*, **2006**, *9*, 1330 - 1337.
24. **Лапин А.А.; Борисенков М.Ф.; Карманов А.П.; Бердник И.В.; Кочева Л.С.; Мусин Р.З.; Магдеев И.М.** Антиоксидантные свойства продуктов растительного происхождения. *Химия растительного сырья*, **2007**, *2*, 79-83.
25. **Norajit K.; Kim K. M.; Ryu G. H.** Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *J. Food Eng.*, **2010**, *98*, 377 - 384.
26. **Martínez L. M.; Penci M. C.; Ixtaina V.; Ribotta P. D.; Maestri D.** Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. *LWT –Food Sci. Technol.*, **2013**, *51*, 44 - 50.
27. **Itokawa H.; Morris-Natschke S. L.; Akivama T.; Lee K. H.** Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *J. Nat. Med.*, **2008**, *62*, 263 - 280.
28. **Amic D.; Davidovič-Amič D.; Bešlo D.; Trinajstic N.** Structure-Radical Scavenging activity relationships of flavanoids. *Croat. Chem. Acta*, **2003**, *76*, 55-61.
29. **Yang M. H.; Yoon K. D.; Chin Y. W.; Park J. H.; Kim J.** Phenolic compounds with radical scavenging and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitory activities from Dioscorea opposita. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 2689 - 2694.

30. **Valko M.; Rhodes C. J.; Moncol J.; Izakovic M.; Mazur M.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.,* **2006**, *160,* 1-40
31. **Kota N.; Krishna P.; Polasa K.** Alterations in antioxidant status of rats following intake of ginger through diet. *Food Chem.,* **2008**, *106,* 991 - 996.
32. **Bartosz G.** Total Antioxidant capacity. *Adv. Clin. Chem.,* **2003**, *37*, 220 - 241.
33. **Nagler R. M.; Klein I.; Zarhevsky N.; Drigues N.; Reznick A. Z.** Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic. Biol. Med.,* **2002**, *32*, 268 - 277.
34. **Ames B. N.; Shigenaga M. K.; Hagen T. M.** Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **1993**, *90*, 7915 - 7922.
35. **Niki E.** Review Article Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.,* **2010**, *49,* 503 - 515.
36. **Moure A.; Cruz J. M.; Franco D.; Domõanguez J. M.; Sineiro J.; Domoanguez H.; Josea M.; Parajoa C.** Review Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* **2001**, *72*, 145 - 171.
37. **Limón - Pacheco J.; Gonsebatt M. E.** The role of antioxidants and antioxidant - related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat. Res.* **2009**, *674*, 137 - 147.
38. **Блажей А.; Шутый Л.** Фенольные соединения растительного происхождения. Москва, Мир, **1977,** 1 - 239.
39. **Resat A.; Guclu K.; Demirata B.; Ozyurek M.; Celik S. E.; Bektasoglu B.; Berker I. K.; Ozyurt D.** Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, **2007**, *12*, 1496 - 1547.
40. **Smidt J.; Amrhein N.** Molecular organisation of the schicimate pathway in higher plants. *Phytochemistry*, **1995**, *39*, 737 - 749.
41. **Weisshaar B.; Jenkins G. I.** Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1998,** *1*, 251 - 257.
42. **Balasundram N.; Sundram K.; Samman S.** Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chem.*, **2006**, *99*, 191 - 203.
43. **Sakihama Y.; Cohen M. F.; Grace S. C.; Yamasaki H.** Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, **2002**, *177*, 67 - 80.

44. Buer C. S.; Imin N.; Djordjevic M. A. Flavanoids: New Roles for Old Molecules. *J. Integr. Plant Biol.* **2010**, *52*, 98 - 111.

45. Dixon R. A.; Paiva N. L. Stress - induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, **1995**, *7*, 1085 - 1097.

46. Iijima K.; Yoshizumi M.; Ouchi Y. Effect of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell function—molecular mechanism of the 'Frenchparadox'. *Mech. Ageing Dev.*, **2002**, *123*, 1033 - 1039.

47. Yin J.; Becker E. M.; Andersen M. L.; Skibsted L. H. Green tea extract as food antioxidant. Synergism and antagonism with a - tocopherol in vegetable oils and their colloidal systems. *Food Chem.*, **2012**, *135*, 2195 - 2202.

48. Abdillahi H. S.; Finnie J. F.; Van Staden J. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-tyrosinase and phenolic contents of four *Podocarpus* species used in traditional medicine in South Africa. *J. Ethnopharmacol,*. **2011**, *136*, 496 - 503.

49. Krishnaiah D.; Sarbatly R.; Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.*, **2011**, *89*, 217 - 233.

50. Chaves S.; Canário S.; Carrasco M. P.; Mira L.; Santos M. A. Hydroxy(thio)pyrone and hydroxy(thio)pyridinone iron chelators: Physico-chemical properties and anti-oxidant activity. *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, *114*, 38 - 46.

51. Trouillas P.; Marsal P.; Svobodova A.; Vostalova J.; Gazak R.; Hrbac J.; Sedmera P.; Kren V.; Lazzaroni R.; Duroux J. L.; Walterova D. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-Dehydrosillybin Flavanolignans: A joint experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. A*, **2008**, *112*, 1054 - 1063.

52. Amic D.; Lucic B. Reliability of bond dissociation enthalpy calculated by the PM6 method and experimental TEAC values in antiradical QSAR of flavonoids. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010,** *18*, 28 - 35.

53. Vaganek A.; Rimarčik J.; Lukeš V.; Klein E. On the energetics of homolytic and heterolytic O-H bond cleavage in flavonoids. *Comput. Theor. Chem.*, **2012**, *991*, 192 - 200.

54. Barclay L. R. C.; Xi F.; Norris J. Q. Antioxidant properties of Phenolic lignin model compounds. *J. wood Chem. Technol.*, **1997**, *17*, 73 - 90.

55. Torres R.; Urbina F.; Morales C.; Modak B.; Monache F. Antioxidant properties of lignans and ferulic acid from the resinous exudate of Larrea nitida. *J. Chil. Chem. Soc*., **2003**, *48*, 3.

56. Setzer W. N. Lignin - derived oak phenolics: a theoretical examination of additional potential health benefits of red wine. *J. Mol. Model*, **2010**, *8*, 1841 - 1845.

57. Dizhbite T.; Telysheva G.; Jurkjane V.; Viesturs, U. Characterization of the radical scavenging activity of lignins – natural antioxidants. *Bioresour. Technol.,* **2004,** *95*, 309 - 317.

58. Di Meo F.; Lemaur V.; Cornil J.; Lazzaroni R.; Duroux J.L.; Olivier Y.; Trouillas P. Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus Electron transfer. *J. Phys. Chem. A.,* **2013**, *117*, 2082 - 2092.

59. Perez-Jimenez J.; Arranz S.; Tabernero M.; Dıaz- Rubio M. E.; Serrano J.; Goni I.; Saura-Calixto F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 274 - 285.

60. Cotelle N.; Bernier J. L.; Heninchart J. P.; Catteau J. P.; Gaydou E.; Wallet J. C. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *J. Free Radic. Biol. Med.,* **1992**, *13*, 211 - 219.

61. Хасанов В. В.; Рыжова Г. Л.; Мальцева Е. В. Методы исследования антиоксидантов. *Химия растительного сырья*, **2004**, *3*, 63-75.

62. Garcia-Conesa M. T.; Wilson P. D.; Plumb G. W.; Ralph J.; Williamson G. Antioxidant properties of 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-β,β'-bicinnamic acid (8-8-diferulic acid, non-cyclic form). *J. Sci Food Agric*., **1999**, *79*, 379 - 384 .

63. Prior R. L.; Wu X.; Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.,* **2005**, 53, 4290 - 4302.

64. Alam M. N.; Bristi N. J.; Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.,* **2013**, *21*, 143 - 152.

65. Resat A.; Guclu K.; Demirata B.; Ozyurek M.; Celik S. E.; Bektasoglu B.; Berker I. K.; Ozyurt D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, **2007**, *12*, 1496 - 1547.

66. Polovka M.; Brezova V.; Staško A. Antioxidant properties of tea investigated by EPR spectroscopy. *Biophys. Chem.,* **2003**, *106*, 39 - 56.

67. Osman A. M.; Wong K. K. Y.; Hill S. J.; Fernyhough A. Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS - derived radicals

formed upon reaction with polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **2006**, *340*, 597 - 603.

68. Osman A. M.; Wong K. K. Y.; Fernyhough A. ABTS radical - driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **2006**, *346*, 321 - 329.

69. Ak T.; Gulcin I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.,* **2008**, *174*, 27 - 37.

70. Moreira F. T. C.; Guerreiro J. R. L.; Barros R.; Sales M. G. F. The effect of method, standard and sample components on the total antioxidant capacity of commercial waters assessed by optical conventional assays. *Food Chem.,* **2012**, *134*, 564 - 571.

71. Caillet S.; Yu H.; Lessard S.; Lamoureux G.; Ajdukovic D.; Lacroix M. Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chem.,* **2007**, *100*, 542 - 552.

72. Arts M. J. T. J.; Dallinga J. S.; Voss H. P.; Haenen G. R. M. M.; Bast A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.,* **2004**, *88*, 567 - 570.

73. Obón J. M.; Castellar M. R.; Cascales J. A.; Fernịndez-López J. A. Assessment of the TEAC method for determining the antioxidant capacity of synthetic red food colorants. *Food Res. Int.,* **2005**, *38*, 843 - 845.

74. Kinraide T. B.; Poschenrieder C.; Kopittke P. M. The standard electrode potential (E0) predicts the prooxidant activity and the acute toxicity of metal ions. *J. Inorg. Biochem.,* **2011**, *105*, 1438 - 1445.

75. Pinchuk I.; Shoval H.; Dotan Y.; Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chem. Phys. Lipids,* **2012**, *165*, 638 - 647.

76. Pan X.; Kadla J. F.; Ehara K.; Gilkes N.; Saddler J. N. Organosolv Ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationships between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *J. Agric Food Chemistry,* **2006**, *54*, 5806 - 5813.

77. Zulueta A.; Esteve M. J.; Frigola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.,* **2009**, *114*, 310 - 316.

78. Wu Q.; Wang M.; Simon J. E. Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*., **2004**, *812*, 325 - 355.

79. Laus M. N.; Tozzi D.; Soccio M.; Fratianni A.; Panfili G.; Pastore D. Dissection of antioxidant activity of durum wheat (Triticum durum Desf.) grains as evaluated by the new LOX/RNO method. *J. Cereal Sci.,* **2012**, *56*, 214 - 222.

80. Cos P.; Ying L.; Calomme M.; Hu J.P.; Cimanga K.; Poel B.V.; Pieters L.; Vlietinck A.J.; Berghe V. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.,* **1998**, *61*,71 - 76.

81. Ugartondo V.; Mitjans M.; Vinardell M. P. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. *Bioresour. Technol*., **2008**, *99*, 6683 - 6687.

82. Kadla J. F.; Kubo S. Lignin-based polymer blends: analysis of intermolecular interactions in lignin–synthetic polymer blends. *Compos Part A Appl Sci Manuf.,* **2004**, *35*, 395 - 400.

83. Pedersen J. P.; lngemarsson A.; Olsson. J. O. Oxidation of rapeseed oil, rapeseed methylester (RME) and diesel fuel studied with GC/MS. *Chemosphere,* **1999**, *38*, 2467 - 2474.

84. Bandonienė D.; Pukalskas A.; Venskutonis R. P.; Gruzdienė D. Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. *Food Res. Int*., **2000**, *33*, 785 - 791.

85. Re R.; Pellegrini N.; Proteggente A.; Pannala A.; Yang M.; Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolarization assay. *J. Free Radic. Biol. Med.,* **1999**, 26, 1231 - 1237.

86. Pukalskas A.; Venskutonis R. P.; Dijkgraaf I.; Van Beek T. A. Isolation, identification and activity of natural antioxidants from costmary (*Chrysanthemum balsamita*) cultivated in Lithuania. *Food Chem.,* **2010**, *122*, 804 - 811.

87. Songklanakarin P. M. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol*., **2004**, *26*, 211 - 219.

88. Yen G. C.; Chen H. Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to their Antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.,* **1995**, *43*, 27 - 32.

89. Pryor W. A.; Cornicelli J. A.; Devall L. J.; Tait B.; Trivedi B. K.; Witiak D. T.; Wu, M. A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *J. Org. Chem*., **1993**, *58*, 3521-3532.

90. Surveswaran V. S.; Cai Y. Z.; Corke H.; Sun M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.,* **2007**, *102*, 938-953.

91. Brand-Williams W.; Cuvelier M. E.; Reset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *LWT – Food Science and Technology*, **1995**, *28*, 25 - 30.

92. Trouillas P.; Marsal P.; Siri D.; Lazzaroni R.; Duroux J. L. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. Rapid communication. *Food Chem.*, **2006**, *97*, 679 - 688.

93. Anouar E.; Kosinova P.; Kozlowski D.; Mokrini R.; Duroux J. L.; Trouillas P. New aspects of the antioxidant properties of phenolic acids: a combined theoretical and experimental approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, 7659 - 7668.

94. Claeson P.; Claeson U. P.; Tuchinda P.; Reutrakul V. Occurrence, Structure and Bioactivity of 1,7 – Diarylheptanoids. In *Studies in Natural Products Chemistry*, **2002**, *26*, 881 - 908.

95. Keseru G. M.; Nogradi M. The chemistry of Natural Diarylheptanoids. In Studies in *Natural Products Chemistry*, **1995**, *17*, 357-393.

96. Ramirez-Ahumada M.; Del C.; Timmermann B. N.; Gang D. R. Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zinger officinale*): Identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry*, **2006,** *67*, 2017 - 2029.

97. O`Rourke C.; Byres M.; Delazar A.; Kumarasamy Y.; Nahar L.; Stewart F.; Sarker D. Hirsutanonol, oregonin and genkwanin from the seeds of *Alnus glutinosa* (*Betulaceae*). *Biochem. Syst. Ecol.*, **2005**, *33*, 749 - 752.

98. Ma J.; Jin X.; Yang L.; Liu Z. L. Diarylheptanoids from the rhizomes of Zingiber officinale. *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 1137 - 1143.

99. Kaewamatawong R.; Boonchoong P.; Teerawatanasuk N. Diarylheptanoids from *Curcuma comosa*. *Phytochem. Lett.*, **2009**, *2*, 19 - 21.

100. Chen J.; Ruben F.; Laredo G.; Karchesy J. Minor Diarylheptanoid Glycosides of *Alnus rubra* bark. *Phytochemistry*, **2000**, *53*, 971 - 973.

101. Mshvildadze V.; Legault J.; Lavoie S.; Gauthier C.; Pichette A. Anticancer diarylheptanoid glycosids from the inner bark of *Betula papyrifera*. *Phytochemistry*, **2007**, *68*, 2531 - 2536.

102. Tung N. H.; Kwon H. J.; Kim J. H.; Ra J. C.; Ding Y.; Kim J. A.; Kim Y. H. Anti-influenza diarylheptanoids from the barkl of *Alnus japonica*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010,** *20*, 1000 - 1003.

103. Saraji M.; Mousavi F. Use of hollow fibre-based liquid-liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography-diode arraydetection for the determination of phenolic acids in fruit juices. *Food Chem.*, **2010**, *123*, 1310 - 1317.

