

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**BRIOFĪTU EKSTRAKTVIELU SASTĀVA IZPĒTE
IZMANTOJOT FRAKCIONĒŠANU AR CIETFĀZES
EKSTRAKCIJAS METODI**

BAKALAURA DARBS

Autors: **Polina Naidjonoka**

Stud. Apl. Nr: pn11003

Darba vadītājs:

Dr.ķīm., prof. Arturs Vīksna

MSc. Laura Kļaviņa

RĪGA

2014

ANOTĀCIJA

Briofītu ekstraktvielu sastāva izpēte izmantojot frakcionēšanu ar cietfāzes ekstrakcijas metodi. Naidjonoka P., darba vadītājs MSc. Kļaviņa L, Dr. ķīm., prof. Vīksna A. Bakalaura darbs, 72 lappuses, 16 tabulas, 18 attēli, 96 literatūras avoti, 3 pielikumi. Latviešu valodā.

Bakalaura darbā ir apkopota informācija par briofītu ķīmisko sastāvu un tā pētījumiem, kā arī ir aplūkoti cietfāzes ekstrakcijas metodes pamati un pielietojumi dabas ekstraktvielu frakcionēšanai. Eksperimentālajā daļā tika veikta briofītu *Polytrichum commune* un *Dicranum polysetum* ekstrakta frakcionēšana, izmantojot tādus cietfāzes sorbentus kā silikagēls un ar aminopropilgrupām modificēts silikagēls. Tika salīdzinātas divas eluentu sistēmas tādu savienojumu kļāšu atdalīšanai kā ogļūdeņraži, taukskābes un toesteri, steroli. Iegūtās frakcijas tika analizētas ar gāzes hromatogrāfijas-masspektrometrijas metodi un identificētiem savienojumiem tika noteikta masas koncentrācija sausos briofītos.

BRIOFĪTI, POLYTRICHUM COMMUNE, DICRANUM POLYSETUM, CIETFĀZES EKSTRAKCIJA, SILIKAGĒLS, SPE-NH₂, GĀZES HROMATOGRĀFIJA-MASSPEKTROMETRIJA.

ABSTRACT

Bryophyte chemical composition analysis using solid phase extraction method.

Naidjonoka P., supervisor M. Sc. Kļaviņa L, Dr. chem., prof. Vīksna, A. Bachelor's thesis, 72 pages, 16 tables, 18 figures, 96 references, 3 appendices. In Latvian.

This bachelor's thesis summarizes information on studies about chemical composition of bryophytes. It also deals with basics of solid phase extraction and different solid phase sorbents application for separation of compounds found in biological samples. In experimental part the extract of bryophyte species *Polytrichum commune* and *Dicranum polysetum* was separated using such solid phase sorbents as silica and aminopropyl bonded silica. Two eluent systems were compared for isolation of carbohydrates, fatty acids and ethers, sterols. Fractions were analyzed by gas chromatography – mass spectrometry method and the concentration of identified compounds was quantified.

BRYOPHYTES, POLYTRICHUM COMMUNE, DICRANUM POLYSETUM, SOLID PHASE EXTRACTION, SILICA, SPE-NH₂, GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY.

SATURS

IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1. Briofītu raksturojums un īpašības.....	7
1.2. Briofītu ķīmiskais sastāvs.....	7
1.2.1. Ogļhidrāti briofītu sastāvā	8
1.2.2. Lipīdi briofītu sastāvā	8
1.3. Cietfāzes ekstrakcija.....	12
1.4. Cietfāzes ekstrakcijas metodes izmantošana dabas vielu ekstraktu frakcionēšanai	15
1.4.1. Ogļūdeņražu maisījumu sadalīšana	15
1.4.2. Pārtikas eļļu un tauku frakcionēšana	15
1.4.3. Lipīdu savienojumu frakcionēšana no bioloģiskiem paraugiem: audiem un šķidrumiem	19
1.4.4. Policiklisku aromātisku savienojumu frakcionēšana.....	22
1.5. Gāzes hromatogrāfija	23
1.6. Masspektrometrijas pamati.....	24
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA.....	26
2.1. Izmantotās iekārtas un reaģenti	26
2.2. Analizējamo briofītu paraugu raksturojums un ievākšanaapstākļi	26
2.3. Briofītu ekstraktu sagatavošana.....	27
2.4. Silikagēlaadsorbcijas kapacitātes noteikšana	27
2.5. Briofītu hloroformaekstrakta frakcionēšana.....	29
2.5.1. Briofītu ekstrakta cietfāzes ekstrakcijaar eluentu sistēmu №1	30
2.5.2. Briofītu ekstrakta cietfāzes ekstrakcijaar eluentu sistēmu №2	31
2.6. Briofītu ekstraktvielu gāzes hromatogrāfijas-masspektrometrijas analīze.....	31
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	34
3.1. Briofītu ekstraktu analīze	35
3.2. Briofītu ekstraktvielu frakcionēšanaar eluentu sistēmu №1	38
3.2.1. Heksāna frakcija№1	38
3.2.2. Heksāna un hloroforma frakcija	40
3.2.3. Hloroforma frakcija№1	41
3.2.4. Dietilētera un etiķskābes frakcija.....	43

3.3. Briofītu ekstraktvielu frakcionēšana ar eluentu sistēmu №2	45
3.3.1. Heksāna frakcija №2	45
3.3.2. Hloroforma frakcija №2	48
3.3.3. Amonjaka frakcija	51
SECINĀJUMI	55
LITERATŪRAS SARAKSTS	56
PIELIKUMI.....	65
1. pielikums. Briofītu ekstraktu kopējā un cietfāzes ekstrakcijas gaitā iegūto frakciju hromatogrammas.	65
2. pielikums. Briofītu ekstraktos identificēto savienojumu masspektru piemēri	67

IEVADS

Briofīti ir neliela izmēra augi bez vaskulārās sistēmas. Tie atīstījās pirms apmēram 500 miljoniem gadu un tiek uzskatīti par pirmajiem sauszemesi apdzīvošajiem augiem. Briofīti ir izplatīti visos kontinentos un katrā apvidū, kur iespējama fotosintēze. Latvijā ir sastopamas vairāk nekā 550 dažādas briofītu sugas. Taču neskatoties uz plašu briofītu izplatību visā pasaulē, ķīmiskais sastāvs un īpašības pētītas tikai ~ 10% no briofītu sugām.

Briofītiem piemīt antimikrobiālā un pretsēnīšu iedarbība. Ķīnā, Eiropā un Ziemeļamerikā tie tiek izmantoti tautas medicīnā nobrāzumu un ādas apdegumu ārstēšanai. Vēl viena svarīga briofītu īpašība ir to augstā jutība pret dažādiem smagajiem metāliem. Ar briofītu palīdzību var noteikt bīstamu piesārņotāju daudzuma izmaiņas gaisā un ūdenī. Briofīti ir izplatīts dabas resurss, kam iespējams atrast pielietojumu daudzās zinātņu nozarēs.

Savienojumu noteikšanai un identifikācijai briofītu ekstraktos visbiežāk izmanto GC/MS vai HPLC/MS. Taču savienojumu identificēšanu visos dabas paraugos apgrūtina liels savienojumu skaits, kas izsauc signālu pārpilnību hromatogrammās. Viens no risinājumiem šai problēmai ir ekstrakta fracionēšana ar cietfāzes ekstrakcijas metodi. Izmantojot dažādas polaritātes eluentus un dažādus sorbentus var panākt savienojumu sadalīšanu frakcijās atkarībā no topolaritātes. Briofītu ekstraktu fracionēšanai nav izstrādātas metodes, tāpēc bakalaura darba ietvaros tiek pētīti un piemeklēti piemēroti apstākļi dažādu briofītos esošo savienojumu atdalīšanai.

Darba mērķis: izstrādāt optimālu cietfāzes ekstrakcijas metodi briofītu *Polytrichum commune* un *Dicranum polysetum* ekstraktā esošo alkānu, sterolu, taukskābju un to esteru fracionēšanai.

Darba uzdevumi:

1. Apkopot literatūru par briofītu raksturojumu un ķīmisko sastāvu.
2. Iepazīties ar cietfāzes ekstrakcijas pamatprincipiem un pielietojumu dabas vielu ekstraktu fracionēšanai.
3. Izpētīt dažādu eluentu pielietojamību briofītu ekstraktvielu fracionēšanai.
4. Izpētīt briofītu ekstraktvielu fracionēšanas iespējas ar dažādiem cietfāzes sorbentiem.