104. Wang D.; Lu J.; Miao A.; Xie Z.; Yang D. HPLC-DAD-ESI-MS/MS Analysis of Polyphenols and Purine Alkaloids in Leaves of 22 Tea Cultivars in China. *J. Food Comp. Anal.*, **2008**, *21*, 361 - 369.

105. Vlietinck A.J.; Aper S. Biological Screening Methods in the search for Pharmacologically Active Natural Products. In: Bioactive Compounds from Natural Sources; Tringali, C. Ed.; Taylor&Francis: London, **2001**, 39 – 40.

106. Ravikumar H. S.; Haraprasad N.; Makari H. K.; Gurumurthy H.; Chetan D. M.; Anil H. S. Polyphenol Composition of Nutraceutical Concentrate Obtained from Edible Vegetable Oil Seeds. *Electronic J. of Environ. Agric. Food Chem.*, **2008**, *8*, 3181 - 3198.

107. Goldbach M. Entwicklung eines miniaturisierten elektrophoretischen Analysensystems auf Keramikbasis zur Bestimmung von Polyphenolen. Ph.D. Thesis, Philips - Universitat Marburg Pharmazie Fakultat, Marburg, **2006**.

108. Liimatainen J.; Karonen M.; Sinkkonen J.; Helander M.; Salminen J. P. Characterization of Phenolic Compounds from Inner Bark of *Betula pendula*. *Holzforschung*, **2012**, *66*, 171- 181.

109. Wei Q. Y.; Ma J. P.; Cai Y. J.; Yang L.; Liu Z. L. Cytotoxic and apoptotic activities of diarylheptanoids and gingerol-related compounds from the rhizome of Chinese ginger. *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, *102*, 177 - 184.

110. Gonzalez-Laredo R. F. Polyphenols from the bark of Douglas - fir and red alder. Ph.D. Thesis, Oregon State University, US, **1994**.

111. Saxena G.; Farmer S.; Hancock R. E. W.; Towers G. H. N. Antimicrobial Compounds from *Alnus rubra*. *Int. J. Pharmacognosy*, **1995**, *33*, 33 - 36.

112. Jin W.; Cai X. F.; Na M.; Lee J. J.; Bae K. Diarylheptanoids from Alnus hirsuta Inhibit the NF-kB Activation and NO and TNF–α Production. *Biol. Pharm. Bull.*, **2007**, *30*, 810 - 813.

113. Hanawa F.; Tower G. Flavones from *Alnus rubra* Bong Seed Coat. *Bulletin of FPRI.* **2003**, 3885 - 3891.

114. Kevin S.; Lister G.; Lister C. Flavonoid Functions in Plants. In *Flavonoids*; Andersen, M.; Markham, R., Eds.; CRC Press: New York, **2006**, 397 – 443

115. Triboulot M. C.; Godart V.; George B.; Merilin A.; Deglise X. Natural and after ageing appearance stabilisation of wood. *Proc. EWLP*, **2000**, 6th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, Bordeaux, France, 2000, 139 - 142.

116. Nathan R. G.; Lorenz P.; Metraux J. P. Oregonin from the bark of European *Alnus* species. *Biochem. Syst. Ecol.*, **2002**, *30*, 471 - 474.

117. Suleiman G.; Hulya C.; Hasan S. An efficient synthesis of Alnustone, a Naturally occuring compound. *Turk. J. Chem.*, **2003**, *27*, 31 - 34.

118. Tori M.; Hashimoto A.; Hirose K.; Asakawa Y. Diarylheptanoids, flavanoids, stilbenoids, sesquiterpenoids and a phenanthrene from *alnus maximowiczii*. *Phytochemistry,* **1995**, *40,* 1263 - 1264.

119. Masuda Y.; Kikuzaki H.; Hisamoto M.; Nakatani N. Antioxidant properties of gingerol relatedcompounds from ginger. *BioFactors,* **2004**, *21,* 293 - 296.

120. Šmite E.; Lundgren L. N.; Andersson R. Arylbutanoid and diarylheptanoid glycosides from inner bark of *Betula Pendula*. *Phytochemistry*, **1993**, *32*, 365 - 369.

121. Sawamura R.; Sun Y.; Yasukawa K.; Shimizu T.; Watanabe W.; Kurokawa M. Antiviral activities of diarylheptanoids against influenza virus *in vitro*. *J. Nat. Med*. **2010**, *64*, 117 - 120.

122. Martin-Cordero C.; Lopez-Lazaro, M.; Agudo M. A.; Navarro E.; Trujillo J.; Ayuso M. J. A cytotoxic diarylheptanoid from *Viscum cruciatum*. *Phytochemistry,* **2001**, *58*, 567 - 569

123. Galano A.; Alvarez-Diduk R.; Ramirez-Silva M. T.; Alarcon-Angeles G.; Rojas-Hernandez A. Role of the reacting free radicals on the antioxidant mechanism of curcumin *Chem. Phys.*, **2009**, *363*, 13 - 23.

124. ZhaoY.; Tao Q. F.; Zhang R. P.; Zhou C. X.; Dou H.; Shi S. Y.; Xiao Y. C.; Sun L. L.; Zeng S.; Huang K. X.; Zhang X. D.; Li X. K. Two new compounds from *Zingiber officinale*. *Chin. Chem. Lett.*, **2007,** *18*, 1247 - 1249.

125. Zhou C. X.; Zhang X. Y.; Dong X. W.; Tao Q. F.; Dou H.; Zhang R. P.; Huang K. X.; Li X. K.; Chen C. X.; Zeng S.; Zhao Y. Three new diarylheptanoids and their antioxidant property. *Chin. Chem. Lett.*, **2007**, *18*, 1243 - 1246.

126. Ak T.; Gulcin I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.*, **2008**, *174*, 27 - 37.

127. Jitsanong T.; Khanobdee K.; Piyachaturawat P.; Wongprasert K. Diarylheptanoid 7-(3,4 dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene from *Curcuma comosa* Roxb. protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress-induced cell death. *Toxicol. in Vitro*, **2011**, *25*, 167 - 176.

128. Manju M.; Sherin T. G.; Rajasekharan K. N.; Oommen O. V. Curcumin analogue inhibits lipid peroxidation in a freshwater teleost, Anabas testudineus (Bloch)—an in vitro and in vivo study. *Fish Physiol. Biochem*., **2009**, *35*, 413 - 420.

129. Cai W.; Zhang B.; Duan D.; Wu J.; Fang J. Curcumin targeting the thioredoxin system elevates oxidative stress in HeLa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2012**, *262*, 341 - 348.

130. Miquel J.; Bernd A.; Sempere J. M.; Diaz-Alperi J. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **2002**, *34*, 37 - 46.

131. Banerjee A.; Kunwar A.; Mishra B.; Priyadarsini K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin. Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *174*, 134 - 139.

132. Anand P.; Thomas S. G.; Kunnumakkara A. B.; Sundaram C.; Harikumar K. B.; Sung B.; Tharakan S. T.; Misra K.; Priyadarsini I. K.; Rajasekharan K. N.; Aggarwal B. B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharmacol.*, **2008**, *76*, 1590 - 1611.

133. Lee C. S.; Ko H. H.; Seo S. J.; Choi Y. W.; Lee M. W.; Myung S. C.; Bang H. Diarylheptanoid hirsutenone prevents tumor necrosis factor-α-stimulated production of inflammatory mediators in human keratinocytes through NF-κB inhibition. *Int. Immunopharmacol.*, **2009**, *9*, 1097 - 1104.

134. Sivalingam N.; Basivireddy J.; Balasubramanian K. A.; Jacob M. Curcumin attenuates indomethacin-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Arch. Toxicol.*, **2008**, *82*, 471 - 481.

135. Pawar N.; Pai S.; Nimbalkar M.; Dixit G. RP-HPLC analysis of phenolic antioxidant compound 6-gingerol from different ginger cultivars. *Food Chem.*, **2011**, *126*, 1330 - 1336.

136. Ippoushi K.; Takeuchi A.; Ito H.; Horie H.; Azuma K. Antioxidative effects of daikon sprout (Raphanus sativus L.) and ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) in rats. *Food Chem.*, **2007**, *102*, 237 - 242.

137. Tuba A., Ilhami G. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, **2008**, *174*, 27–37

138. Weisshaar B.; Jenkins G. I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1998,** *1*, 251 - 257.

139. Jayaprakasha G. K.; Jaganmohan Rao, L.; Sakariah K. K. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chem.*, **2006**, *98*, 720 - 724.

140. Matsuda H.; Ando S.; Kato T.; Morikawa T.; Yoshikawa M. Inhibitors from the rhizomes of Alpinia officinarum on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorg. Med. Chem.,* **2006**, *14*, 138 - 142.

141. Pan M. H.; Lin-Shiau S. Y.; Lin J. K. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages. *Biochem.Pharmacol*., **2000**, *60*, 1665 - 1676.

142. Peng F.; Tao Q.; Wu X.; Dou H.; Spencer S.; Mang C.; Xu L.; Sun L.; Zhao Y.; Li H.; Zeng S.; Liu G.; Hao X. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger. *Fitoterapia,* **2012**, *83*, 568 - 585.

143. Glasser W. G.; Northey R. A.; Shultz T. P. Lignin: historical, biological and materials perspectives. American Chemical Society, Washington, **2000**, 14-15.

144. Boudet A. M.; Kajita S.; Grima-Pettenati J.; Goffner D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends Plant Sci.,* **2003**, *8*, 576 -581.

145. Dam J. E. G. "Valoir" – R&D program on Valorization of Lignin. In Proceedings of 4th International Forum on Lignin from Pulping of Agricultural Plants, present and future; Lausanne, Switzerland, **1998**, 1-6.

146. Fengel D.; Wegener G. Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter. Berlin - New York, **1984**, p.512.

147. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. Москва, **1974**, 55-147.

148. Brunow G.; Kilpelainen I.; Sipila J.; Syrjanen K.; Karhunen P.; Setala H.; Rummako P. Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin. American Chemical Society, Washington, **2000,** 131–147

149. Gross G. G. From lignins to tannins: Forty years of enzyme studies on the biosynthesis of phenolic compounds. *Phytochemistry*, **2008**, *69*, 3018 - 3031.

150. Kudangaa T.; Prasetyo E. N.; Sipila J.; Nyanhongo G. S.; Guebitz G. M. Enzymatic grafting of functional molecules to the lignin model dibenzodioxocin and lignocellulose material. *Enzyme Microb. Technol.,* **2010**, *46*, 272 - 280.

151. Boerjan W.; Ralph J.; Baucher M. Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol*., **2003**, *54*, 519 - 46.

152. Chen Y.; Sarkanen S. Macromolecular replication during lignin biosynthesis. *Phytochemistry,* **2010**, *71*, 453 - 462.

153. Bikova T.; Treimanis A. Multi-wave UV/VIS detection in SEC analysis of lignin and lignin-carbohydrate complex structure. Proc. EWLP 2002, 7th European Workshop on Lignocelluloses and Pulp, Turku, Finland, **2002**, 209 - 212.

154. Gellerstedt G.; Önnerund H. Inhomogeneities in the chemical structure of hardwood lignins. *Holzforschung*, **2003**, *57, 255* - 265.

155. Sjostorm E. Wood Chemistry: Fundamentals and applications. Academic Press, **1993**, 2, 71-73

156. Боголицын К.Г.; Резников В.М. *Химия сульфитных методов делигнификации древесины*; Экология: Москва, **1994**, 288.

157. Boeriu C. G.; Bravo D.; Gosselink R. J. A.; Van Dam J. E. G. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Ind. Crops prod.*, **2004**, *20*, 205 - 218.

158. Gandini. A. Lignins as macromonomers in the synthesis of polymeric materials. In International Forum on Market of Sulphur – free Lignin; Saint Martin, France, **1991,** 63-64.

159. Brauns F. E. The Chemistry of Lignin; Acad Press: New York, **1952**, 808.

160. Zaķis Ģ. Lignīnu un to atvasinājumu funkcionālā analīze; Zinātne: Rīga, **1987**, 182 - 183.

161. Garrote G.; Cruz J. M.; Moure A.; Domiunguez H.; Parajo J. C. Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. *Trends Food Sci. Technol.*, **2004**, *15*, 191 - 200.

162. Lora H. J.; Glasser W. G. Recent industrial applications of lignin: A sustainable alternative to non - renewable materials. *J. Polym. Environ.*, **2002**, *10*, 39 - 48

163. Gosselink R. J. A.; Snijder M. H. B.; Kranenbarg A.; Keijsers E. R. P.; De Jong E.; Stigsson L.L. Characterisation and application of NovaFiber lignin. *Ind. Crops Prod*., **2004**, *20*, 191 - 203.

164. Dohertya W. O. S.; Mousaviouna P.; Fellowsb C. M. Value adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind. Crops Prod.*, **2011**, *33*, 259 - 276.

165. Rautakivi A. NWBC-2009 Proceedings of the 2nd Nordic Wood Biorefinery Conference, Helsinki, Finland, September 2–4, **2009**, pp 5-162 .

166. Gellerstedt G.; Lindorfs L. In Structural changes in lignin during kraft cooking. 4. Phenolic hydroxyl groups in wood and kraft pulp. *Svensk. Papperstidn*., **1984**, 115 - 118.

167. Gärtner A.; Gellerstedt G.; Tamminen T. Determination of phenolic hydroxyl groups in residual lignin using a modified UV- method. *J. Nord. Pulp Pap. Res*., **1999**, *14*, 163 - 170.

168. Vishtal A.; Kraslawski A. Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources*, **2011**, *6*, 3547 - 3568.

169. Schultz T. P.; Darrel D. N. Efficacy of two organic biocides with co-added antioxidants. *Holzforshung*, **2011**, *65*, 771 - 773.

170. Lora J. H.; Abächerli A.; Doppenberg F. Debottlenecking the recovery system of soda pulp mills by lignin recovery and wet oxidation – Application to non-wood fibers black liquor Tappi pulping process & Product Quality Conference, Boston, **2000**.

171. Henry W.R. „ALCELL ®Lignin" Proc. 3rd International Forum "Markets for Sulfur-Free Lignin" February 29 – March 1, **1996,** Fribourg, Switzerland

172. Wayman M.; Parekh S. R. Biotechnology of biomasas conversion. Great Britain, Biddles Ltd, Guildford and King`s Lynn, **1990**, 278.

173. Pouteau C.; Cathala B.; Dole P.; Kurek B.; Monties B. Structural modification of Kraft lignin after acid treatment: characterization of the apolar extracts and the influence on the antioxidant properties in polypropylene. *Ind. Crops Prod*., **2005**, *21*, 101 - 108.

174. Baglioni P.; Chiaramonti D.; Bonini M.; Soldaini I.; Tondi G. Bio-crude-oil/Diesel oil emulsification: main achievements of the emulsification process and preliminary results of tests on diesel engine. *Progress in Thermochemical Biomass Conversion*; Blqackwell Science: Oxford, **2001**, 1525 - 1540.

175. Meier D.; Andersons B.; Irbe I.; Tshirkova J.; Faix O. Preliminary study of fungicide and sorption effects of fast pyrolysis liquids used as wood preservative. *Progress in Thermochemical Biomass Conversio*n; Blackwell Science: Oxford, **2001**, 1550 - 1564.