Bakalaura darbs tika izstrādāts Ģeogrāfijas un Zemes zinātņu fakultātē.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Briofītu raksturojums un īpašības

Briofīti (sūnaugi) ir zemākieaugi, kurus iedala 3 grupās: lapu sūnas (*Musci*);aknu sūnas (*Hepaticae*) un ragvācelītes (*Anthorcerotae*). Briofīti ir otrā lielākā apakšvalsts augu valstī, kurā ir vairāk nekā 20000 sugas [1]. Briofīti ir pazīstami ar to, ka tiem nav attīstīta vaskulāroaudu un sakņu sistēma, tādēļ gan ūdens, gan barības vielu uzņemšanai tiek izmantota visaauga virsma. Šoaugu izmērs ir robežās nopāris milimetriem līdz pusmetram. Briofītu izmērs, kuri aug tropu reģionos un ūdenī, sasniedz pat 2 m [2]. Latvijā sastopamubriofītu sugu skaits pārsniedz 550, puse no tām ir reti sastopamas. Latvijas sarkanajā grāmatā ir iekļautas 87 sugas un 127 tiek uzskatītas par īpaši aizsargājamām [3].

Lielākai daļai briofītu piemīt rūgta, pat asa garša. Dažās sugās ietilpstošie seskviterpēnu laktoni un garas ķēdes alkilfenoli var izraisīt alerģisku reakciju. Daudziembriofītiem piemīt antimikrobiālā un pretsēnīšu iedarbība, tāpēc tos izmanto tautas medicīnā kā ārstniecisko līdzekli ādas apdegumu un brūču ārstēšanai, kā arī neirastēnijas, disbakteriozes, psoriāzes, pneimonijas, tuberkulozes, nieru iekaisumu, dažādu infekciju un citu slimību ārstēšanai [1].

Ekologi uzskata, ka briofītiem ir milzīga loma barošanās ciklā, ūdens aizturē un ūdens pieejamības nodrošināšanā. Savukārt medicīnas nozares pārstāvji novērtē briofītu izmantošanu gēnu funkcionēšanas izpētē un proteīnu ražošanā [2]. Mūsdienās bieži briofīti tiek izmantoti kā vides bioindikatori, kuri sniedz informāciju par apkārtējās vides piesārņojuma daudzumu. Smago metālu uzkrāšanās briofītos ietekmē lipīdu kvalitāti un daudzumu [1].

1.2. Briofītu ķīmiskais sastāvs

Briofītu ķīmisko sastāvu ietekmē daudzi ārējieapstākļi, piemēram, gaisa temperatūra, ultravioletā starojuma intensitāte, mitruma daudzums, skābekļa daudzums un augsnes pH, apkārtējās vides piesārņojums u.c. Sastāvu ietekmē arī auga vecums [1,4-6]. Tā, palielinoties auga vecumam, slāpekļa, kālija un fosfora daudzums briofītos samazinās, bet kalcija – pieaug [7].

Briofītu ķīmiskopamatsastāvu veido tādas organiskās vielas kā hemiceluloze, pektīns 30-60%, olbaltumvielas 5-10%, celuloze 15-25%, lipīdi un polifenoli 5-10%. Neorganiskovielu daudzums ir tikai 3-10% [8].

1.2.1. Oglhidrāti briofītu sastāvā

Oglhidrātus iedala monosaharīdos, oligosaharīdos un polisaharīdos. Monosaharīdi ir polihidroksisavienojumi, kuru molekulā ir aldehīdgrupa vai karbonilgrupa. Briofītu sastāvā ietilpstošās aldoheksozes ir galaktoze, mannoze un glikoze. Glikoze ir atrasta 46 briofītu sugās. Daudz mazākās koncentrācijās ir ramnoze, rafinoze un ketoheksoze fruktoze. Dažu sugu sastāvā ietilpst arī pentozes, piemēram, ksiloze, riboze, arabinoze. Disaharīdi ir veidoti no diviem monosaharīdu atlikumiem, kuri ir saistīti ar glikozīdisko saiti. Visizplatītākais disaharīds briofītos ir saharoze, kura ir atrodama 44 aknu sūnu sugās [1, 9]. Tās koncentrācija briofītu sugās *Dicranum majus*, *Polytrichum commune*, *Racomitrum lanuginosum* un *Hookeria lucens* ir robežās no 100 līdz 500 μmol/g sausnes [10, 11]. Polisaharīdu molekulās ietilpst simtiem un tūkstošiem monosaharīdu atlikumu. Augos polisaharīdi tiek izmantoti kā enerģijas avots vai šūnu struktūrelements. Nopolisaharīdiem briofītu sastāvā ir atrodama ciete, taču tās daudzums ir ļoti mazs un daudzās sugās ciete vispār nav atrodama. Briofītu sastāvā ietilpst tādi raksturīgie polisaharīdi kā sfagnāns (poli(galakturonskābe)), kas ir atrodams sfagnos [11].

1.2.2. Lipīdi briofītu sastāvā

Lipīdi ir vielas, kas nešķīst ūdenī un no dzīvoorganismu audiem ekstrahējas ar nepolāriem šķīdinātājiem. Kopējais lipīdu daudzums briofītu sausnē svārstās no 21,9 mg/g līdz 68,0 mg/g [1]. Lipīdus iedalā polāros, neitrālos un sekundāros metabolītos.

Polārie lipīdi. Piepolāriem lipīdiem pieder glikolipīdi, fosfolipīdi un betaīna lipīdi. Polāro lipīdu saturs briofītos ir ļoti dažāds. Vismazākais daudzums (8,3% no kopējā lipīdu daudzuma) ir briofītu sugā *Sphagnum squarrosum* un vislielākais (30,6%) - briofītos *Philonotis fontana* [1].

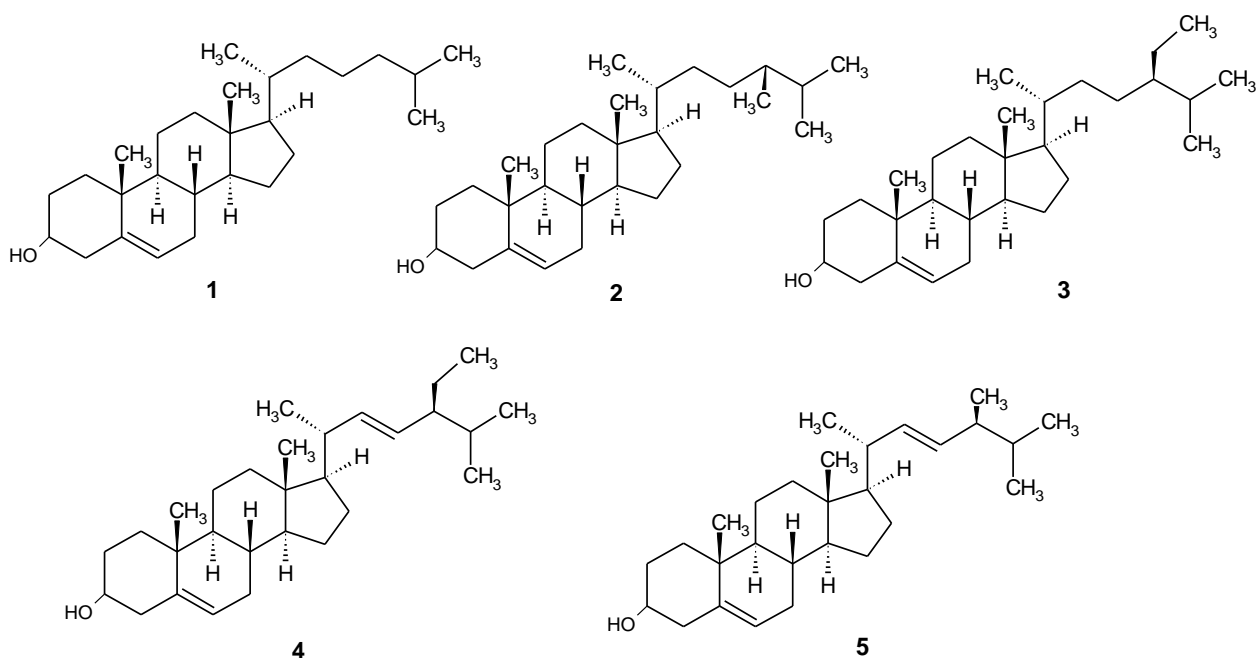
Visizplatītākie fosfolipīdi briofītos ir fosfatidilglicerīns, fosfatidilholīns un fosfatidiletanolamīns, kā arī fosfatidilinozīts un fosfatidilserīns [3, 5, 6]. Kopējā glikolipīdu koncentrācija briofītu sugās ir mazāka nekā neitrālo lipīdu koncentrācija un ir robežās no 18,7% līdz 36,1% no kopējās lipīdu masas [3]. Betaīna lipīdu uzbūve ir tādaspat kā fosfolipīdiem, tikai betaīna lipīdiem nav fosfātgrupas. Visbiežāk atrodamais betaīna lipīds ir 1(3),2-diacilgliceril-O-4'-(N,N,N-trimetil)-homoserīns (DGTS), kura daudzums no kopējā lipīdu satura svārstās no 13,3% briofītos *Pleurozium medium* līdz 39,6% *Pellia neesiana* [1, 12, 13].

Neitrālie lipīdi. Neitrālie lipīdi ir triglicerīdi, vaski, steroīdu esteri. Tie veido vislielāko daļu no kopējā lipīdu daudzuma briofītos. To daudzums svārstās no 18,58% briofītos *Atrichum angustatum* līdz 71,25% sugā *Mnium marginatum*. Visizplatītākie neitrālie lipīdi ir triglicerīdi,

vaski un steroīdu esteri [12-14]. Triglicerīdi sastāv no glicerīna un taukskābju atlikumiem. Briofītos triglicerīdu saturs ir lielāks nekā augstākos augos. Tas mainās no 11% līdz 60%. Pārsvārā briofītu sastāvā ietilpst tādas triglicerīdu tauksābes kā palmitīnskābe, linolskābe, linolēnskābe, oleīnskābe, arahidonskābe, eikozānpentakarbonskābe [9, 13, 14].

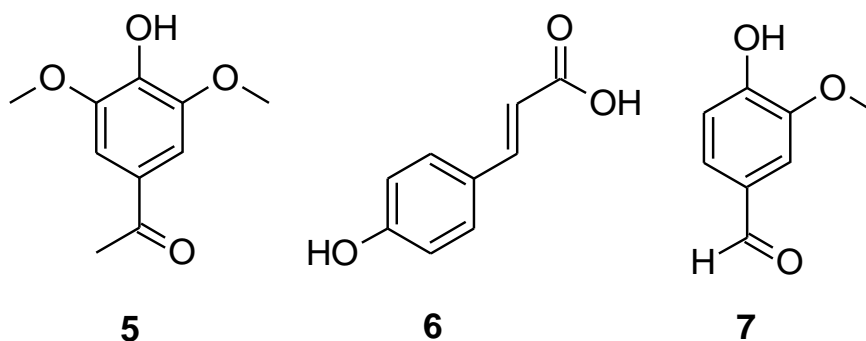
Sekundārie metabolīti. Pie sekundāro metabolītu grupas pieder taukskābes, steroīdi, terpenoīdi, karotinoīdi, vairākvērtīgie un garas alkilķēdes spirti un ogļūdeņraži. Visbiežāk briofītu sastāvā ir nesazarotas nepiesātinātas un piesātinātas monokarbonskābes ar pāraoglekļaatomu skaitu. Sazarotu taukskābju daudzums nepārsniedz 1% nokopējā lipīdu saturā. Biežāk atrodamās ir C₁₂-C₂₆ taukskābes, taču mazākās koncentrācijās tika izolētas arī taukskābes ar lielāku oglekļaatomu skaitu. Briofītu sastāvā no piesātinātām taukskābēm visizplatītākās ir palmitīnskābe (16:0) un stearīnskābe (18:0), bet no nepiesātinātām – oleīnskābe (cis-9-18:1), linolskābe (cis-9,cis-12-18:2) un linolēnskābe (cis-9,cis-12,cis-15-18:3), kā arī arahidonskābe (cis-5,cis-8,cis-11,cis-14-20:4), eikozapentaēnskābe (cis-5,cis-8,cis-11,cis-14,cis-17-20:5), dokozaēnskābe (cis-7,cis-10,cis-13,cis-16,cis-19-22:5) [1, 9, 12, 15, 16].

Sterolipēc uzbūves ļoti atšķiras no citām lipīdu grupām. To struktūru veido trīs kondensētie cikloheksāna gredzeni un viens ciklopentāna gredzens, kuros ir dažādi aizvietotāji. Sterolu daudzums briofītos ir robežās no 0,04% līdz 0,21% sausā masā. Briofīti satur sterolus ar 27-30 oglekļaatomiem, raksturīgākie no kuriem ir holesterols (**1**), kampasterols (**2**) (24-metilholesterols), β-sitosterols (**3**) (24-etilholesterols), stigmasterols (**4**) (24-etilholeste-5,22-diēnols) un brasikasterols (**5**). Stigmasterols un β-sitosterols (C₂₉) ir biežāk atrodami nekā kampesterols (C₂₈) un holesterols (C₂₇) visās Sphagnum sūnās [1, 5, 16, 17].



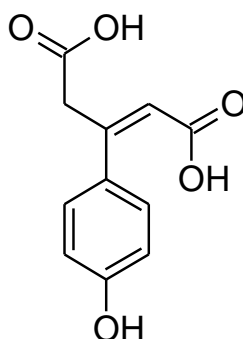
1.1.att. Briofītu ekstraktā sastopamie steroli [1]

Vēl viena sekundāro metabolītu grupa, kas tiek sintezēta briofītos ir fenolu savienojumi. Visizplatītākie šīs savienojumu klases pārstāvji briofītos ir *p*-hidroksibenzoskābe, 4-hidroksibenzaldehīds, 3,4-dihidroksibenzoskābe, 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehīds, 4-acetil-2,6-dimetoksifenols (5), *p*-hidroksikanēļskābe (6), vanilīns (7) (3-metoksi-4-hidroksibenzaldehīds) un 3-metoksi-4-hidroksiacetofenons [14, 18-22].



1.2.att. Briofītos sastopamo fenolu struktūrformulas [22]

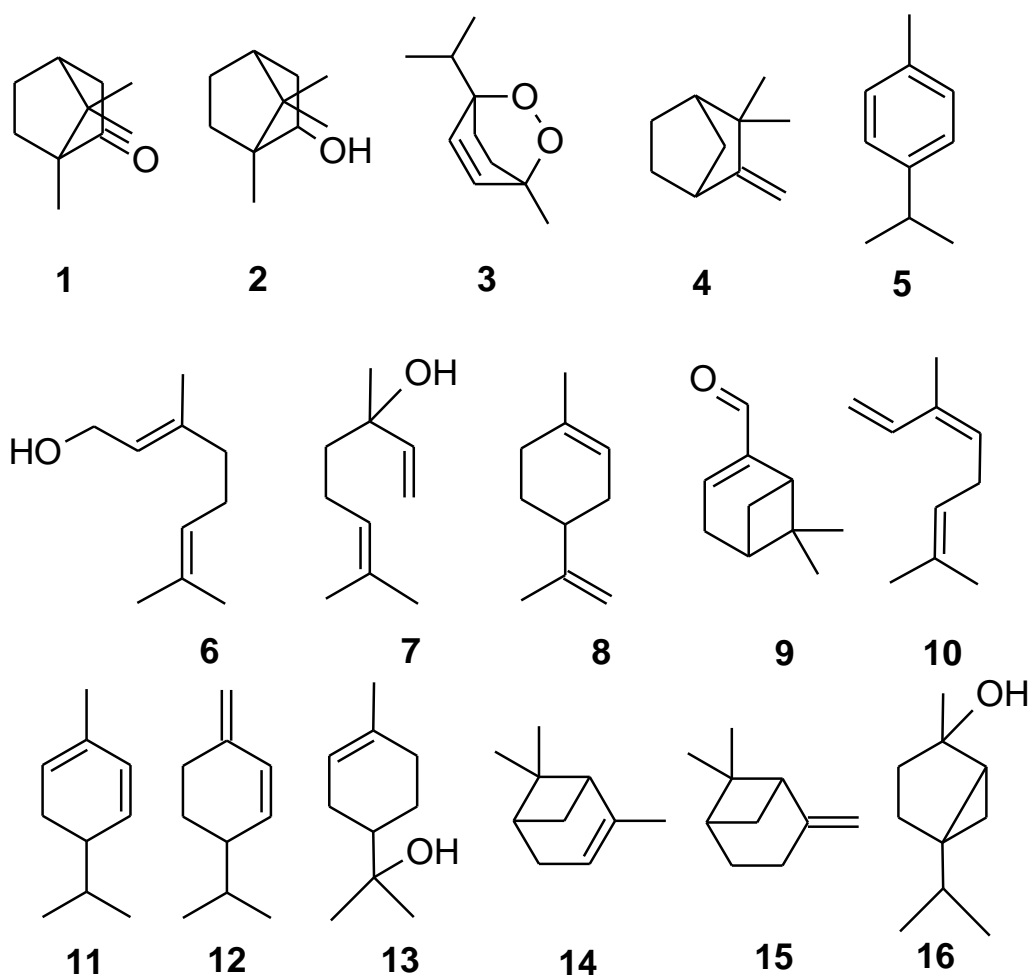
Sphagnum dzimtai raksturīgs savienojums ir sfagnskābe (3-(4-hidroksifenil)-penta-2-ēn-1,5-dikarbonskābe). Tās daudzums var mainīties dažādās augu daļās no 70 μg/g sausaparauga jau sadalīties sākušajā daļā līdz pat 220 μg/g sausaparauga augšējā daļā [23].