176. Radlein D. In: A.V. Bridgwater (Ed.), Fast Pyrolysis of Biomass: A Handbook, CPL Press, Bio-Energy Research Group, Newbury, UK, **1999**, 177.

177. Bayerbach R. Characterization of the water-insoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolitic lignin*). In Part IV: Structure elucidation of oligomeric molecules; Meier, D., Ed.; J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2008**, *85*, 98 - 107.

178. Scholze B.; Hanser C.; Meier D. Characterization of the water-insoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolytic lignin) Part II. GPC, carbonyl goups, and 13C-NMR. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2001**, 58 – 59, 387 - 400.

179. Lin S. Y.; Dence C. W. Methods in lignins chemistry; Springer Verlag: Berlin – Heidelberg, **1992**, 577.

180. Faix, O. Condensation indices of lignins determined by FTIR-spectroscopy. *Holz Roh Werkst*., **1991**, *49* (9), 356.

181. Pranovich A. V.; Reunanen M.; Sjoholm R.; Holmbom B. Dissolved lignin and other aromatic substances in thermomechanical pulp waters. *J. Wood Chem. Techn*., **2005,** *25*, 109 - 132.

182. Faix O.; Meier D.; Fortman I. Thermal degradation products of wood. Gas chromatographic separation and mass spectrometric characterization of monomeric lignin derived products. *Holz als Roh- und Werkstoff,* **1990,** *48,* 281 - 285.

183. Ringena O.; Lebioda S.; Lehnen R.; Saake B. Size-exclusion chromatography of technical lignins in dimethyl sulfoxide/water and dimethylacetamide. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1102,* 154 - 163.

184. Nadji H.; Diouf P. N.; Benaboura A.; Bedard Y.; Riedl B.; Stevanovic T. Comparative study of lignins isolated from Alfa grass (*Stipa tenacissima L.*). *Bioresour. Technol.,* **2009**, 100, 3585 - 3592.

185. Vanderghem C.; Richel A.; Jacquet N.; Blecker, C.; Paquot. M. Impact of formic/acetic acid and ammonia pre-treatments on chemical structure and physico-chemical properties of *Miscanthus x giganteus* lignins. *Polym. Degrad. Stab.* **2011**, *96*, 1761 - 1770.

186. Brodin I., Sjoholm E., Gellerstedt G. Kraft lignin as freedstock for chemical products: The effects of membrane filtration. *Holzforschung,* **2009**, *63* (3), 290-297.

187. Carmen G., Dominique B., Gosselink R.J.A., van Dam E.G. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Ind. Crops Prod.*, **2004**, *20* (2), 205–218

188. Lawoko M., Henriksson G., Gellerstedt G. Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps. *Biomacromolecules*, **2005**, *6* (6), 3467-3473.

189. Lu Q.; Zhu M. H.; Zu Y. G.; Liu W.; Yang L.; Zhang Y.; Zhao X.; Zhang X.; Zhang X.; Li W. Comparative antioxidant activity of nanoscale lignin prepared by a supercritical antisolvent (SAS) process with non-nanoscale lignin. *Food Chem.* **2012**, *135*, 63 – 67.

190. Lu Q.; Liu W.; Yang L.; Zu Y.; Zu B.; Zhu M.; Zhang Y.; Zhang X.; Zhang R.; Sun Z.; Huang J.; Zhang X.; Li W. Investigation of the effects of different organosolv

pulping methods on antioxidant capacity and extraction efficiency of lignin. *Food Chem.,* **2012**, *131*, 313 - 317.

191. Li M. F.; Sun S. N.; Xu F.; Sun. R. C. Microwave-assisted organic acid extraction of lignin from bamboo: Structure and antioxidant activity investigation. *Food Chem.,* **2012**, *134*, 1392 - 1398.

192. Dong X.; Dong M.; Lu Y.; Turley A.; Jin T.; Wu C. Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. *Ind. Crops Prod.,* **2011**, *34*, 1629 - 1634.

193. Faustino H.; Gil N.; Baptista C.; Duarte A. P. Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds Extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors. *Molecules,* **2010**, *15*, 9308 - 9322.

194. Schmidt J. A.; Rye C. S.; Gurnagul N. Lignin inhibits atoxidative degradation of cellulose. *Polym. Degrad. Stab.,* **1995**, *49*, 291 - 297.

195. Sakagami H.; Hashimoto K.; Suzuki F.; Ogiwara T.; Satoh K.; Ito H.; Hatano T.; Takashi Y.; Fujisawa S. I. Molecular requirements of lignin - carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry,* **2005**, *66*, 2108 - 2120.

196. Rozman H. D.; Koay E. L.; Tay G. S. Preliminary study on the utilization of lignin as filler in ultra-violet (UV) curable system. *J. Appl. Pol. Sci.,* **2011**, *120*, 2557 - 2533.

197. Morandim-Giannetti A. A.; Agnelli J. A. M.; Lancas B. Z.; Magnabosco R.; Casarin S. A.; Bettini S. H. P. Lignin as additive in polypropylene/coir composites: Thermal, mechanical and morphological properties. *Carbohydr. Polym.,* **2012**, *87*, 2563 - 2568.

198. Fernandes D. M.; Winkler Hechenleitner A. A.; Job A. E.; Radovanocic E.; Gomez Pineda E. A. Thermal and photochemical stability of poly(vinyl alcohol)/modified lignin blends. *Polym. Degrad. Stab.,* **2006**, *91*, 1192 - 1201.

199. Canetti M.; Bertini F.; De Chirico A.; Audisio G. Thermal degradation behaviour of isotactic polypropylene blended with lignin. *Polym. Degrad. Stab.,* **2006**, *91*, 494 - 498.

200. Bertini F.; Canetti M.; Cacciamani A.; Elegir G.; Orlandi M.; Zoia. L. Effect of ligno-derivatives on thermal properties and degradation behavior of poly(3-hydroxybutyrate)-based biocomposites. *Polym. Degrad. Stab.,* **2012**, 97, 1979 – 1987.

201. Gregorova A.; Cibulkova Z.; Košikova B.; Šimon P. Stabilization effect of lignin in polypropylene and recycled polypropylene. *Polym. Degrad. Stab.,* **2005**, *89*, 553 - 558.

202. Domenek S.; Louaifi A.; Guinaut A.; Baumberger S. Potential of lignins as antioxidant additive in active biodegradable materials. *J. Polym. Environ.*, **2013**, *21*, 692 - 701

203. Mitjans M.; Vinardell M.P. Biological activity and health benefits of lignans and lignins. *Trends in Comp. Biochem. Physiol*., **2005**, *11*, 55–62.

204. Mikulášová M.; Košiková B. Modulation of mutagenicity of various mutagens by lignin derivatives. *Mutat. Res.,* **2003**, *535*, 171 - 180.

205. Košikova B.; Slamenova D.; Mikulašova M.; Horvathova E.; Labaj J. Reduction of carcinogenesis by bio-based lignin derivatives. *Biomass Bioenergy,* **2002**, *23*, 153 - 159.

206. Suzuki H.; Tochikura T. S.; Iiyama K.; Yamazaki S.; Yamamoto N.; Toda S. Lignosulfonate, a water - solubilized lignin from the waste liquor of the pulping process, inhibits the infectivity and cytopathic effects of human immunodeficiency virus in vitro. *J. Agric. Biol. Chem.*, **1989**, *53*, 3369 - 3372.

207. Moridani M.Y.; Pourahmad J.; Bui H.; Siraki A.; O'Brien P.J. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *J. Free Radic. Biol. Med.,* **2003**, *34*, 243 - 253.

208. Sakagami H.; Kawazoe Y.; Komatsu N.; Simpson A.; Nonoyama M.; Konno K.; Yoshida T.; Kuroiwa Y.; Tanuma S. I. Antitumor, Antiviral and immunopotentiating activities of pine cone extracts: potential medicinal efficiacy of natural and synthetic lignin-related materials. *Anticancer res.,* **1991**, *11*, 881 - 888.

209. Satoh K.; Kihara T.; Ida Y.; Sakagami H.; Koyama N.; Premanthan M.; Arakaki R.; Nakashima H.; Komatsu N.; Fujimaki M.; Misawa Y.; Hata N. Radicalmodulation activity of pine cone extracts of Pinus elliottii var. Elliottii. *Anticancer Res*., **1999**, *19*, 357 - 364.

210. Lu F. J.; Chu L. H.; Gau R. J. Free radical-scavenging properties of lignin. *Nutr.Cancer,* **1998**, *30*, 31 - 38.

211. Arora D. S., Rakesh K. S., Priyanka C. Biodelignification of wheat straw and its effect on in vitro digestibility and antioxidant properties. *Int. Biodeterior. Biodegradation,* **2011**, *65*, 352 - 358.

212. Baurhoo B.; Ruiz-Feria C. A.; Zhao X. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals - A review. *Anim. Feed Sci. Technol.,* **2008**, *144*, 175 - 184.

213. Vinardell M. P.; Ugartondo V.; Mitjans M. Potential applications of antioxidant lignins from different sources. *Ind. Crops Prod.,* **2008**, *27*, 220 - 223.

214. Ugartondo V.; Mitjans M.; Vinardell M. P. Applicability of lignins from different sources as antioxidants based on the protective effects on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. *Ind. Crops Prod.,* **2009**, *30,* 184 - 187.

215. Frankel N. E. Lipid Oxidation; The Oily Press Ltd: Dundee, **1998**, pp 129 - 160.

216. Salehi A. M.; Pages G.; Furo I.; Henriksson G.; Johansson M. Oxidation of methyl linoleate in the presence of lignin. *Prog. Org. Coat.,* **2011**, *72*, 325 - 333.

217. Dizhbite T.; Telysheva G.; Jurkjane V.; Tirzite D. Radical scavenging activities of lignins. *Proc. of 7th Eiropean Workshop on Lignocelluloses and Pulp (EWLP)*, Turku, Finland, August 26 - 29, **2002**, 487 - 490.

218. Senba Y.; Nishishita T.; Saito K.; Yoshioka H.; Yoshioka H. Stopped-Flow and spectrophotometric study on radical scavenging by tea catechins and the model compounds. *Chem. Pharm. Bull*., **1999,** *47*, 1369 - 1374.

219. Kurisawa M.; Chung J. E.; Uyama H.; Kabayashi S. Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromol. Biosci*., **2003**, *3*, 758 - 764.

220. Košinova P.; Gažak R.; Duroux J. L.; Lazzaroni R.; Kren V.; Assfeld X.; Trouillas P. Dimerisation process of sylibin-type flavanolignans: insights from theory. *Chem. Phys. Chem.*, **2011**, *12*, 1135 - 1142.

221. Heim K.C. Natural Polyphenol and Flavonoid Polymers. In Antioxidant Polymers. Synthesis, Properties, and Applications; Cirillo, J., and Iemma, F., (Eds); Wiley: Salem (USA), **2012**, pp 23-55.

222. Hanasaki Y.; Ogawa S.; Fukui S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavanoids. *J. Free Radic. Biol. Med.*, **1994**, *16*, 845-850.

223. Thring R. W.; Griffin S. L. The heterogeneity of two Canadian kraft lignins. *Can. J. Chem.*, **1995**, *73*, 629 - 631.

224. Ropponen J.; Rasanen L.; Rovio S.; Ohra-Abo T.; Liitia T.; Mikkonen H.; de Pas H. D.; Tamminen T. Solvent extraction as a means of preparing homogeneous lignin fractions. *Holzforschung,* **2011**, *65*, 543 - 549.

225. Louli V.; Ragoussis N.; Magoulas K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Biorecour. Tehnol.,* **2004**, *92*, 201 - 208.

226. Kuijsten A.; Arts I. C.; Vree T. B.; Hollman P. C. Pharmacokinetics of enterolignans in healthy Men and women consuming a single dose of secoisolariciresinol diglucoside. *J. Nutr*., **2005**, *135*, 795 - 801.

227. Lapierre C.; Mila I.; Begum A. N.; Fukushima K.; Heinonen S. M.; Adlercreutz H.; Remesy C.; Scalbert A. New precusors of mammalian lignans in rats. *Proceeding of the 8th European workshop on lignocellulisics and pulp,* **2004**, Aug 22-25, 101 - 104.

228. Seyoum A.; Asres, K.; Fathy Kandeel, E. F. Structure – radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2058 - 2070.

229. Wang, S.; Melnyk J. P.; Tsao R.; Marcone M. F. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Res. Int.,* **2011**, *44*, 14 - 22.

230. Yang Y.; Kinoshita K.; Koyama K.; Takahashi K.; Kondo S.; Watanabe K. Structure-antiemetic-activity of some diarylheptanoids and their analogues. *Phytomedicine,* **2002**, *9*, 146 - 152.

231. Tao J.; Morikawa T.; Toguchida I.; Ando S.; Matsuda H.; Yoshikawa M. Inhibitors of Nitric Oxide Production from the Bark of Myrica rubra: Structures of New Biphenyl Type Diarylheptanoid Glycosides and Taraxerane Type Triterpene. *Bioorg. Med. Chem.,* **2002**, *10*, 4005 - 4012.

232. Gorinstein S.; Cvirkova M.; Machackova I.; Haruenkit R.; Park Y. S.; Jung S. T.; Yamamoto K.; Martinez A. L.; Katrich E.; Trakhtenberg S. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits. *J. Food Chem.*, **2002**, *84*, 503 - 510.

233. Moure A.; Cruz J. M.; Franco D.; Domõanguez J. M.; Sineiro J.; Domoanguez H.; Josea M.; Parajoa C. Review Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.,* **2001**, *72*, 145 - 171.

234. Balasundram N.; Sundram K.; Samman S. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chem.*, **2006**, *99*, 191 - 203.

235. Morikawa T. Search for bioactive constituents from several medicinal foods: hepatoprotective, antidiabetic, and antiallergic activities. *J. Nat Med.,* **2007**, *61*, 112 -126.

236. Ozsoy N.; Can A.; Yanardag R.; Akev N. Antioxidant activity of Smilax excelsa L. Leaf extracts. *J. Food Chem.,* **2008**, *110*, 571 - 583.

237. Telysheva G.; Dizhbite T.; Bikovens O.; Ponomarenko J.; Janceva S.; Krasilnikova J. Biorefinery for bark of deciduous trees. *Proceeding of 11th EWLP, Hamburg, Germany,* August 16 – 19, **2010**,.77-80.

238. Līga Roze. Zemmolekulāru savienojumu noteikšana un izdalīšana no Latvijā augošiem alkšņiem. Maģistra darbs. LU Ķīmijas fakultāte, Rīga, **2012.**

239. Suga T.; Iwata N.; Asakawa Y. Chemical Constituents of the Male Flower of Alnus pendula (*Betulaceae*). *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1972**, *45*, 2058 - 2060.

240. Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook, 2nd Edition, Charles M. Hansen, CRC Press, Boca Raton, FL, **2007**.

241. Dizhbite T.; Dobele G.; Rossinskaya G.; Belkova L.; Degtyarev E.; Telysheva G. ESR technique for assessment of the lignins structure condensity and its alteration under thermal and thermocatalitic treatment. In Advanced Methods for Lignocellulosics and Paper Products. *In: Proc. Post-Symp. Workshop, 11th Int. Symposium Wood and Pulping Chemistry, Grenoble*, **2001**, 69 - 72.

242. Kuzina S. I.; Demidov S. V.; Brezgunov A. J.; Poluektiv O. G.; Grinberg O. J.; Dubinski A. A.; Mikhailkov A. I.; Lebedeva. S. Study of free radical centres in lignin with 20 mm band ESR spectroscopy. *J. Polym. Sci.*, **1993**, *35*, 1993, 798 - 802.

243. *Bayer C.; Martin-Neto L.; Mielniczuk J.; Ceretta C. A.* Effect of no-till cropping systems on soil organic matter in a sandy clay loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance. *Soil Till. Res.*, **2000**, *53*, 95 - 104.

244. Hu T. Q. *Chemical Modification, Properties and Usage of Lignin*. Plenum Publishes: Canada, **2002**, 154 - 198.

245. Prior R. L.; Hoang H.; Gu L. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 3273 – 3279.

246. Ganske F.; Dell E. J. ORAC Assay on the FLUOstar OPTIMA to Determine Antioxidant Capacity. BMG LABTECH, Application note 148, **2006**.

247. Pei N.; Thring R. W. Syntheis of polyurethanes from solvolysis lignin using a polymerization catalyst: mechanical amd thermal properties, Int. *J. Polym. Mater*., **2003**, *52* 685 - 707.

248. Sato Y.; Hotta N.; Sakamoto N.; Matsuoka S.; Ohishi N.; Yagi K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem. Med*., **1979**, *21*, 104 - 107.

249. Szezeklik A.; Gryglewski R. J. Low density lipoproteins (LDL) are carriers for lipid peroxides and prostacyclin (PGI2) biosynthesis in arteries. *Artery*, **1980**, *7*, 488 - 495.

250. Dearden J.C.; Cronin M.T.D.; Kaiser K.L.E. How not to develop a quantitative structure–activity or structure–property relationship (QSAR/QSPR). *SAR and QSAR in Environmental Research*, **2009**, *20*, 241–266.

251. Levine R. L; Garland D.; Oliver C. N.; Amici A.; Climent I.; Lenz A. G.; Ahn B. V.; Shaltiel S.; Stadtman E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, **1990**, *186*, 464 - 78.

252. Kozlowski D.; Trouillas P.; Calliste C.; Marsal P.; Lazzaroni R.; Duroux J. L. Density Functional Theory Study of the Conformational, Electronic, and Antioxidant Properties of Natural Chalcones. *J. of Phys. Chem. A,* **2007**, *111*, 1138 - 1145.

253. Kozlowski D.; Marsal P.; Steel M.; Mokrini R.; Duroux J. L.; Lazzaroni R.; Trouillas P. Theoretical Investigation of the Formation of a New Series of Antioxidant Depsides from the Radiolysis of Flavonoid Compounds. *Radiation Res*., **2007**, *168*, 243 - 252.

254. Calliste C. A.; Kozlovski D.; Duorux J. L.; Champavier Y.; Chulia A. J.; Trouillas P. A new antioxidant from wild nutmeg. *Food Chem.* **2010**, *118*, 489 - 496.

255. Kumarasamy Y.; Cox P. J.; Jaspars M.; Nahar L.; Sarker S. D. Bioactivity of hirsutanol, oregonin and genkwanin, isolated from the seeds of Alnus glutinosa (*Betulaceae*). *Nat. Prod. Commun.*, **2006,** *1*, 641 - 644.

256. Ra J.C., Kim Y.H., Sohn D.H. Antioxidative and hepatoprotective compositions containing diarylheptanoids from Alnus japonica, US Patent, **2011**. US 2011/0144039 A1.

257. Lawoko M. Lignin Polysaccharide networks in Softwood and Chenical Pulps: Characterisation, Structure and Reactivity. Doctoral Dissertation. Royal Institute of Technology. Departament of Fibre and Polymer Technology. Division of Wood chenistry. Stocholm, **2005.**

258. Alves A.; Schwanninger M.; Pereira H.; Rodrigues J. Analytical pyrolysis as a direct method to determine the lignin content in wood. Part 1: Comparison of pyrolysis lignin with Klason lignin. *J. Anal. Appl. Pyrolysis,* **2006**, *76*, 209 - 213.

259. Ohra-aho T.; Gomes F. J. B.; Colodette J. L.; Tamminen T. S/G ratio and lignin structure among Eucalyptus hybrids determined by Py-GC/MS and nitrobenzene oxidation. *J. Anal. Appl. Pyrolysis,* **2013**, *101*, 166 - 171.

260. Shen D.K.; Gu S.; Luo K.H.; Wang S.R.; Fang M.X. The pyrolytic degradation of wood-derived lignin from pulping process. *Bioresour. Technol*., **2010**, *101*, 6136–6146.

261. Kawamoto H.; Ryoritani M.; Saka S. Different pyrolytic cleavage mechanisms of b-ether bond depending on the side-chain structure of lignin dimmers. *J. Anal. Appl. Pyrolysis,* **2008**, *81*, 88-94.

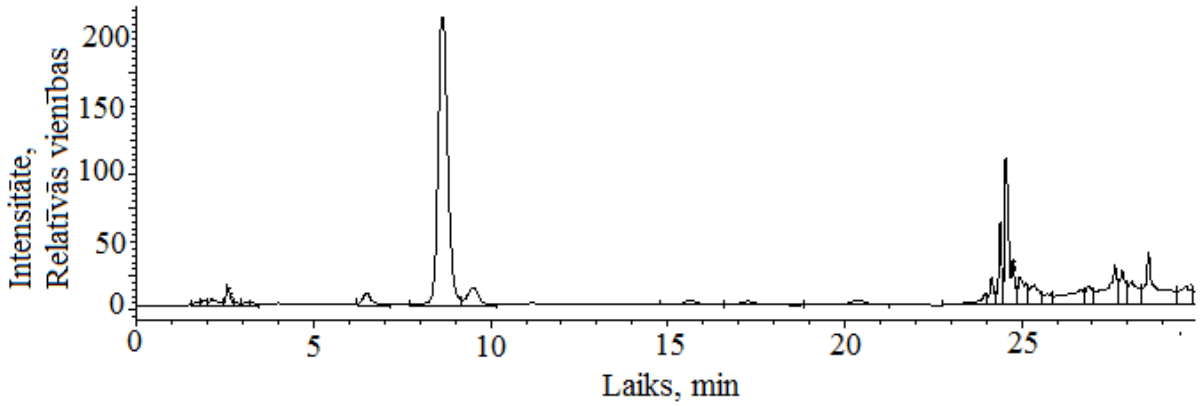
262. Huang, X.; Liu, C.; Huang, J.; Li, H. Theory studies on pyrolysis mechanism of phenethyl phenyl ether. *Comput. Theor. Chem.* **2011**, *976*, 51-59.

263. Nakamura T.; Kawamoto H.; Saka S. Pyrolysis behavior of Japanese cedar wood lignin studied with various model dimers. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2008**, *81*, 173–182.

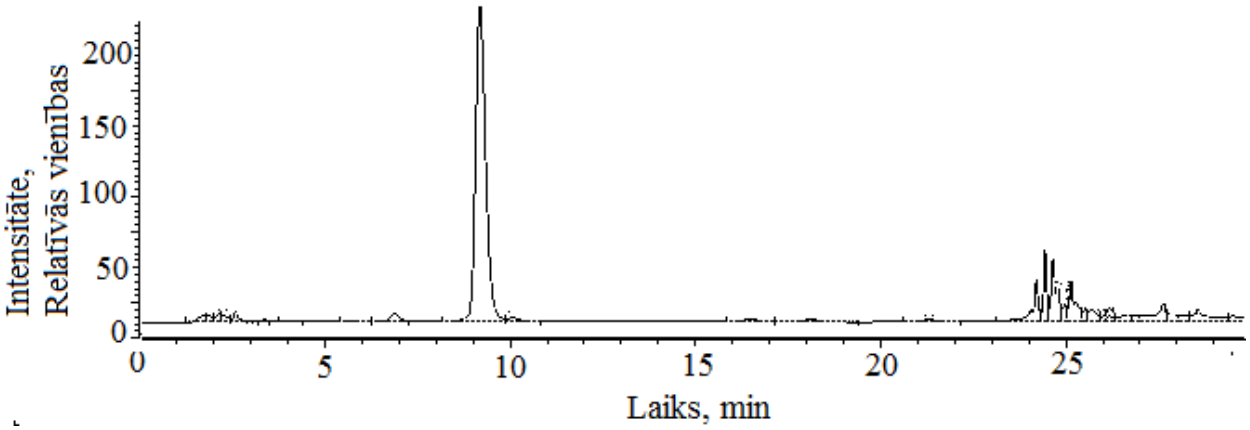
264. Beste A.; Buchanan A.C. Kinetic simulation of the thermal degradation of phenethyl phenyl ether,a model compound for the O-4 linkage in lignin. *Chem. Phys. Lett.*, **2012**, *550*, 19–24

PIELIKUMI

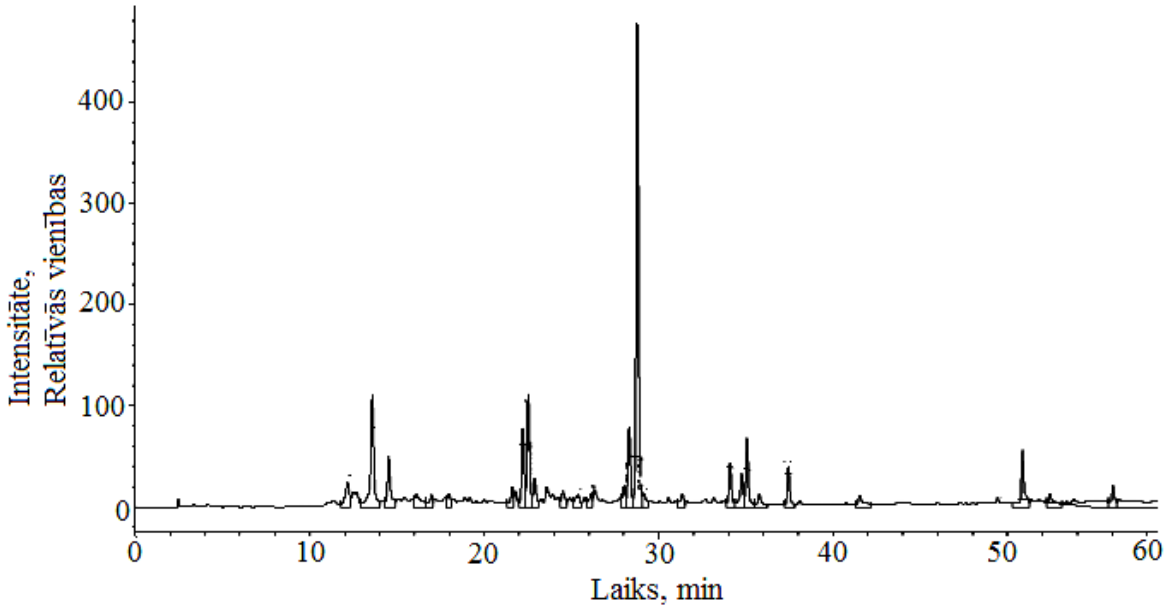
1. PIELIKUMS
Diarilheptanoīdu HPLC hromatogrammas



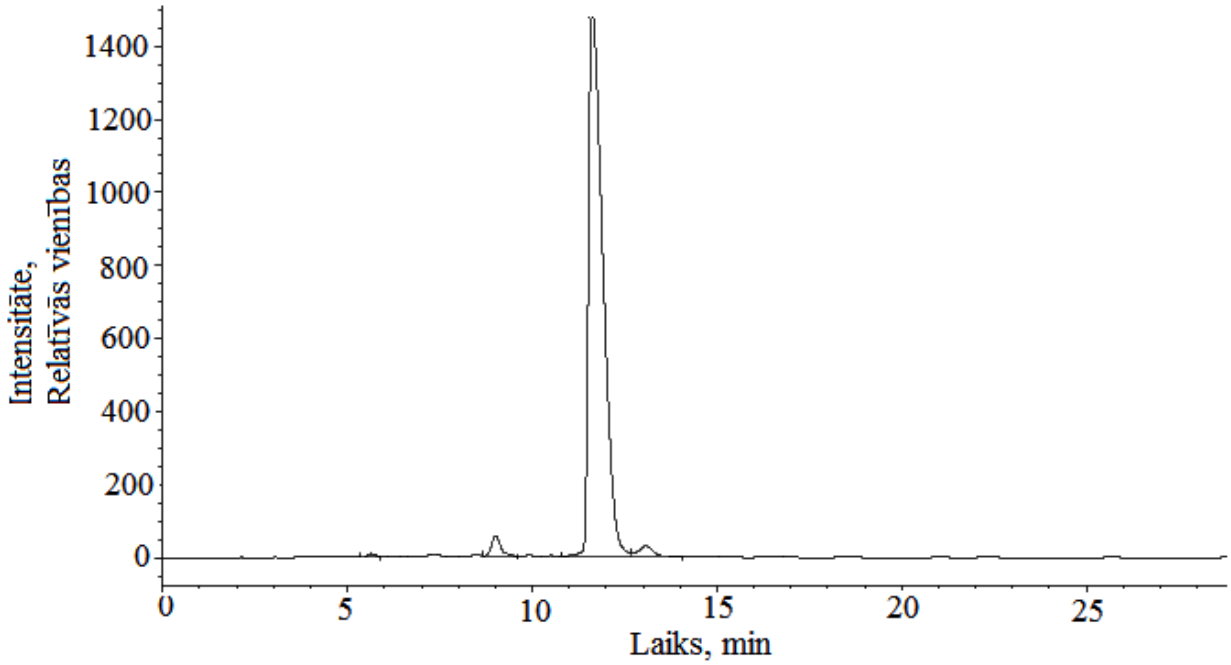
Baltalkšņa mizas etilacetāta ekstrakta *HPLC* hromatogramma. *Zorbax Eclipse XDB-C18* kolonna, daļiņu izmērs 5 µM, 4,6x150 mm (*Agilent*); Eluents A: 5% MeOH, 0,1%HCOOH, bidestilēts ūdens, Eluents B: MeOH, 0,1% HCOOH. Režīms **25% Eluents B un 30 min Detektēšana: λ= 280 nm, injekcijas tilpums:10 µL, kolonnas temp. = 30°C**