1.3.att. Raksturīgs tikai *Sphagnum* dzimtai savienojums – sfagnu skābe [23]

Briofītu ekstraktos lielā daudzumā ir atrodami flavonoīdi. Šie savienojumi nodrošina augu krāsu, kā arī, absorbējot ultravioleto starojumu, tie pasargā briofītus no saules nelabvēlīgā starojuma [14, 24]. Flavonoīdi ir atrodami tikai lapu sūnās un aknu sūnās, ragvēcelīšu ķīmiskajā sastāvā šie savienojumi neietilpst [25]. Briofītu sastāvā ir atrodami tādi bioloģiski aktīvi savienojumi kā flavonaepigenīns, epigenīn-7-O-triglikozīds, saporanīns, lucenīns-2, luteolīns-7-O-neoheperidozīds un viteksīns [26]. No biflavonoīdiem visbiežāk ir sastopami 5'3''-dihidroksiantoflavons un 5'3''-dihidroksirobustoflavons [27].

Terpenoīdi ir skābekli saturoši organiskie savienojumi, kuru ogleņūdeņražu skeletu veido izoprēna fragmenti. Terpenoīdi tiek iedalīti vairākās klasēs: mono-, seskvi-, di-, tri-, tetra-, pentaterpenoīdi. Visvairāk terpenoīdus satur aknu sūnas. Biežāk sastopamie monoterpenoīdi briofītu sastāvā ir kampars (**1**), borneols (**2**), askaridols (**3**), kamfēns (**4**), cimēns (**5**), geraniols (**6**), linalools (**7**), limonēns (**8**), mirtenāls (**9**), ocimēns (**10**), α - (**11**) un β -felandrēns (**12**), α -terpineols (**13**), α - (**14**) un β - pinēns (**15**), tujanols (**6**) u.c. Lapu un aknu sūnās ir atrodami tādi triterpenoīdi kā friedelīns, epifriedeniols, neohop-13(18)-ēns, ursolskābe, hop-17(21)-ēns, hop-22(29)-ēns [1, 14].



1.4.att. Briofītu ekstraktos atrodami monoterpēni [1]

Svarīga terpēnu grupa ir karotinoīdi. Pārsvārā tie ir tetraterpēni un tetraterpenoīdi. Briofītu augos karotinoīdu daudzums ir robežās no 6,617 līdz 30,656 $\mu\text{g/g}$ svaigaparauga. Tipiskie karotinoīdi briofītu sastāvā ir α - un β -karotīns, β -karotīnaepoksīds, luteīns, zeaksantīns, mutatoksentīns, anteroksentīns, neoksentīns, α -, β - un izo-kriptoksentīns un 5,6-epoksiluteīns [1].

1.3. Cietfāzes ekstrakcija

Apgrieztās fāzes SPE (solid phase extraction). Apgrieztās fāzes ekstrakcija ietver polāru vai vidēji polāru parauga matricu kā kustīgo fāzi un nepolāru nekustīgo fāzi. Analizējamā paraugapolaritāteiparasti ir jābūt no vidēji polāras līdz nepolārai šī tipaekstrakcijas metodei. Apgrieztās fāzes kategorijai pieder tādi cietfāzes ekstrakcijas materiālikā silikagēls, saistīts ar alkil- vai aril- grupu, piemēram, LC-18, ENVI-18, LC-8, LC-Ph u.c. Šajā sorbentā hidrofilā silanola grupa tiek ķīmiski modificēta ar atbilstošā silāna hidrofoboalkil- vai aril- grupu uz silikagēla virsmas.

Organiskā savienojuma aizturēšana uz cietfāzes materiāla nopolārā šķīdinātāja notiek pateicoties pievilksnās spēkiem starp savienojuma „ogleklis – ūdeņradis” saitēm un funkcionālajām grupām uz silikagēla virsmas. Šie „nopolārs – nepolārs” pievilksnās spēki tiek saukti par van der Valsa mijiedarbību vai dispersijas mijiedarbību. Adsorbētā savienojuma eluēšanai no apgrieztās fāzes SPE izmanto nepolāru šķīdinātāju, kura iedarbībā tiek izjaukti spēki, kas saista savienojumu ar adsorbentu [28]. Apgrieztās fāzes SPE izmanto savienojumu atdalīšanai no narkotiskajām vielām, pesticīdiem [29].

Normālās fāzes SPE. Normālās fāzes SPE parasti iekļauj polāru analītu, vidēji polāru vai nepolāru matricu (piemēram, acetons, heksāns un hlorētie šķīdinātāji) un polāru nekustīgo fāzi. Šajā SPE mehānismā tiek izmantoti silikagēls ar polārām funkcionālām grupām (piemēram, LC-CN, LC-NH₂ un LC-Diol) un polārā adsorbcijas vide (piemēram, LC-Si, LC-Florisil, ENVI-Florisil un LC-Alumina). Analizējamā savienojuma aizturēšanās normālās fāzes apstākļos notiek pateicoties mijiedarbības ar analīta polārām funkcionālajām grupām un polārām grupām uz sorbenta virsmas. Šeit notiek ūdeņraža saites, dubultsaites, dipola – dipola, dipola – lādētā dipola un citas mijiedarbības. Šāda mehānisma rezultātā adsorbējušos savienojumu var atdalīt, izmantojot eluentu, kurš izjauc savienošanos (saistīšanās) mehānismu – parasti daudz polārāku šķīdinātāju par paraugasākotnējo vidi [28]. Normālās fāzes SPE metodi izmanto amīnu, hidroksīdu, karbonil savienojumu, aromatisko gredzenu un heteroatomu (O, S, N, P) saturošu savienojumu atdalīšanai no lipīdiem, eļļām, ogļhidrātiem, fenoliem [29].

SPE ar LC-CN, LC-NH₂ un LC-Diol silikagēlu ir īsas alkil-ķēdes ar polāru funkcionālo grupu, kas ir savienota ar virsmu. Salīdzinājumā ar apgrieztās fāzes silikagēliem, šie silikagēli ir daudz hidrofilāki polāro funkcionālo grupu dēļ. Līdzīgi kā tipiskie normālās fāzes silikagēli, šie sorbenti var būt izmantoti, lai adsorbētu polāros savienojumus no nepolāra šķīdinātāja. Šādas SPE kolonnas tiek izmantotas, lai adsorbētu un selektīvi eluētu savienojumus ar līdzīgu struktūru (piemēram, izomērus), maisījumus ar daudziem savienojumiem vai tādas savienojumu klases kā

lipīdi. Normālās fāzes materiāli var būt izmantoti arī apgrieztās fāzes apstākļos (ar ūdens šķīdumiem) īsas alkil-ķēdes hidrofobo īpašību izmantošanai.

Jonu apmaiņas SPE. Jonu apmaiņas SPE tiek izmantota lādētu savienojumu izdalīšanai no šķīduma (parasti ūdens, bet dažreiz arī organiska). Anjonu (negatīvi lādēti) savienojumi tiek izolēti uz sorbenta, kas saistīs ar LC-SAX (*stiprs anjonu aizvietotājs*) vai LC-NH₂ silikagēlakārtridžiem. Katjonu (pozitīvi lādēti) savienojumi tiek aizturēti, izmantojot, ar LC-SCX (*stiprs katjonu apmainītājs*) vai LC-WCX (*vājš katjonu apmainītājs*) saistīta silikagēla kārtidža. Savienojumu pirmējās sorbcijas mehānismam pamatā ir elektrostatisks spēki starp savienojuma lādēto funkcionālo grupu un, uz silikagēla virsmas saistīto, lādēto grupu. Lai savienojums tiktu aizturēts no ūdens šķīduma jonu apmaiņas rezultātā, parauga matricas pH ir jābūt tādām, kurā gan analizējamais savienojums, gan funkcionālā grupa uz silikagēla virsmas ir lādēti, kā arī šķīdumā ir jābūt tikai dažiem vai vispār nevienam savienojumam ar tādu pašu lādiņu kā savienojumam matricā, jo tie var apgrūtināt analizējamā savienojuma adsorbciju. Analizējamā savienojuma eluēšanai izmanto šķīdumu ar pH, pie kura tiek neitralizēta savienojuma funkcionālā grupa vai funkcionālā grupa uz silikagēla virsmas. Kad viena no funkcionālajām grupām ir neitralizēta, elektrostatisks spēki, kuri saista abas grupas, tiek izjaukti un savienojums eluējas. Var izmantot arī šķīdumu ar augstu jonu spēku vai šķīdumu ar joniem, kuri var aizstāt adsorbēto savienojumu.