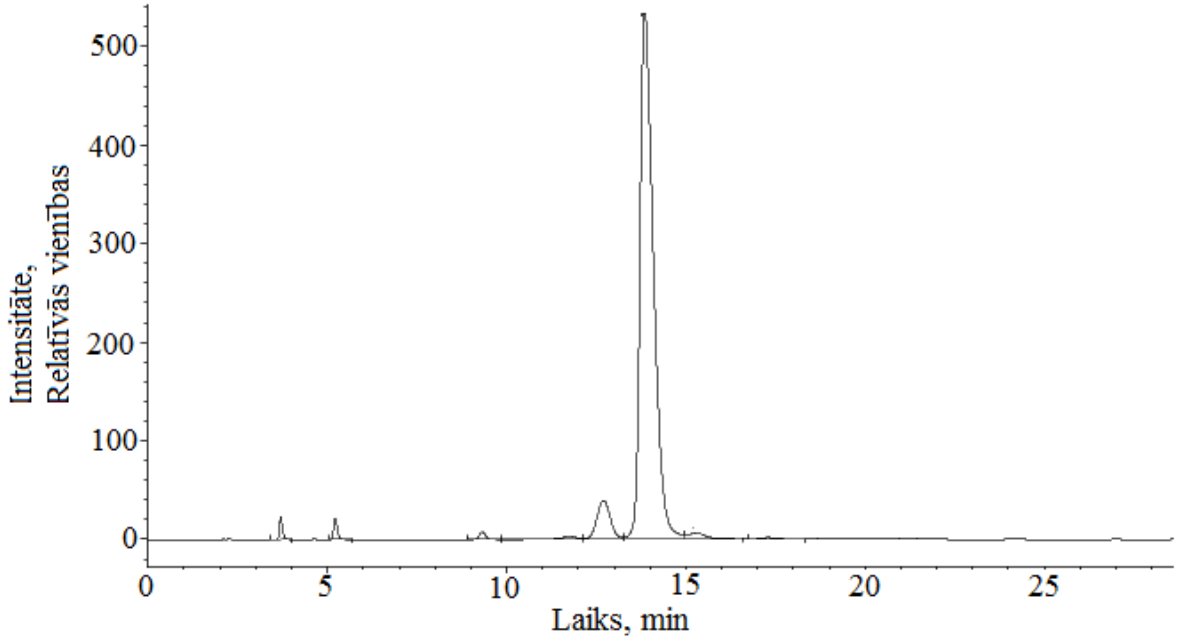
Melnalkšņa mizas etilacetāta ekstrakta *HPLC* hromatogramma. *Zorbax Eclipse XDB-C18* kolonna, daļiņu izmērs 5 µM, 4,6x150 mm (*Agilent)*;Eluents A: 5% MeOH, 0,1%HCOOH, bidestilēts ūdens, Eluents B: MeOH, 0,1% HCOOH. Režīms **25% Eluents B un 30 min Detektēšana: λ= 280 nm, injekcijas tilpums:10 µL, kolonnas temp. = 30°C**



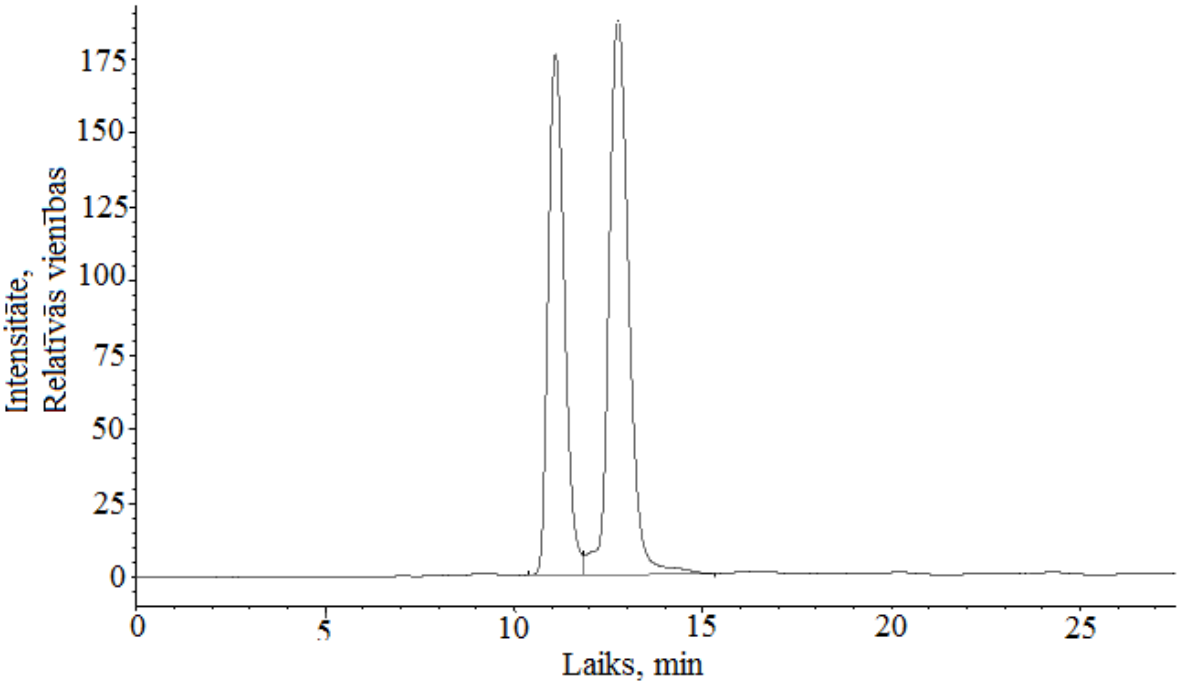
Bērza mizas etilacetāta ekstrakta *HPLC* hromatogramma. *Zorbax Eclipse XDB-C18* kolonna, daļiņu izmērs 5 µM, 4,6x150 mm (*Agilent*);Eluents A: 5% MeOH, 0,1%HCOOH, bidestilēts ūdens, Eluents B: MeOH, 0,1% HCOOH. Detektēšana: λ= 280 nm, injekcijas tilpums:10 µL, kolonnas temp. = 30°C



Attīrīta oregonīna *HPLC* hromatogramma. *Zorbax Eclipse XDB-C18* kolonna, daļiņu izmērs 5 µM, 4,6x150 mm (*Agilent)*;Eluents A: 5% MeOH, 0,1%HCOOH, bidestilēts ūdens, Eluents B: MeOH, 0,1% HCOOH. Detektēšana: λ= 280 nm, injekcijas tilpums:10 µL, kolonnas temp. = 30°C



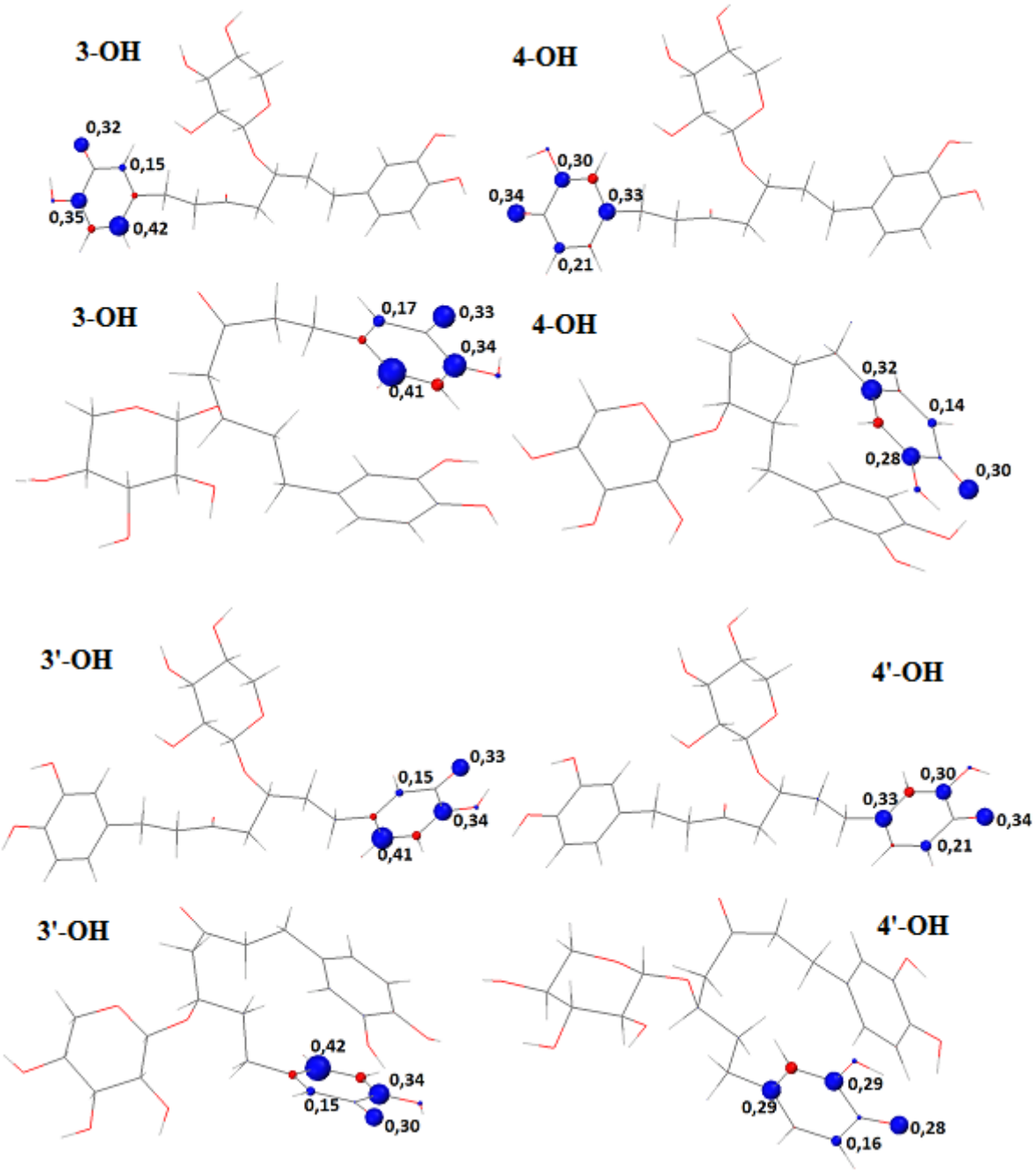
Attīrīta platifilozīda *HPLC* hromatogramma. *Zorbax Eclipse XDB-C18* kolonna, daļiņu izmērs 5 µM, 4,6x150 mm (Agilent);Eluents A: 5% MeOH, 0,1%HCOOH, bidestilēts ūdens, Eluents B: MeOH, 0,1% HCOOH. Detektēšana: λ= 280 nm, injekcijas tilpums:10 µL, kolonnas temp. = 30°C



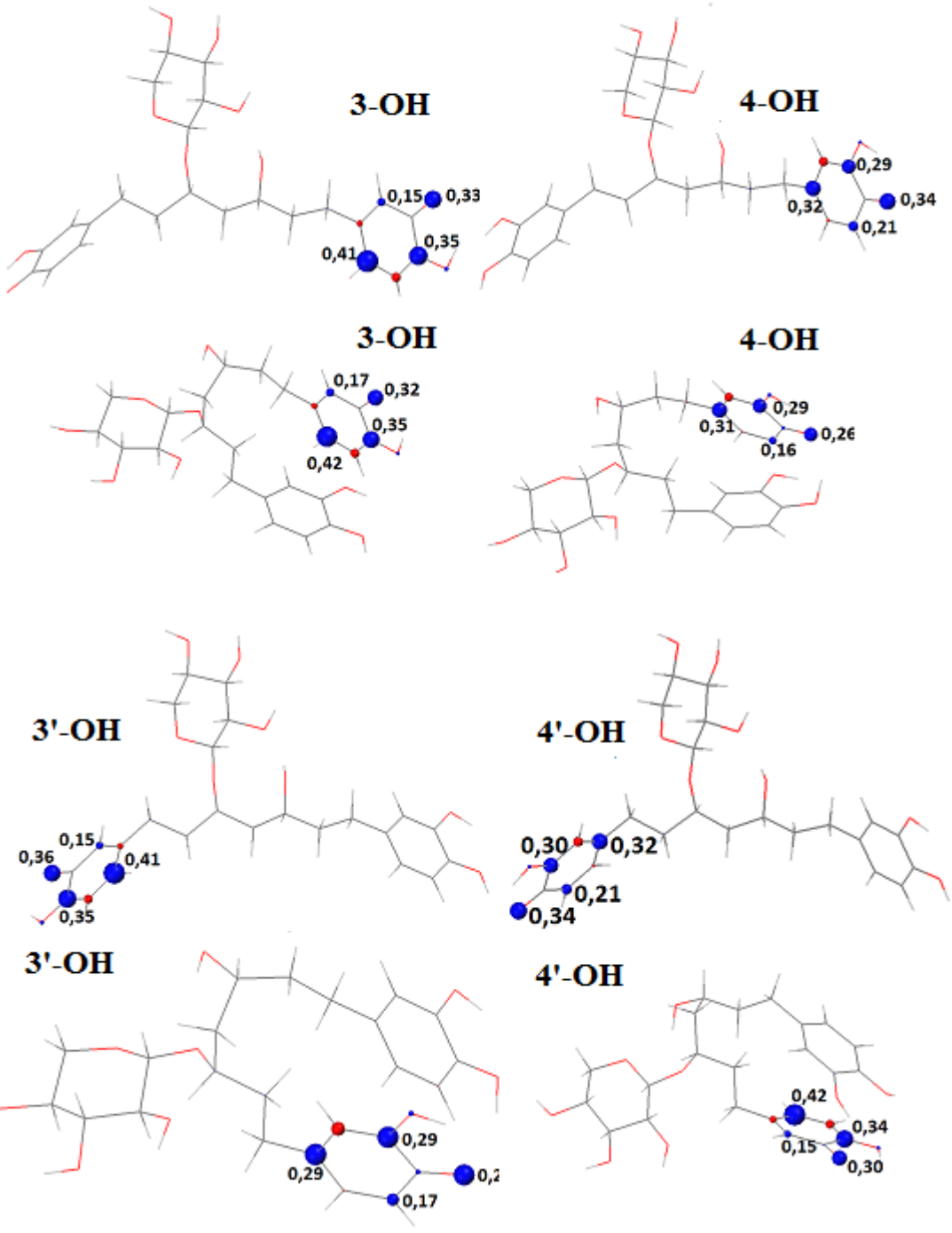
Hidroksioregonīna epimēru maisījuma hromatogramma, ar dominējošo epimēru no alkšņu mizām. *HPLC* hromatogramma. *Zorbax Eclipse XDB-C18* kolonna, daļiņu izmērs 5 µM, 4,6x150 mm (*Agilent*); Eluents A: 5% MeOH, 0,1%HCOOH, bidestilēts ūdens, Eluents B: MeOH, 0,1% HCOOH. Detektēšana: λ= 280 nm, injekcijas tilpums:10 µL, kolonnas temp. = 30°C

2. PIELIKUMS
Spina blīvuma sadalījums diarilheptanoīdu fenoksilradikāļos

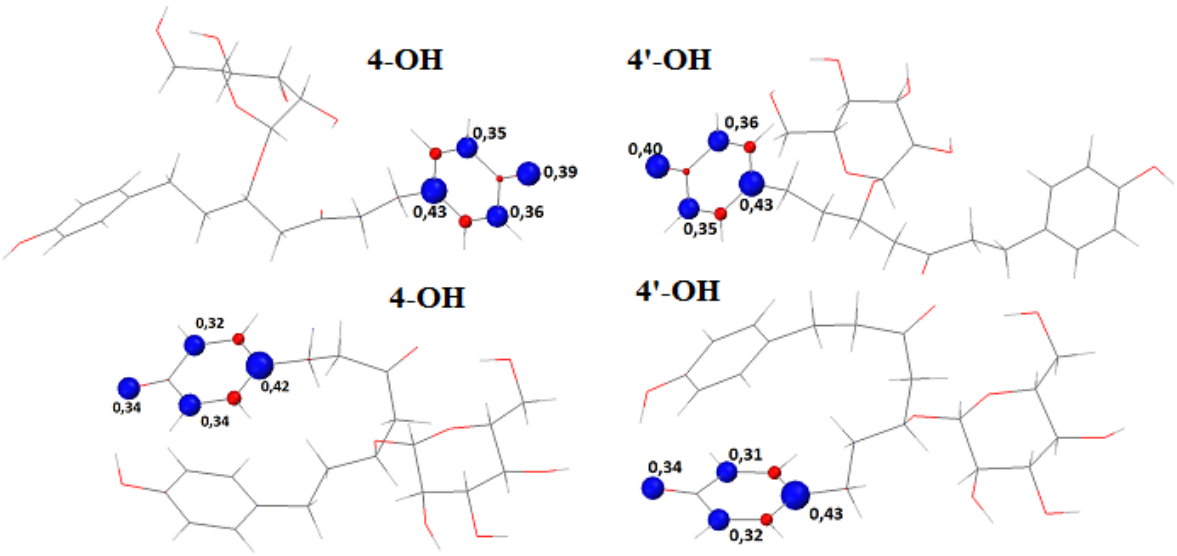
Oregonīna fenoksilradikāļi



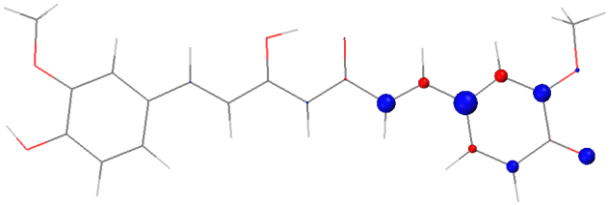
Hidroksioregonīna fenoksilradikāļi



Platifilozīda fenoksilradikāļi



Kurkumīna fenoksilradikāls



3. PIELIKUMS

No lauksaimniecības augiem iegūto sārma lignīnu (SL) analītiskās pirolīzes (*Py-GC-MS-FID*) gaistošie produkti un to relatīvais saturs, %.

Pirolīzes produktus var sadalīt ogļhidrātu degradācijas produktos **(O)**, lignīna degradācijas produktos **(L)** un ekstraktvielu degradācijas produktos **(E)**.

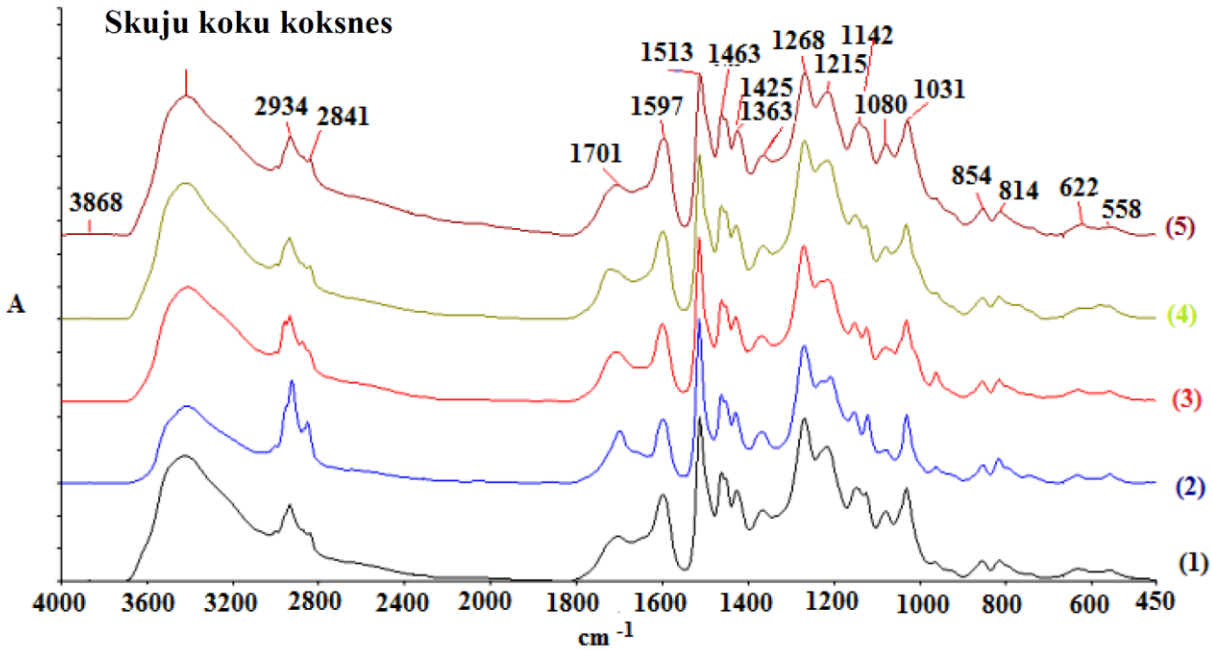
Savienojums	Izcelsme	MM	Izdalīšanas laiks, min	Savienojuma relatīvais saturs, % (FID)		
				Linu SL	Kaņepju SL	Sizala SL
Oglekļa dioksīds	O, L	44	4,859	13,37	20,37	18,79
Ūdens	O, L	18	5,143	10,69	12,29	14,96
Metanols	O, L	32	5,327	1,01	n.d.	n.d.
4-Metil-1-pentēns	E	84	5,926	1,09	1,35	1,48
2-Metilpropanāls	O	72	6,321	0,12	0,12	0,04
2-Metilfurāns	O	82	6,474	0,10	0,11	0,18
2,3-Butāndions	O	86	7,043	0,06	0,00	0,20
2-Metil-1-butanols	O	88	7,285	0,19	0,25	0,21
3-Metilbutanāls	O	86	8,084	0,23	0,25	0,25
2-Metilbutanāls,	O	86	8,226	0,29	0,34	0,26
Etiķskābe	O, L	60	9,075	0,37	0,36	0,63
1-Oktēns	E	112	9,784	0,32	0,32	n.d.
1-Hidroksi - 2-propanons	O	74	10,393	0,09	0,05	0,10
Toluols (metilbenzols)	L	92	10,619	0,43	0,66	0,46
Propionskābe	O	74	12,745	0,12	0,16	0,18
Heksanāls (n-Kapronaldehīds)	O	100	13,190	0,09	0,03	n.d.
1-Nonēns(n-Non-1-ēns)	E	126	13,707	0,37	0,40	0,18
1,3-dimetil - benzēns	L	106	14,509	0,05	0,04	0,12
Pirols	E	67	14,691	0,14	0,06	n.d.
1,4-dimetil - benzēns	L	106	14,895	0,11	0,13	n.d.
(S)-5-Hidroksimetil-2(5H)-furanons	O	114	15,937	n.d.	n.d.	0,10
Stirols (etenilbenzēns)	L	104	16,743	0,17	0,26	0,79
Furfurols	O	96	17,576	0,19	0,16	1,14
1-Decēns (n-1-decēns)	E	140	18,553	0,37	0,43	0,18
2-Metilfurfurols	O	98	19,650	n.d.	n.d.	0,13
1-Acetiloksi - 2-propanons	O	116	20,092	n.d.	n.d.	0,08
2-Metil - 2-ciklopentēn-1-ons	O	96	20,459	0,11	0,10	n.d.
2,3-Dimetil- 2-ciklopentēn-1-ons	O	110	21,375	0,05	0,09	n.d.
D-Limonēns (1-metil-4-(1-metiletenil)– cikloheksēns)	E	136	21,593	0,05	0,07	n.d.
1,2-Ciklopentāndions	O	98	23,280	0,13	0,03	0,28
1-Undecēns	E	154	23,709	0,26	0,27	0,09
1-metoksi-3-metilbenzēns	L	122	24,338	0,22	0,20	0,11
5-metil- 2-furānkarboksialdehīds	O	110	24,715	n.d.	n.d.	0,11
3-Hidroksi-5,6-dihidro-(4H)-pirān- 4-ons	O	114	27,338	n.d.	n.d.	0,54
2-hidroksibenzilaldehīds	L	122	27,941	0,07	0,08	0,06
2,3,3-trimetiloktāns	E	156	28,662	0,39	0,21	n.d.
3-Tetradekēns	E	196	28,790	0,26	0,27	0,12
6-Metiltridekāns	E	198	29,199	n.d.	0,14	n.d.
Fenols	L	94	30,173	1,61	1,50	0,72

Savienojums	Izcelsme	MM	Izdalīšanas laiks, min	Savienojuma relatīvais saturs, % (FID)		
				Linu SL	Kaņepju SL	Sizala SL
p-Gvajakols	L	124	31,255	12,43	6,48	3,61
2-Metilfenols	L	108	32,435	0,91	0,78	0,49
2,3-Dimetilfenols	L	122	33,175	0,10	0,09	0,08
Tridekāns	E	184	33,479	0,21	0,10	n.d.
(Z)-3-Tetradekēns	E	196	33,652	0,27	0,27	0,11
4-Metilfenols	L	108	34,208	0,61	1,27	0,47
3-Metilfenols	L	108	34,335	0,51	0,50	0,21
2-Metoksi-3-metilfenols	L	138	34,448	0,99	0,72	0,80
5-Metilgvajakols	L	138	35,468	0,14	0,08	0,03
4-Metilgvajakols	L	138	36,141	5,20	8,04	3,51
3,4-Dimetilfenols	L	122	36,443	0,93	1,18	0,42
1,2-Dimetoksi-3-metilbenzēns	L	152	36,896	0,39	0,23	0,09
2,3,6-Trimetilfenols	L	136	37,412	0,09	0,11	0,11
1,4-Dimetoksi-2-metilbenzēns	L	152	38,046	0,45	0,15	0,16
1,3-Dimetoksi-2-metilbenzēns	L	152	38,148			0,15
3-Tetradecēns	E	196	38,192	0,28	0,19	0,17
2,5-Dimetilfenols	L	122	38,221	0,26	0,52	
3-Etil- un 4-Etil-fenols	L	122	38,352	0,56	1,11	0,31
3,5-Dihidroksiacetofenons	L	152	38,983	0,39	0,53	0,56
2,4,6-Trimetilfenols	L	136	39,657	0,04	0,06	
4-Etilgvajakols	L	152	39,987	3,06	3,68	1,59
2-Etil-4-metilfenols	L	136	40,298	0,14	0,27	0,15
1,4-Dimetoksi-2,3-dimetilbenzēns	L	166	42,082	n.d.	n.d.	0,07
2-Hidroksi-5-metoksi-acetofenons	L	166	42,110	0,14	0,07	n.d.
2,3-Dihidrobenzofurāns	O	120	42,301	0,65	0,62	0,38
1-Tetradekāns	E	198	42,361	0,10	0,20	n.d.
1-Tetradekēns	E	196	42,539	0,17	0,13	n.d.
4-Vinilgvajakols	L	150	42,673	4,60	4,18	2,48
m-Gvajakols (3-metoksifenols)	L	124	42,943	0,04	0,08	0,07
Eigenols	L	164	43,617	0,59	0,56	0,18
4-Propilgvajakols	L	166	43,697	0,81	0,73	0,31
4-Allilfenols	L	134	44,241	n.d.	0,08	n.d.
Siringols	L	154	45,060	4,20	2,49	11,07
2-Metoksi-5-(2-propenil)-fenols	L	164	45,433	0,24	0,13	0,28
4-Etenil-1,2-dimetoksibenzēns	L	164	45,607	0,35	0,24	0,15
Cis-izoeigenols	L	164	46,029	0,81	0,67	0,32
Pentadekāns	E	212	46,415	0,03	0,18	n.d.
Heksadekāns	E	226	46,438	0,19	n.d.	n.d.
3-Metoksi-5-metilfenols	L	138	46,523	n.d.	0,35	0,44
(E)-9-Eikosēns	E	280	46,631	0,29	0,27	n.d.
1,2-Dimetoksi-4-metilbenzēns	L	152	47,017	n.d.	n.d.	0,11
2-allilfenols	L	134	47,262	0,07	0,06	n.d.
Trans-izoeigenols	L	164	48,363	3,25	2,63	0,99
4-Metilsiringols	L	168	48,814	1,15	2,39	9,33
Vanilīns	L	152	49,380	0,14	0,12	0,27
5-Metoksi-2,3-dimetilfenols	L	152	49,878	n.d.	0,17	0,18
Heptadekāns	E	240	50,305	0,25	0,25	n.d.
(E)-9-Eikosēns	E	280	50,501	0,18	0,19	n.d.
4-Etilsiringols	L	182	51,767	1,25	1,25	3,47
(E)- 7-metil-7-heptadekēns	E	252	51,788	0,00	0,67	n.d.
Acetogvajakols	L	166	52,725	0,83	0,77	0,41
Heptadekāns	E	240	53,986	0,19	n.d.	n.d.
4-Vinilsiringols	L	180	54,105	0,78	1,12	3,09
(E)-3-Oktadekēns	E	252	54,179	0,26	0,32	n.d.
Gvajacilacetons	L	180	54,697	0,34	0,29	0,19