Anjonu apmaiņas SPE. Sorbents LC-SAX satur alifātiskās ceturtējāamīna grupas, kas ir saistītas ar silikagēla virsmu. Ceturtējāamīns ir stipra bāze. Tas pastāv kā pozitīvi lādēts katjons, kurš aizvieto vai pievelk anjonus šķīdumā, tādēļ arī tiek saukts par stipru anjonu apmainītāju (aizvietotāju) (SAX). Ceturtējāamīna pKa vērtība ir ļoti augsta (-vairāk nekā 14), kas padara saistīto funkcionālo grupu lādētu ūdens šķīdumā visā pH apgabālā, kā rezultātā, kamēr parauga pH tāds, kurā analizējamais savienojums ir lādēts, LC-SAX tiek izmantots, lai izolētu stipru anjonu (ļoti zema pKa vērtība, <1) vai vāju anjonu (vidēji zems pKa, >2) savienojumus. Lai analizējamais anjonu savienojums būtu lādēts, tā matricas pH ir jābūt par 2 pH vienībām augstākam nekā tā pKa vērtība. Visbiežāk analizējamais savienojums ir stipra vai vāja skābe.

LC-SAX tiek izmantots anjonu ekstrahēšanai tikai tad, ja atgūšanai eluēšana nav nepieciešama (savienojums tiek izolēts un tālāk netiek analizēts), jo tas ļoti stipri saistās. Vāji anjoni var būt izolēti un eluēti no LC-SAX, jo tie var būt gan aizvietoti ar alternatīvu anjonu, gan eluēti ar tāda pH skābu šķīdumu, pie kura vājš anjons tiek neitralizēts (2 pH vienības zemāks par tā pKa). Ja ir nepieciešama stipru anjonu grupas atgūšana, izmanto LC-NH₂ sorbentu.

LC-NH₂ SPE sorbents tiek izmantots normālās fāzes ekstrakcijai, taču tiek uzskatīts arī par vāju anjonu aizvietotāju (WAX) ūdens šķīdumos. LC-NH₂ materiāls satur

alifātiskoaminopropilgrupu, saistītuar silikagēla virsmu. Pirmējā amīna funkcionālās grupas pKa ir apmēram 9,8. Paraugš ir jāuznes piepH, kas ir vismaz 2 pH vienības zemāks nekā 9,8, lai amīnu varētu izmantot kā anjonu aizvietotāju, kā arī pH vērtībai ir jābūt tādai, pie kuras analizējamais savienojums ir lādēts (2 pH vienības virs tā pKa vērtības). Tā kā amīna funkcionālā grupa uz silikagēla virsmas var būt neutralizēta (2 pH vienības virs tā pKa), LC-NH₂ tiek izmantots gan stipru, gan vāju anjonu eluēšanai un atgūšanai. Vāji anjoni no LC-NH₂ sorbenta var būt eluēti arī ar šķīdumu, kas neutralizē adsorbējušos anjonu (2 pH vienības zem tā pKa) vai, pievienojot citus anjonus, kas aizvieto analītu.

Katjonu apmaiņas SPE. LC-SCX sorbentu veido silikagēls, uz kura virsmas ir saistītas alifātiskās sulfonskābes grupas. Sulfonskābes grupa ir stipri skāba (pKa<1), un pievelk vai aizstāj katjonu grupas analizējamajā šķīdumā, tādēļ to sauc par stipru katjonu aizvietotāju (SCX). Saistītā funkcionālā grupa ir lādēta visā pH diapozonā, tādēļ kamēr šķīdumapH ir tāds, pie kura savienojums ir lādēts, tā tiek izmantota, lai izolētu stipru katjonu (ar augstu pKa, >14) vai vāju katjonu (vidēji augsts pKa, <12) savienojumus. Analizējamais katjonu savienojums ir lādēts, ja tā matricas pH ir par 2 pH vienībām zemāks nekā tā pKa vērtība. Visbiežāk analizējamais savienojums ir stipra skābe vai vāja bāze.

LC-SCX SPE kolonnas izmanto, lai izolētu stiprus katjonus tikai tādā gadījumā, ja to atgūšana un eluēšana nav nepieciešama. Vājus katjonus var izolēt un eluēt no LC-SCX; eluēšanu veic ar šķīdumu, kurapH ir par 2 pH vienībām augstāks nekā katjonapKa vai, pievienojot citu katjonu, kas aizvieto analītu. Ja ir nepieciešama stipra katjona grupas atgūšana, izmanto LC-WCX sorbentu.

LC-WCX SPE sorbents satur alifātiskās karbonskābes grupu, kas ir saistīta ar silikagēla virsmu. Karbonskābes grupa ir vājš anjons, tādēļ tiek uzskatīts par vāju katjonu aizvietotāju (WCX). Karbonskābes funkcionālajai grupai LC-WCX materiālā pKa ir apmēram 4.8. Šī grupa būs negatīvi lādēta šķīdumos, kuru pH ir vismaz 2 pH vienības augstāks nekā pKa vērtība, un izolēs katjonus šķīdumā ar pH, pie kuraabi ir lādēti. Tā kā karbonskābes funkcionālā grupa uz silikagēla virsmas var būt neutralizēta (2 pH vienības zemākā pH nekā pKa vērtība), LC-WCX izmanto, lai izolētu un atgūtugan stiprus, gan vājus katjonus. Vāji katjoni var būt eluēti no LC-WCX arī ar šķīdumu, kas neutralizē adsorbējušos katjonus (2 pH vienības virs tā pKa vērtības) vai, pievienojot citu katjonu, kurš aizvieto analītu.

Vairākumā gadījumos, jonu apmaiņas SPEanalīts tiek eluēts ūdens šķīdumā. Ja analīta eluēšanai no SPE ir nepieciešams izmantot skābu vai bāzisku šķīdumu, bet ekstraktaparaugs ir jāanalizē organiskajā šķīdinātājā, kas nesajaucas ar ūdeni, savienojumu var eluēt ar skābu metanolu (98% metanols/ 2% konc. HCl) vai ar bāzisku metanolu (98%

metanols/2% NH₄OH). Metanolu var ātri iztvaicēt, un paraugu var šķīdināt citā šķīdinātājā. Jaanalītaeluēšanai no SPE kolonnas ir nepieciešams stiprāks (nepolārāks) šķīdinātājs, skābām vai bāziskam metanolam var pievienot metilēnhlorīdu, heksānu vai etilacetātu [28].

1.4. Cietfāzes ekstrakcijas metodes izmantošana dabas vielu ekstraktu frakcionēšanai

Dabas vielu ekstraktu selektīvu sadalīšanu līdzīgu savienojumu grupās var panākt mainot sorbentacieto fāzi, eluentu vai abus. Cietfāzes ekstrakcijas metodes izmantošanu nosaka selektīva mijiedarbība starptdalāmo savienojumu un cietās fāzes sorbenta funkcionālo grupu. Atkarībā no savienojumu struktūras, šīs mijiedarbības var būt ļoti dažādas, taču tās ir līdzīgas savienojumiem ar līdzīgu struktūru. Tādā veidā mainot eluenta īpašības(pH, polaritāte, u.c.) vai cietās fāzes sorbenta īpašības, var selektīvi sadalīt ekstraktos ietilpstošos savienojumus [30].

1.4.1. Oglūdeņražu maisījumu sadalīšana

Cietfāzes ekstrakcijas metodi izmanto, lai atdalītu piesātinātus ogļūdeņražus no nepiesātinātiem vai aromātiskus noalifātiskiem. Visbiežāk ogļūdeņražu frakcionēšanai kā eluentu izmanto heksānu. Aprakstītas dažādas metodes, kur kā sorbentu izmanto gan aktivētu un neaktivētu silikagēlu, gan alumīnijaoksīdu [31, 32]. Lai novērstu mijiedarbību ar alkēniem, tie tiek apstrādāti ar bromu, kas padara savienojumus polārākus un aiztur uz sorbenta. Aromātisku un alifātisku ogļūdeņražu maisījumu sadalīšanai izmanto silikagēlu un ar sudrabu modificētu silikagēlu [32]. Ar sudrabu modificētu silikagēlu pagatavo, pievienojot sudraba nitrāta šķīdumu iepriekš aktivizētam (400°C temperatūrā) silikagēlam. Pēcāk sudraba silikagēls tiek karsēts 75°C temperatūrā, lai atdalītu ūdeni [33]. Salīdzinot aktivētu silikagēlu un ar sudrabu modificētu silikagēlu, tika secināts, kaaktivētā silikagēla gadījumā alkēni netiek pilnīgi atdalīti un ietekmē gala rezultātu. Savukārt ar sudraba nitrātu apstrādāts silikagēla sorbents selektīvi aiztur nepiesātinātus ogļūdeņražus [32]. Oglūdeņražu attīrīšana no nepiesātinātiem savienojumiem ir iespējamaarī veicot oksidēšanu ar rutēnija tetraoksīdu (RuO₄). Šīs metodes pamatā ir rutēnija (VIII) oksīda reakcijaar ogļūdeņraža dubultsaiti. Šīs reakcijas rezultātā veidojas karbonskābes, kuras var tālāk atdalīt ar kolonnas hromatogrāfiju. Sazarotus ogļūdeņražus no nesazarotiem ir iespējams atdalīt izmantojot ceolīta molekulāros sietus [34].