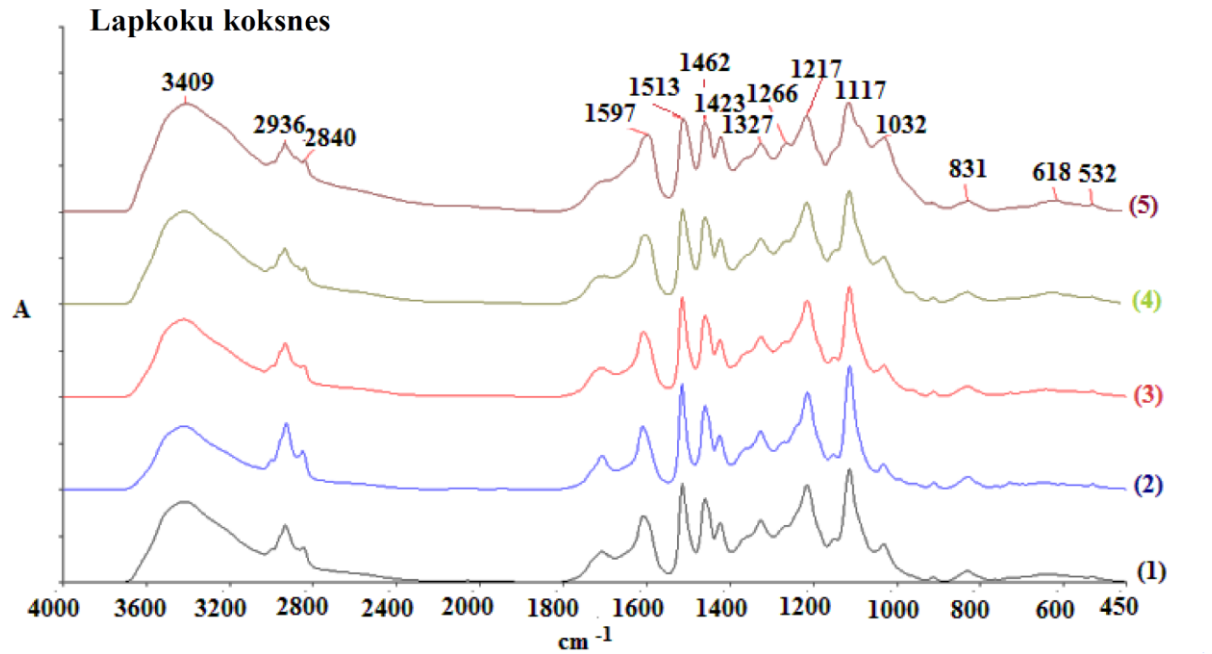
Savienojums	Izcelsme	MM	Izdalīšanas laiks, min	Savienojuma relatīvais saturs, % (FID)		
				Linu SL	Kaņepju SL	Sizala SL
4-Allilsiringols	L	194	54,748	0,42	0,53	1,35
Propiovanillons	L	180	55,832	0,11	0,20	0,07
4-Propenil-(cis)siringols	L	194	56,697	0,22	0,29	0,77
Heptadekāns	E	240	57,456	0,21	0,28	0,18
10-Heneikosēns	E	294	57,676	0,24	0,32	0,12
3,7,11,15-Tetrametil-2-heksadekēn-1-ols	E	296	57,871	0,10	0,16	n.d.
1,6-Anhidro-β-D-glukopiranoze (levoglikozāns)	O	162	58,674	n.d.	n.d.	0,36
4-propenil-(trans)siringols	L	194	58,997	0,79	0,78	2,56
6,10,14-trimetil-2-Pentadekanons	E	268	59,446	0,38	0,25	
Siringilaldehīds	L	182	60,266	n.d.	n.d.	0,30
8-heksilpentadekāns	E	296	60,791	0,23	0,32	n.d.
1-Nonadekēns	E	266	61,009	0,22	0,37	n.d.
Heksadekānskābes metilesteris	E	270	61,086	0,31	n.d.	n.d.
Acetosiringons	L	196	62,691	0,24	0,23	0,76
Cis-9-heksadekenāls	E	238	63,518	0,16	n.d.	n.d.
10-Heneikosēns	E	294	63,968	0,17	0,18	n.d.
Siringilacetons	L	210	64,156	n.d.	n.d.	0,36
1-Nonadekēns	E	266	64,190	0,28	0,22	n.d.
Propiosiringons	L	210	65,142	n.d.	0,04	0,12
Tetratriakontāns	E	478	67,126	0,46	0,28	0,12
1-Trikosēns	E	322	67,343	0,26	0,30	0,18
Oktadekānskābes metilesteris	E	298	67,475	0,13	n.d.	n.d.
9-Metoksiantracēns	E	208	67,986	2,07	0,35	0,36
Visi-trans-skvalēni	E	410	68,555	0,10	0,39	0,30
9,10-Antracēndions	E	208	69,333	5,13	1,81	0,79
Heneikosāns	E	296	69,961	0,19	0,20	0,14
1-Trikosēns	E	322	70,192	0,30	0,25	0,09
Heksatriakontāns	E	506	70,800	n.d.	n.d.	0,15
Tetrakosāns	E	338	72,785	0,16	0,15	n.d.
1-Trikosēns	E	322	73,014	0,13	0,14	n.d.
1-Trikosēni	E	322	75,536	0,22	0,18	0,19
Tetrakosāns	E	338	75,781	0,10	0,10	n.d.
1-Trikosēns	E	322	78,538	0,17	0,15	n.d.
Tetrakosāns	E	338	78,856	0,18	0,23	n.d.
Heneikosāns	E	296	82,011	0,33	0,32	n.d.
1-Trikosēns	E	322	82,255	n.d.	0,12	n.d.
Neidentificēti (no hromatogrammām)				2,69	2,02	1,18

MM – molekulmasa, $g \cdot mol^{-1}$
n.d. – nav detektēts

Skuju koku koksnes un lapkoku koksnes *LignoBoost kraft* lignīnu un to frakciju FTIR spektri



Izejas paraugs (1) CH_2Cl_2 frakcija (2) C_3H_7OH frakcija (3) CH_3OH frakcija (4) Pēc ekstrakcijas (5)



Izejas paraugs (1) CH_2Cl_2 frakcija (2) C_3H_7OH frakcija (3) CH_3OH frakcija (4) Pēc ekstrakcijas (5)

5. PIELIKUMS

Kvantitaīvo struktūras-aktivitātes sakarību noteikšanai (*QSAR*) izmantojamo lignīnu struktūras deskriptoru apzīmējumi un to atšifrējumi

Produktu ar noteiktām struktūras īpašībām relatīvais saturs lignīna izcelsmes pirolīzes produktos, %					
X_1	**X_2**	**X_3**	**X_4**	**X_5**	**X_6**
(G+S) fenoli	CH_2 sānķēdes α– stāvoklī	Skābekli saturošas grupas sānķēdēs	Ogļhidrāti	$(ArC_1+ArC_2)/ArC_3$	Dubultsaites sānķēdes α– stāvoklī,
Struktūras īpašības				Antioksidatīva aktivitāte, RDI	
X_7		**X_8**	**X_9**	**Y_1**	**Y_2**
□-konjugēto sistēmu izmērs, atomu skaits		mol(OCH_3) /mol(FPV)	M_w, g•mol^{-1}	mol ($DFPH^{\bullet}$)/ mol (OH_{fenola})	mol($ABTS^{\bullet+}$)/ mol(OH_{fenola})

Lignīnu struktūras deskriptoru un antioksidatīvas aktivitātes vērtības

Nr.	Paraugs	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	Y_1	Y_2
1.	Oša SL	96,89	36,18	21,70	7,89	8,96	15,62	13	1,1	4505	1,1	1,2
2.	Oša SL F-CH_2Cl_2	98,49	27,87	43,92	0,14	15,99	10,40	8	0,9	818	1,0	1,9
3.	Oša SL F-C_3H_7OH	97,28	44,87	10,15	0,50	11,20	17,29	14	1,8	1857	1,8	2,0
4.	Oša SL F-CH_3OH	96,93	39,44	11,69	0,94	7,46	18,10	12	1,7	3726	1,7	1,8
5.	Oša SL F-X	96,34	41,89	12,49	44,56	5,33	17,37	10	0,8	18454	1,7	1,1
6.	Melnalkšņa SL	96,05	31,26	22,09	28,86	6,17	18,28	19	0,7	7617	0,9	1,0
7.	Melnalkšņa SL F-CH_2Cl_2	98,22	17,48	45,33	0,57	13,50	11,51	3	1,5	638	1,2	2,1
8.	Melnalkšņa SL F-C_3H_7OH	95,84	31,90	16,59	5,71	9,60	17,89	3	1,3	1997	1,8	2,2
9.	Melnalkšņa SL F-CH_3OH	95,35	31,78	12,04	3,28	4,77	22,56	4	1,3	4360	1,3	1,9
10.	Melnalkšņa SL F-X	97,00	37,25	25,31	93,80	60,00	6,50	16	1,0	38739	1,3	2,8
11.	Abakas SL	84,25	13,60	8,08	16,44	2,56	18,40	11	1,0	3127	0,6	1,4
12.	Abakas SL F-CH_2Cl_2	87,96	19,54	16,04	13,04	2,10	19,34	4	1,1	717	1,0	1,7
13.	Abakas SL F-C_3H_7OH	77,44	27,34	2,95	27,83	1,58	21,95	4	1,2	2149	0,9	1,7
14.	Abakas F-CH_3OH	89,35	30,02	4,76	14,05	1,32	27,39	6	1,3	4396	1,8	1,5
15.	Abakas SL F-X	91,07	22,83	3,70	25,93	0,84	37,74	17	0,8	18109	0,8	0,8
16.	Džutas SL	86,02	18,22	8,97	7,08	3,39	17,80	12	0,6	3457	0,5	1,4
17.	Cukurniedru SL	77,32	17,63	10,03	29,78	4,14	25,09	10	0,8	4120	0,2	1,0
18.	Kaņepju SL	76,63	28,99	4,75	4,09	4,34	14,05	15	1,0	3897	0,4	1,8
19.	Linu SL	87,80	19,76	4,41	3,90	3,17	13,30	23	0,5	8358	0,9	1,7
20.	Linu SL F-CH_2Cl_2	93,97	21,70	22,67	3,66	4,20	22,93	9	0,4	847	0,9	1,3
21.	Linu SL F-C_3H_7OH	86,02	27,31	3,03	7,89	4,36	22,36	7	0,7	2452	1,5	1,7
22.	Linu F-CH_3OH	85,42	18,52	2,35	4,18	3,70	15,06	6	0,7	4085	1,2	1,5
23.	Linu SL F-X	87,53	20,45	4,16	5,33	3,32	20,65	9	0,6	18131	1,1	1,4

Nr.	Paraugs	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	Y_1	Y_2
24.	Sizala SL	86,32	16,48	5,91	7,96	3,75	18,68	17	0,9	3143	0,6	1,8
25.	Kviešu salmu SL	78,77	20,88	4,10	8,64	4,60	28,40	25	0,6	4400	0,2	1,2
26.	Etanola ražošanas no kviešu salmiem blakusprodukta *IFP* sārma frakcija	93,81	16,26	5,72	9,27	5,69	31,58	4	0,6	5720	0,9	1,7
27.	Skuju koku*Curan kraft* lignīns	86,54	10,65	9,87	5,16	7,30	7,75	10	0,7	13825	0,7	1,3
28.	Skuju koku*Curan kraft* F-CH_2Cl_2	94,87	8,23	53,82	0,13	3,60	6,72	10	0,5	2505	0,3	1,1
29.	Skuju koku*Curan kraft* F-C_3H_7OH	91,06	8,41	21,15	7,63	4,62	9,44	12	0,4	903	0,6	1,3
30.	Skuju koku *Curan kraft* F-CH_3OH	89,74	8,00	12,74	6,19	6,22	6,62	12	0,8	2927	0,5	1,2
31.	Skuju koku *Curan kraft* F-X	86,08	12,08	7,91	3,05	6,20	11,30	11	0,8	19433	0,7	1,3
32.	Skuju koku *LignoBoost kraft*	88,19	36,93	13,70	1,76	3,19	12,34	14	0,9	12138	1,3	2,0
33.	Skuju koku *LignoBoost kraft* F-CH_2Cl_2	93,74	28,54	22,40	2,16	2,75	12,19	8	0,8	698	0,7	1,2
34.	Skuju koku *LignoBoost kraft* F-C_3H_7OH	87,99	41,87	9,60	2,43	4,59	13,96	18	1,1	2087	1,7	2,1
35.	Skuju koku *LignoBoost kraft* F-CH_3OH	87,82	38,09	10,40	1,63	4,52	14,53	16	0,9	4465	1,5	1,8
36.	Skuju koku *LignoBoost kraft* F-X	87,80	37,34	11,90	1,82	3,44	13,44	12	0,9	18636	1,0	1,6
37.	Lapkoku *LignoBoost kraft*	95,86	37,31	8,25	2,46	3,13	20,84	13	1,2	4786	1,4	1,5
38.	Lapkoku *LignoBoost kraft* F-CH_2Cl_2	96,86	33,61	14,22	0,68	4,55	16,68	10	1,2	799	1,0	1,5
39.	Lapkoku *LignoBoost kraft* F-C_3H_7OH	95,65	38,25	7,32	0,72	3,62	19,50	16	1,3	1996	1,9	1,9
40.	Lapkoku *LignoBoost kraft* F-CH_3OH	94,91	38,03	7,99	2,16	4,29	19,70	14	1,3	4488	1,9	1,8
41.	Lapkoku *LignoBoost kraft* F-X	94,80	34,04	8,76	8,45	2,29	27,49	13	1,1	18396	1,6	1,5
42.	Biolignīns™ F-CH_2Cl_2	90,92	10,65	20,67	14,74	4,02	33,40	29	0,6	1973	0,5	0,8
43.	Bioliiignīns™ F-CH_3OH	85,87	13,62	5,47	31,82	5,08	39,83	25	0,7	2201	0,6	1,1
44.	Biolignīns™ F-CH_2Cl_2/CH_3OH	83,84	16,59	6,83	26,96	3,90	28,55	25	0,7	5295	0,7	1,1
45.	Alkšņa PyL	90,09	22,76	8,32	18,10	1,26	16,77	27	0,7	n.n.	0,7	0,7
46.	Oša PyL	89,54	24,76	9,04	15,52	1,25	17,33	21	0,8	n.n.	0,7	0,7
47.	Apses PyL	88,20	26,68	7,75	23,82	1,83	20,37	29	0,6	n.n.	0,8	0,8
48.	Lapkoku PyL	90,32	21,29	13,45	16,51	1,12	16,71	26	0,7	n.n.	0,8	0,8
49.	Skuju koku PyL	87,60	28,68	6,78	20,98	1,84	15,72	26	0,6	n.n.	0,6	0,6
50.	Skuju koku MWL	85,47	32,50	22,19	20,00	3,87	10,96	12	1,0	5720	0,3	0,5

6. PIELIKUMS

Publikācijas

Periodikā ar aprēķinātu citējamības indeksu:

i. **Dobele G., Dizhbite T., Urbanovich I., Andersone A., Ponomarenko J., Telysheva G.** Pyrolytic oil on the basis of wood and the antioxidant properties of its water-soluble and – insoluble fraction. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2009**, *85*, pp. 81-85;

ii. **Telysheva G., Dizhbite T., Bikovens O., Ponomarenko J., Janceva S., Krasilnikova J.** Structure and antioxidant activity of diarylheptanoids extracted from bark of grey alder (*Alnus incana*) and potential of biorefinery-based bark processing of European trees. *Holzforschung*, **2011**, *65*, 4, pp. 623 – 629;

iii. **Dobele G., Dizhbite T., Ponomarenko J., Urbanovich I., Kreicberga J., Kampars** *V.* Isolation and characterization of the phenolic fractions of wood pyrolytic oil. *Holzforschung*, **2011**, *65*, 4, pp. 503-510;

iv. **Dizhbite T., Ponomarenko J., Andersone A., Dobele G., Lauberts M., Krasilnikova J., Mironova-Ulmane N., Telysheva G.** Role of paramagnetic polyconjugated clusters in lignin antioxidant activity (*in vitro*). *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, **2012**, *38*.

v. **Arshanitsa A., Ponomarenko J., Dizhbite T., Andersone A., Gosselink R. J.A., J. van der Putten, Telysheva G.** Fractionation of technical lignins as a tool for improvement of their antioxidant properties. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2013**, 103, pp. 78 – 85.

vi. **Ponomarenko J., Dizhbite T., Lauberts M., Viksna A., Dobele G., Bikovens O., Telysheva G.** Characterization of softwood and hardwood LignoBoost Kraft lignins with emphasis on their antioxidant activity. Pieņemts publicēšanai žurnālā *Bioresources*.

vii. **Ponomarenko J., Trouillas P., Martin N., Dizhbite T., Krasilnikova J., Telysheva G.** Elucidation of antioxidant properties of wood bark derived saturated diarylheptanoids: A comprehensive (DFT supported) understanding. Iesniegts publicēšanai žurnālā *Phytochemistry.*

Cita veida periodikā:

viii. **Ponomarenko J., Dizhbite T., Telysheva G., Viksna A., Dobele G., Bikova T.** Characterization of antioxidant properties of lignins from agricultural plants in relation to their structure and functionality. *Latvian Journal of Chemistry***, 2010**, 2, pp. 158-174.

ix. **Ponomarenko J., Dizhbite T., Viksna A., Lauberts M., Telysheva G.** Characterization of antioxidant activity of lignins and their modification products. *Proceedings of 11th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*, Hamburg, Germany, August 16-19, **2010**, pp. 569-572.

x. **Ponomarenko J., Dizhbite T., Lauberts M., Volperts A., Lebedeva G., Jurkjane V., Telysheva G.** Fractionation of technical lignins for improvement of their antioxidant properties. *Proceedings of 12th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*, Espoo, Finland, **2012**, pp. 24-27.

xi. **Bikovens O., Ponomarenko J., Janceva S., Dizhbite T., Telysheva G.** Comparative study of antioxidant activity of *Alnus incana* bark polyphenols. XXVth International Conference on Polyphenols. Polyphenols Communications 2010, Montpellier, France, August 24-27, **2010**, *1*, pp.100-101.

xii. **Krasilnikova J., Telysheva G., Bikovens O., Dizhbite T., Gergensone M., Ponomarenko J.** Effect of plant originated diarylheptanoid oregonin on some antioxidant and lipid peroxidation human blood markers. RSU Collection of scientific papers **2010**, pp. 134-138.

xiii. **Telysheva G., Dizhbite T., Bikovens O., Ponomarenko J., Janceva S., Krasilnikova J.** Biorefinery for bark of deciduous trees. *Proceedings EWLP 2010, 11th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*, Hamburg, Germany, August 16-19, **2010**, pp. 77 – 80.