1.4.2. Pārtikas eļļu un tauku frakcionēšana

Pārtikas tauki un eļļas ir kompleksi savienojumi, kuru sastāvā ietilpst triglicerīdi (90 – 95%), diglicerīdi (1 – 2%), brīvās taukskābes ($\approx 0.5\%$), fosfolipīdi un citi savienojumi. Visizplatītākā pārtikas eļļu un tauku frakcionēšana, izmantojot cietfāzes ekstrakcijas sorbentus, ir nepolāro (triglicerīdi) un vidēji polāro (oksidēšanās produkti) savienojumu atdalīšana. Visplašāk šādai frakcionēšanai kā cieto fāzi izmanto silikagēlu. Cepamo eļļu frakcionēšanai nepolāros un polāros savienojumos izmanto tādas eluentu sistēmas, kā heksāns – dietilēteris (92:8, v/v) un metanols, heksāns – dietilēteris (90:10, v/v) un dietilēteris vai heksāns – dietilēteris (90:10, v/v) un hloroforms – metanols (2:1, v/v) [35-37]. Visu šo metožu pamatā ir IUPAC ieteikta metode [38]. Taču šī metode ir laikietilpīga, lēna un patērē daudz šķīdinātāja. Cietfāzes ekstrakcijapadara metodi vienkāršāku un ātrāku, kā arī samazina izmantoto šķīdinātāju daudzumu. Tomēr cietfāzes ekstrakcijas silikagēla kārtidži ir grūti standartizējami, jo tie atšķiras ne tikai dažādu ražotāju starpā, bet arī vienas partijas robežās [39]. Iemesls tam ir ūdens saturs sorbentā, kas ļoti ietekmē tā efektivitāti. Tādēļ ir nepieciešams izžāvēt kārtidžu pirms analīzes vai izmantot šķīdinātājus ar kontrolējamu mitrumu [40]. 1992. gadā tika izstrādāta metode polāro savienojumu frakcionēšanai pārtikas eļļās, izmantojot aminopropilmodificēto silikagēla kārtidžu. Šis sorbents ir mazāk polārs nekā silikagēls un, mitruma ietekme uz lipīdu adsorbcijas kapacitāti nav tik spēcīga [35].

Lipīdu analīzēs liela nozīme ir sudraba jonus saturošu sorbentu izmantošanai hromatogrāfijā (plānslāņa vai kolonnas hromatogrāfijā), lipīdu savienojumus frakcionējot, atkarībā no nepiesātināto centru skaita, tipa un stāvokļa. Balstoties uz šīs metodes principiem, tika izstrādāta cietfāzes ekstrakcijas metode, kurā izmanto ar sudraba joniem modificētu benzolsulfonskābes sorbentu, lai atdalītu taukskābju metilesterus. Tā atbilstoši nepiesātinātības pakāpei, četrās frakcijās tika sadalīti triglicerīdi no sviesta, hidrolizēta ar lipāzi. Frakcionēšana tika veikta uz p-propilbenzol sulfonskābes cietfāzes ekstrakcijas kolonnas, kas bija modificēta ar sudraba joniem. Piesātinātie triglicerīdi tika eluēti ar 6 mL pentāna-dihlormetāna (50:50, v/v) maisījuma, monoēni ar 5 mL acetona-dihlormetāna (1:99, v/v) maisījuma, diēni ar acetona-dihlormetāna (5:95, v/v) maisījuma un triēni ar 5 mL acetona [41].

Diglicerīdu frakcionēšana. Diglicerīdi ir otrā lielākā savienojumu grupā pārtikas eļļās un taukos pēc triglicerīdiem. Tie veidojas kā starpprodukti triglicerīdu biosintēzē, kā arī skābās vai enzimatiskās triglicerīdu hidrolīzes rezultātā, kura notiek eļļu ekstrakcijas, pārstrādes un glabāšanas laikā. Tauku savienojumu atdalīšanai bioloģiskos paraugos ar cietfāzes ekstrakcijas metodi bieži izmanto aminofāzes kolonnu. Taču diglicerīdu frakcionēšanas rezultātā, izmantojot aminofāzes kārtidžu, tiek iegūts diglicerīdu maisījums, piesārņots ar triglicerīdiem. Salīdzinot dažādus cietfāzes ekstrakcijas sorbentus, tika secināts, ka aminofāzes sorbents visvairāk veicina

izomerizāciju. Savukārt, cietfāzes ekstrakcijai izmantojot diola fāzes un deaktivētā silikagēla kolonnu, novērotā izomerizācija ir niecīga. Diglicerīdu frakcionēšanu, izmantojot diola fāzes kārtidžu, veic, eluējot ekstraktu no sākumaar heksāna – metilēnhlorīda maisījumu, ar kuru eluējas lielākā daļa triglicerīdu, tad hloroforma – metanola (2:1, v/v) maisījumu [42].

Neskatoties uz to, kaaminofāzes kolonnas nevar būt izmantotas diglicerīdu atdalīšanai, tām ir savas priekšrocības citās analīzēs. Aminofāzes kolonnām piemīt spējas aizturēt skābus savienojumus, tādēļ tās kārtidžs tiek izmantotas terpēnskābes atdalīšanai noolīveļļas [43].

Vaski. Vaski veidojas spirtiem reaģējot ar taukskābēm. Tie ir atrodamī dažādā daudzumā pārtikas eļļās un taukos. Šiem savienojumiem ir liela molmasa, kas padara tos nešķīstošus ūdenī. Vaski tiek atdalīti, izmantojot silikagēla sorbentus, bet eluēšanai tetrahloroglekli, kurš eluē vaskus, atstājot pārējos olīveļļas komponentus uz sorbenta. Parauga šķīdumam pievienoarahidonskābes laurilesteri kā iekšējo standartu. Analizējamā frakcija satur arī citus mazsvarīgus savienojumus (ogļūdeņraži, brīvieesteri), taču tie neietekmē vasku kvantitatīvo saturu [44].

Steroli. Steroli ir neglicerīdo savienojumu grupa, kura ir atrodampārtikas eļļās un taukos nelielā daudzumā. Eļļu sastāvā ietilpst šādi steroli: α -holesterols, kampesterols, kampestanols, stigmasterols, Δ 7-kampesterols, klerosterols, sitostanols, Δ 5-24 stigmasterols, Δ 7-stigmasterols, Δ 7-avensterols un holesterols. Holesterols ir vissvarīgākais sterols, kas ietilpst dzīvnieku tauku sastāvā. Sterolu analīze ir nepieciešama, lai noteiktu viltojumus, piemēram, lai atšķirtu nerafinētoolīveļļu no lētākām eļļām [46]. Pēdējo laiku steroli tiek pētīti uzturvērtības un oksisterolu kvantitatīvās noteikšanas dēļ. Holesterolaoksidēšanās produkti tiek analizēti visvairāk, jo tie var būt bīstami veselībai [47].

Cietfāzes ekstrakcijas metode tiek izmantota gan brīvu un saliktu sterolu noteikšanai, gan kopējā sterolu daudzuma noteikšanai nepārziepjamā daļā, gan sterolu oksīdu atdalīšanai [48]. NH_4^+ fāzes kolonnas var izmantot sterolu, eritrodiola, uvaola un alkanolu frakcionēšanai noolīveļļas. Izvēlētajai fāzei piemīt īpašība saistīt atlikušās ziepes, kad pārziepjošanas process ir beidzies. Tādā veidā ir iespējams iegūt AEŠH(HPLC) vai GH(GC)analīzei piemērotu frakciju [49].

Sterolu oksīdu frakcijas iegūšanas metode sastāv no diviem posmiem: brīvu sterolu atdalīšanas uz Lipidex-500 kolonnas un sekojošas frakcionēšanas uz NH_2 kārtidža. Metodes atgūstamība, izmantojot šo sorbentu sistēmu, sasniedz 85-88%, atkarībā noatdalītiem savienojumiem [50]. Nesen tika izstrādāta fitosterolu oksidācijas produktu frakcionēšanas viensoļa metode. Pirms analīzes uz cietfāzes ekstrakcijas sorbenta (1 g silikagēla) uznes nātrija sulfātu, lai adsorbētu paraugaekstraktā palikušo ūdeni. Silikagēla kolonnu kondicionē ar 5 mL

heksāna. Paraugs no sākuma izšķīdināts heksāna – dietilētera maisījumā un uzests uz iepriekš sagatavota sorbenta. Kolonna tiek skalota ar 15 un 10 mL heksāna – dietilētera (9:1 un 1:1, v/vattiecīgi) maisījuma, lai atbrīvotos no visiem nevajadzīgiem savienojumiem. Fitosterolu oksidācijas produktu frakciju iegūst, eluējot ar 10 mL acetona. Analizējamai frakcijai pievieno 5 α -holestānu kā iekšējo standartu gāzes hromatogrāfijai. Metodes atgūstamība ir 88 – 96%. Autori uzsvēra, ka 1 g silikagēla cietfāzes ekstrakcijas sorbenta var izmantot līdz 1 g dažādu eļļu paraugu frakcionēšanai [51].

Silikagēla sorbents tiek izmantots, lai noteiktu esterificētā un brīvā holesterola daudzumu cūku taukos. Parauga šķīdums tiek uzests uz silikagēla kolonnas, kura iepriekš kondicionēta ar heksānu. Holesterolaesteru frakcijas iegūšanai, kolonna tiek skalota ar heksāna-etilacetāta (92:8, v/v) maisījuma. Vēl divas frakcijas iegūtas, veicot eluēšanu ar 4 mL heksāna-etilacetāta (90:10, v/v) maisījuma un 8 mL heksāna-etilacetāta (80:20, v/v) maisījuma. Abas frakcijas satur brīvu holesterolu. Esterificētā holesterola frakcija tiek pārziēpota, un visas frakcijas kvantificētas ar GC. Metodes atgūstamībapārsniedz 90% [52].

Fosfolipīdi. Fosfolipīdi ir dabīgas virsmaktīvās vielas un emulgatori, kuri sastāv no spirta (piemēram, glicerola), vienas vai divām taukskābes molekulām un fosforskābes atlikuma. Tie ir atrodami visos augos un dzīvniekos. Fosfolipīdu kvantitatīvā analīze ir nepieciešamapārtikas eļļu pārstrādes procesa novērtēšanai, kā arī nerafinētoeļļu kvalitātes kontrolei [53]. Fosfolipīdu koncentrācija dārzeņu eļļā ir samērā zema, tādēļ ir nepieciešams sakoncentrēt tos pirms HPLC analīzes. Tas ir iespējams ar tradicionālo kolonnas hromatogrāfijas metodi vai ar cietfāzes ekstrakcijas metodi. Fosfolipīdu frakcionēšanai neapstrādātā sojas eļļā tiek izmantota silīcijskābes kolonna [54].

SPE-HPLC (SPE-AEŠH) metodetika izstrādāta saulespuķu eļļas fosfolipīdu frakcionēšanai un kvantificēšanai, izmantojot diola fāzes kārtidžu. Kolonna tiek kondicionēta ar 2 mL metanola, 2 mL hloroforma un 4 mL heksāna. No sākuma kolonu eluē ar hloroformu, lai atbrīvotos no triglicerīdiem. Fosfolipīdi tiek iegūti, eluējot ar metanolu, kas satur amonjaka šķīdumu [55].

Sekundārie hidrofobie metabolīti. Hidroksi- un hidroperoksitaukskābes, sterolu oksīdi, cikliskie monomēri, oksidētie triglicerīdu monomēri, dimēri un polimēri ir modificētie savienojumi, kuri veidojas pārtikas eļļās un taukos dažādu procesu ietekmē. Šiem savienojumiem ir liela nozīme dzīvnieku un cilvēku veselībā. Specifisku taukskābju oksidēšanās produktu analīzei tika izstrādātaprecīza un jutīga GC-MS (GH-MS) kvantitatīvā metode, izmantojot SPE kā priekšpēdējo soli, lai sakoncentrētu oksidēšanās produktus. No sākuma lipīdu paraugs, kas satur hidroperoksi- un hidroksiskābes, tiek hidrogenēts, lai iegūtu stabilus piesātinātus hidroksilipīdus. Tad paraugs tiek pārziēpots un metilēts. Metoksitaukskābju metilesteri tiek attīrīti un

sakoncentrēti, izmantojot silikagēla kolonnu, kuru iepriekš kondicionē ar 5 mL heksāna-etilacetāta (98:2, v/v) maisījuma. Monohidroksitaukskābju metilesteru frakcija tiek atdalīta no skābekli nesaturošajiem taukskābju metilesteriem, eluējot ar heksāna-etilacetāta (95:5, v/v) maisījumu. Monohidroksitaukskābju metilesteru frakcija tiek iegūta, paaugstinot eluentu polaritāti [56].

Fenoli. Fenoli ir svarīga dabīgās izcelsmes savienojumu grupu, kura ir atrodama neapstrādātās eļļās, pārsvarā nerafinētā olīveļļā. Nerafinētās olīveļļas pētījumi parādīja, ka eļļas kvalitāte ir atkarīga no kopējā fenolu savienojumu daudzuma un kvalitātes. Turklāt tikapierādīts, ka olīveļļu rūgtā garša veidojas pateicoties vairākiem fenoliem. Pēdējā dekādē tika izstrādātas specifiskas metodikas fenolu savienojumu noteikšanai. Šīs metodes ietver AEŠH(HPLC)analīzi ar UV detekciju (280 un 225 nm) pēc cietfāzes ekstrakcijas. 1989. un 1992. gadā tika publicētas cietfāzes ekstrakcijas metodikas, izmantojot C₁₈ kolonnas [57, 58]. Autori izmantoja heksānu, lai atdalītu napolāru frakciju, un ūdens-metanola (30:70, v/v) maisījumu, lai eluētu fenolu savienojumus, aizturētus uz sorbenta. Citās metodēs fenolu frakcijas iegūšanai tiek izmantots tīrs metanols [59].

Fenolu frakcijas iegūšanai tiek izmantots arī C₈ silikagēla sorbents. Šajā metodē, lai attīrītu paraugu no nopolāriem savienojumiem, tiek izmantots heksāna-cikloheksāna (50:50, v/v) maisījums. Fenolu frakcija tiek iegūta, eluējot ar acetonitrilu [60].

Fenolu frakcionēšanai tika izmēģināts jauns ar karbonskābi modificēts sorbents. Tā efektivitāte tika salīdzināta ar silikagēla kolonnu un C₁₈ sorbentiem. Šis sorbents ir piemērots plaša fenolu savienojumu klāsta atdalīšanai dažādās koncentrācijās. Materiāls ir stabils pie visām pH vērtībām, tāpēc ir iespējams veikt cietfāzes ekstrakciju pie pazeminātā pH. Vissvarīgākā šī sorbentapriekšrocība ir tāda, ka to iespējams izmantot vismaz 30 reizes bez efektivitātes samazināšanas [61].

1.4.3. Lipīdu savienojumu frakcionēšana no bioloģiskiem paraugiem: audiem un šķidrumiem

Lipīdu savienojumu noteikšanai bioloģiskos paraugos (piemēram, plazmā) ir liela nozīme kardiovaskulāro slimību norises izpētē. Paaugstināts holesterola līmenis var izraisīt sirds un asinsvadu slimības. Tādēļ šo savienojumu noteikšanas apstākļu izstrādāšanai un optimizēšanai tiek pievērsta liela uzmanība [46].

Neitrālu un polāru lipīdu atdalīšana. Viena nopirmajām un svarīgākajām bioloģiskoparaugu frakcionēšanas metodēm ar cietfāzes ekstrakcijas sorbentiem tika izstrādāta

1985. gadā. Cietfāzes ekstrakcija tika veikta žurkas sirds lipīdu paraugam, izmantojot silikagēla kolonnu. No sākuma, ar 20 mL hloroforma tiek eluēti neitrāli lipīdi. Polāru lipīdu frakcija tiek iegūta, izmantojot 20 mL metanola. Salīdzinot ar kolonnas hromatogrāfijas metodi, kuru sākotnēji izmantoja lipīdu atdalīšanai, cietfāzes ekstrakcijas metode ir ātrāka un vieglāka, kā arī sorbentu kārtridžus var izmantot atkārtoti 5 - 6 reizes [62].

Pirmā metode lipīdu frakcionēšanai uz aminopropilmodificētā silikagēla sorbenta tika aprakstīta 1985. gadā. Šī metode vēl joprojām kalpo par pamatu jauniem lipīdu pētījumiem. Metode apraksta sešu frakciju iegūšanu: holesterola, holesterolaesteru, triglicerīdu, monoglicerīdu, taukskābju un fosfolipīdu. Kā redzams 1. tabulā, frakcionēšanai izmanto septiņus dažādus eluentus. Cietfāzes ekstrakcija tika veikta lipīdu ekstraktam no vēršāaudiem [30].