Patenti:

1) Latvijas Republikas Patents Nr. 14499. Līdzeklis malondialdehīda (MDA) koncentrācijas pazemināšanai asins plazmā. **Teliševa G., Krasiļņikova J., Dižbite T., Ponomarenko J., Girgensone M.**; patenta publikācijas datums 20.07.2012.

2) Latvijas Republikas Patents Nr. 14615. Līdzeklis karbonila olbaltumvielu līmeņa pazemināšanai asins plazmā. **Krasiļņikova J., Teliševa G., Dižbite T., Trouillas P., Ponomarenko J.;** patenta publikācijas datums 20.12.2012.

Autores ieguldījums publikācijās

I.–IV. publikācijas. Promocijas darba autore izstrādāja metodoloģiju pētāmo polifenolu antioksidatīvas aktivitātes raksturošanai un struktūras-antioksidatīvas aktivitātes sakarību noteikšanai un veica attiecīgas analīzes. Veica perspektīvo antioksidantu atlasi un piedalījās to antioksidatīvas darbības pārbaudē praksē (piemēroja paraugu koncentrācijas, eksperimenta apstākļus, izstrādāja metodi pētāmo polifenolu ievadīšanai asins plazmā un eļļā). Veica struktūras-aktivitātes pētījumu datu matemātisko apstrādi, interpretēja darba gaitā iegūtos rezultātus, sagatavoja zinātnisko publikāciju daļas, kas attiecas uz antioksidatīvo aktivitāti.

V. publikācija. Promocijas darba autore izstrādāja metodoloģiju pētāmo polifenolu antioksidatīvas aktivitātes raksturošanai un struktūras-antioksidatīvas aktivitātes sakarību noteikšanai un veica attiecīgas analīzes. Izpētīja frakcionēšanas ietekmi uz pētāmo tehnisko lignīnu antioksidtīvo aktivitāti *in vitro,* kas radīja pamatu frakciju darbības pārbaudei kompozītos. Aprobēja iegūtos rezultātus, piedāloties konferencē: *19 th International Symposium on Analytical and Applied Pyrolysis,* Linz, Austria May 21-25, 2012 ar stenda referātu: „Combination of analytical pyrolysis and fractionation of technical lignin as a tool for improvement of its antioxidant properties". Piedalījas publikācijas rakstīšanā.

VI. publikācija. Disertante piedalījās produktu izdalīšanā, attīrīšanā un modifikācijā. Sagatavoja paraugus analīzēm, kā arī raksturoja to sastāvu un struktūras īpašības, izmantojot modernās un klasiskās analīzes metodes. Veica pētāmo lignīnu antioksidatīvas aktivitātes analīzes, izmantojot promocijas darba gaitā izstrādāto metodoloģiju. Veica perspektīvo antioksidantu atlasi un piedalījās to antioksidatīvas darbības pārbaudē praksē. Izstrādājusi un izmantojusi *Py-GC-MS-FID* analīzes rezultātu apstrādes metodi, kas ļauj iegūt jaunu informāciju par lignīna struktūru. Veica pētījumu datu matemātisko apstrādi, tai skaitā daudzfaktoru korelācijas un regresijas analīzes. Interpretēja visus darba gaitā iegūtos rezultātus, sagatavoja publikācijas melnrakstu.

VII. publikācija. Promocijas darba autore veica pētāmo paraugu antioksidatīvas aktivitātes analīzes, izmantojot promocijas darba gaitā izstrādāto metodoloģiju. Izmantojot molekulārās modelēšanas metodes, veica pētāmo diarilheptanoīdu konformācijas analīzi un aprēķināja ar antioksidatīvo aktivitāti saistītus termodinamiskos deskriptorus. Aprēķini ir veikti Francijā,

Limožas Universitātē, sadarbībā ar prof. P. Trouillas. Apstradāja darba gaitā iegūtos rezultātus, sagatavoja un iesniedza publikāciju.

VIII. publikācija. Disertante sagatavoja paraugus analīzēm, kā arī raksturoja to sastāvu un struktūras īpašības, izmantojot modernās un klasiskās analīzes metodes. Veica pētāmo paraugu antioksidatīvas aktivitātes analīzes. Izstrādājusi un izmantojusi *Py-GC-MS-FID* analīzes rezultātu apstrādes metodi, kas ļauj iegūt jaunu informāciju par lignīna struktūru. Veica pētījumu datu matemātisko apstrādi. Interpretēja darba gaitā iegūtos rezultātus, sagatavoja publikācijas melnrakstu. Aprobēja rezultātus, piedaloties konferencē: *COST Action FP0901* „Analytical techniques for biorefineries", workshop on „Analytical methods for non-wood raw materials and their products and processes", Hamburg, Germany, August 19-21, 2010 ar mutisko ziņojumu **„**Antioxidant properties of soda lignins from non-woody plants in relation to their chemical structure and heterogenity".

IX. publikācija. Promocijas darba autore sagatavoja paraugus analīzēm, kā arī raksturoja to sastāvu un struktūras īpašības, izmantojot modernās un klasiskās analīzes metodes. Autore izstrādāja metodoloģiju pētāmo polifenolu antioksidatīvas aktivitātes vispusīgai raksturošanai un struktūras-antioksidatīvas aktivitātes sakarību noteikšanai un veica attiecīgas analīzes. Veica pētījumu datu matemātisko apstrādi. Interpretēja visus darba gaitā iegūtos rezultātus, sagatavoja un noformēja publikāciju.

X. publikācija. Veica pētāmo paraugu antioksidatīvas aktivitātes analīzes, izmantojot izstrādāto metodoloģiju. Izpētīja frakcionēšanas ietekmi uz pētāmo tehnisko lignīnu antioksidatīvo aktivitāti. Veica pētījumu datu matemātisko apstrādi. Piedalījas publikācijas sagatavošanā.

XI.-XIII. publikācijas. Veica pētāmo paraugu antioksidatīvas aktivitātes analīzes, izmantojot izstrādāto metodoloģiju. Apstrādāja darba gaitā iegūtos rezultātus un sagatavoja publikācijas daļas, kas attiecas uz antioksidatīvo aktivitāti.

Patenti. Disertante veica pētāmo paraugu antioksidatīvas aktivitātes analīzes, izmantojot izstrādāto metodoloģiju. Atlasīja perspektīvos antioksidantus un sagatavoja tos testēšanai asinīs. Izstrādāja metodi ūdenī nešķīstoša lignīna ievadīšanai asinīs.

Ziņojumi starptautiskajās konferencēs un publicētas tēzes:

1) **Ponomarenko J., Dizhbite T., Telysheva G., Viksna A., Bikova T.** Antioxidant properties of soda lignins from non-woody plants in relation to their chemical structure and heterogenity. *Book of Abstract COST Action FP0901* „Analytical techniques for biorefineries", workshop on „Analytical methods for non-wood raw materials and their products and processes", Hamburg, Germany, August 19-21, **2010**, p.9.

2) **Пономаренко Е. А., Дижбите Т. Н., Лаубертс М. А., Быкова Т. О., Телышева Г. М.** Влияние химической гетерогенности на антиоксидантные свойства травяных лигнинов. Биоантиоксидант VIII, Москва, Россия, 4-6 октября **2010,** стр. 390-391.

3) **Ponomarenko J., Dizhbite T., Bikovens O., Telysheva G.** Exploring the antioxidant potential of lignins from different sources. *In 1st Symposium on Biotechnology Applied to Lignocelluloses,* Reims, France, March 28th – April 1st, **2010**, p. 127.

4) **Ponomarenko J., Dizhbite T., Viksna A., Lauberts M., Telysheva G.** Characterization of antioxidant activity of lignins and their modification products. *Proceedings EWLP 2010, 11th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*, Hamburg, Germany, August 16-19, **2010**, pp. 569-572.

5) **Ponomarenko J., Dizhbite T., Viksna A., Lauberts M., Telysheva G., Krasilnikova J.** Sulphur-free hardwood lignins as potent enviroment-friendly antioxidants. *International conference „EcoBalt 2012"*, Riga, Latvia, October 18-19, **2012**.

6) **Dizhbite T., Arshanitsa A., Ponomarenko J., Gosselink R., van der Putten J., Telysheva G.** Combination of analytical pyrolysis and fractionation of technical lignin as a tool for improvement of its antioxidant properties. *19 th International Symposium on Analytical and Applied Pyrolysis,* Linz, Austria May 21-25, **2012**., p. 108

7) **Дижбите Т., Пономаренко Е., Биковенс О., Телышева Г.** Характеристика антиоксидантных свойств лигнинов и родственных полифенолов. *Материалы VII международного симпозиума фенольных соединений*, Москва. Россия, 19-23 октября, **2009**, стр..80. – 81.

8) **Telysheva G., Krasilnikova J., Bikovens O., Dizhbite T., Girgensone M., Ponomarenko J.** Effect of the plant originated diarylheptanoid oregonin on the some antioxidant and lipid peroxidation human blood markers. *MIPTEC 2009 – the leading European event for drug discovery*, Basele, Switzerland, October 13-15, **2009**.

9) **Dizhbite T., Ponomarenko J., Lauberts M., Lebedeva G., Andersone A., Jurkane V., Telysheva G.** Fractionation and characterisation of lignoboost kraft lignin with emphasis on its antioxidant activity. *COST Action FP 0901, COST Action FP 0901"Analytical techniques for biorefineries"*, Tullin, Austria, March 27-28. **2012**, pp. 53-54.

10) **Dizhbite T., Ponomarenko J., Andersone A., Dobele G., Lauberts M., Krasilnikova J., Mironova-Ulmane N., Telysheva G.** Role of paramagnetic polyconjugated clusters in lignin antioxidant activity. *Functional materials and nanotechnologies*, Riga, Latvia, April 17-20, **2012**, p.194.

11) **Lauberts M., Ponomarenko J., Dizhbite T., Kazernaviciute R., Venskutonis R., Telysheva G.** Potential of technical kraft lignin as an antioxidant. *FOODBALT-2012 7th Baltic Conference on Food Science and Technology*, Kaunas, Lithuania, May 17-18,, **2012**, p. 57.

12) **Krasilnikova J., Telysheva G., Dizhbite T., Bikovens O., Ponomarenko J.** Diarylheptanoids and lignins: able and effective anti-aging natural compounds. *COST Action CM0804 Meeting on „Natural Products as drugs and leads for drugs"*, Crete, Greece, October 12-15, **2010**, pp. 70-71.

13) **Красильникова Е. Н., Телышева Г. М., Физдель И. С., Дижбите Т. Н., Пономаренко Е. А.** Возможности коррекции патогенеза метаболического синдрома на доклиническом этапе. *Седьмая Международная научная конференция: „Здоровый образ жизни и вредные для здоровья факторы", Донозология*, Санкт-Петербург, Россия, 13-16 декабря, **2011**, стр. 330-331.

Ziņojumi Latvijas konferencēs un publicētas tēzes:

1) **Ponomarenko J., Dižbite T., Bikovens O., Teliševa G., Vīksna A.** No fitomasas pāstrādes atkritumiem iegūto polifenolu antioksidantā potenciāla pētīšana. *68. LU konferences programmā,* 12. Februāris, **2010**.

2) **Ponomarenko J., Dižbite T., A. Vīksna A., Lauberts M., Teliševa G., Krasiļņikova J.** No Latvijas koku sugām izdalīto lignīnu antioksidantās un bioloģiskās aktivitātes pētīšana. *LU 70. konference* 17. februāris **2012**.

3) **Lauberts M., Vīksna A., Ponomarenko J.** No lauksaimniecības augiem izdalīto lignīnu struktūras un antioksidanto īpašību raksturojums. *51.RTU studentu zinātniskā konference*, 23 aprīlis **2010**, Rīga, 51. RTU studentu zinātniskās un tehniskās konferences materiāli, 140 lpp

4) **Lauberts M., Ponomarenko J., Dižbite T., Vīksna A., Teliševa G.** Jauno KRAFT lignīnu heterogenitātes pētīšana, izmantojot frakcionēšanas metodi *LU 69 zinātniskā konference*, Rīga, 18. februāris **2011**.

5) **Krasilnikova J., Mikaelsson L., Gasslander L., Korduner J., Sovde D., Telysheva G., Dizhbite T., Ponomarenko J.** Influences of Lignin Polymer on the Glucose in Blood of Patients with Different Types of Obesity. *RSU Scientific Conference*, Riga, Latvia, April 14-15, **2011**, p. 198.

6) **Lauberts M., Ponomarenko J., Dižbite T., Teliševa G., Vīksna A.** Lignoboost kraft procesā iegūto blakusprodukti heterogenitātes pētījumi. *Apvienotais pasaules latviešu zinātnieku III kongress un Letonikas IV kongress* 24-27 oktobris 2011, Rīga, PLZK sekcija „Tehniskās zinātnes" tēžu krājums RTU, **2011**., 108 lpp.

7) **Krasilnikova J., Muller-Werkmeister H., Auer T., von Loe A., Wildermut Y., Agusti A., Sedaghat L., Ponomarenko J.** Assessment of Lignin Influence on Saliva activity. *RSU Scientific Conference*, March 29-30, **2012**, p. 143.

8) **Krasilnikova J., Haunreiter F., Feuerriegel G., Langer K., Lavasant S., Alboa D., Ponomarenko J.** Propanol fraction of lignin (JP-3, JP-4). Action in Gastric Juice. *RSU Scientific Conference*, March 29-30, **2012,** p. 144.

PUBLIKĀCIJAS

Promocijas darbs „**Lielmolekulāro un mazmolekulāro lignīnam radniecīgo augu polifenolu struktūras un antioksidatīvas aktivitātes izpēte, to kopsakarību raksturošana”** izstrādāts Latvijas Valsts Koksnes ķīmijas institūta Lignīna ķīmijas laboratorijā un Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē.

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

Autore: Jevgenija Ponomarenko

Paraksts: _____/J. Ponomarenko/

Rekomendējam darbu aizstāvēšanai:

Zinātniskie vadītāji: *Dr. chem.*, prof. Arturs Vīksna _____ /A. Vīksna/

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

Darbs iesniegts:

LU Ķīmijas nozares Promocijas padomē _____

Padomes sekretāre: _____/V. Rudoviča/

Darbs aizstāvēts Promocijas padomes sēdē

_____ protokols Nr. _____

Padomes sekretāre: _____/V. Rudoviča/