1.1.tabula

Neitrālu un polāru lipīdu atdalīšanai izmantotie eluenti un izdalāmās savienojumu grupas [30]

Eluents	Atdalāmo savienojumu klase
Hloroforms : izopropanols (2:1, v/v)	Visi neitrālie lipīdi
2% etiķskābe dietilēterī	Fosfolipīdi
Metanols	Visi polāri lipīdi
Heksāns	Holesterolaesteri
1% dietilēteris un 10% metilēnhlorīds heksānā	Triglicerīdi
5% etilacetāts heksānā	Holesterols
15% etilacetāts heksānā	Diglicerīdi
Hloroforms : metanols (2:1, v/v)	Monoglicerīdi

Veicot mikroorganismu kultūras lipīdu frakcionēšanu ar augstāk aprakstīto metodi, ne visi polāri lipīdi tika izdalīti no sorbenta ar šiem eluentiem. Tādēļ šī metode tika optimizēta polāru lipīdu pilnīgai atdalīšanai. Lipīdu paraugs tiek uzņemts uz aminopropilmodificētas silikagēla kolonnas, kondicionētas ar heksānu. Napolāru lipīdu frakciju iegūst, eluējot ar 4 mL hloroforma – izopropanola maisījuma. Lai atdalītu brīvas taukskābes, kolonna tiek eluēta ar 8 mL dietilētera – etiķskābes (98:2, v/v) maisījuma. Fosfolipīdu frakcionēšanai, kolonnu eluē ar metanolu [63]. Citos pētījumos papildus tika veikta skābu fosfolipīdu eluēšana ar heksāna – izopropanola –

etanola - 0.1 M amonijaacetāta – skudrskābes (420:350:100:50:0.5, v/v/v/v/v) maisījumu ūdenī ar 5% fosforskābes. Atdalīšanas efektivitāte ir atkarīga noanalizējamoaudu dabas [64].

Specifisku savienojumu frakcionēšana

Taukskābes un tooksidēšanās produkti. Visizplatītākā C₂₀-polinepiesātinātā taukskābevarākumā zīdītāju ir arahidonskābe, C_{20:4}ω₆ (5,8,11,14-cis-eikozāntetraēnskābe) [65]. Balstoties uz Kaluzny et al. [30] izstrādāto metodi, tikaatdalītaarahidonskābe noaudu lipīdiem. Triglicerīdu un diglicerīdu, un taukskābju frakcijas iegūtas, eluējot ar 4 mL hloroforma – izopropanola (2:1, v/v) maisījuma un 3 mL 2% etiķskābes dietilēterī, attiecīgi. Šajā darbā tika salīdzinātas standartapolipropilēna kolonnas un stikla kolonnas. Autori iesaka izmantot stikla kolonnas, jo tās ievērojami samazināpiesārņojumu daudzumu [66].

Malondialdehīds (MDA) ir polepiesātinātu taukskābju oksidatīvās sadalīšanas galaprodukts. Tas ir galvenais lipīdu peroksidācijas intensitātes rādītājs. Visbiežāk šo savienojumu nosaka nevis brīvā formā, bet kā malodialdehīda un 2-tiobarbituskābes (TBA) kondensācijas produktu (MDA-TBA). Tika izstrādāta AEŠH(HPLC) metode, kurā MDA-TBA tiek atdalīts no traucējošiem savienojumiem ar C₁₈ silikagēla kolonnu [67, 68]. Pirms AEŠH(HPLC)analīzes ir nepieciešama MDA-TBAekstrakcija, lai pasargātu kolonnu no bojāšanās. Šim nolūkam izmanto cietfāzes ekstrakcijas metodi uz C₁₈ silikagēla kolonnas. Analizējamais savienojums tiek eluēts ar metanolu. Šo metodi izmanto MDA noteikšanais asins plazmā, trombocītos un eritrocītos [69].

Taukskābju etil- un metilesteri. Taukskābju etilesteri (TEE) ir etanola un taukskābju esterifikācijas produkti. Pētījumi parādīja, ka TEE un TEE sintetāzeatrodas pārsvarā orgānos, kuri ir bojāti pārmērīgas alkohola lietošanas dēļ. TEE izmanto kā etanola lietošanas indikātoru. TEE savienojumu attīrīšanai tika izstrādāta divsoļu cietfāzes ekstrakcijas metodear atgūstamību 70±3%. Metodes pirmajā posmā lipīdu maisījums tiek uzneests uz aminopropilmodificētā silikagēla kolonnas un vienlaicīgi eluēts ar heksānu. Šī frakcija satur TEE savienojumus un holesterolaesterus. Ja ir nepieciešams atdalīt TEE no holesterolaesteriem, izmantooktadecilsilikagēla kolonnu un izopropanola – ūdens (5:1, v/v) maisījumu eluēšanai [70].

Taukskābjumetilesteru (TME) atdalīšanai no monohidroksi-taukskābju esteriem izmanto silikagēla kolonnu kondicionētu ar heksāna-etilacetāta (98:2, v/v) maisījumu. TME savienojumufrakcionēšanai kolonna tiek eluētaar heksāna – etilacetāta (95:5, v/v) maisījumu, bet piemaisījumi tiek atdalīti ar heksāna – etilacetāta (80:20, v/v) maisījumu. Kolonnu ir iespējams atkārtoti izmantot, apstrādājot toar 100% etilacetātu un atbrīvojoties no šķīdinātāja inertā atmosfērā. Šī metode ir ļoti jutīga un analīzei ir nepieciešami mazi paraugu daudzumi [56].

1.4.4. Policiklisku aromātisku savienojumu frakcionēšana

Policikliskie aromātiskie savienojumi (PAS) ir organiskie savienojumi, kuri sastāv no diviem vai vairāk kondensētiem benzola cikliem un dažādām funkcionālām grupām. Piepolicikliskiem aromātiskiem savienojumiem pieder tāda savienojumu klase kā policikliskie aromātiskie ogļūdeņraži (PAO). PAO ir policikliskie aromātiskie savienojumi, kuri sastāv tikai no ogļūdeņraža un ūdeņraža. Šie savienojumi ir vieni no bīstamākajiem dabas piesārņotājiem, to mutagēnās un kancerogēnās aktivitātes dēļ. Turklāt PAO ir plaši izplatīti, jo var nokļūt vidē gan no dabīgiem, gan no antropogēniem avotiem [71].

PAO savienojumiem piemīt zema šķīdība, kas var novest pie adsorbcijas problēmām parauga ņemšanas un glabāšanas laikā. Lai palielinātu šķīdību, paraugam pievieno organisku šķīdinātāju (piemēram, metanolu, acetonitrilu, izopropanolu) vai virsmaktīvās vielas [72,73]. Pētījumi parādīja, ka PAO savienojumu precīzai noteikšanai, tie ir jāsadala divās grupās, atkarībā no to molekulārās masas. Savienojumiem ar zemu molmasu ir jāpievieno 15% acetonitrils, bet ar lielu molmasu – 20% izopropanols [74]. Tika izpētīta arī virsmaktīvo vielu ietekme uz PAO šķīdību. Micellārā ūdens šķīdumapievienošana samazina PAO savienojumu zudumus parauga glabāšanas laikā, kā arī palielina analīzes atgūstamību, atdalot to no ūdens uz C₁₈ kolonnas. Taču līdzīgus rezultātus var panākt arī, pievienojot 40% (v/v) acetonitrilu ūdens paraugā [75].

PAO savienojumu cietfāzes ekstrakcijai visbiežāk izmanto C₁₈ silikagēla sorbentu [76-78]. Salīdzinot ciano-, fenil- un C₁₈ modificētos silikagēla sorbentus, vislabākie rezultāti tika iegūti izmantojot C₁₈ kolonnu. Gaistošām vielām atgūstamības vērtība svārstījās no 70 līdz 100%, bet savienojumiem ar lielu molmasu – no 50 līdz 65% [76]. Visbiežāk sorbenta izvēle cietfāzes ekstrakcijai ir atkarīga no izejvielu dabas. Tā, piemēram, augsnes ekstrakta PAO savienojumu frakcionēšanai izmanto silikagēlu, kondicionētu ar heksānu, bet no austeru audiem šo savienojumu atdalīšana ir pilnīgāka ar alumīnija oksīdu un aktivizētu silīcijskābi [79, 80]. Cietfāzes ekstrakcijas sorbenta izvēli nosaka arī izvēlētajā hromatogrāfijas metode PAO savienojumu identifikācijai. Pētot PAO ezeru nogulumos, tika secināts, ka silikagēla un C₁₈ kolonnas ir piemērotas cietfāzes ekstrakcijai pirms AEŠH(HPLC) analīzes ar fluorescences detekciju, taču ar GH-MS(GC-MS) metodi labāki rezultāti tika iegūti, pirms tam veicot frakcionēšanu ar alumīnija oksīda kolonnu ar aktivizētu silīcijskābi [81].

PAO eluēšanai izmanto tādus organiskus šķīdinātājus kā acetonitrils, tetrahidrofurāns, metanols, izopropanols, acetons, heksāns, dihlormetāns, kā arī to maisījumi [72, 76-78, 82-84]. PAO atgūstamība ar mazu molmasu ir augstāka ar negaistošiem šķīdinātājiem, bet PAO ar 4-6 aromātiskiem gredzeniem - ar nepolāriem šķīdinātājiem [85]. Bieži lai panāktu visu PAO savienojumu pilnīgu eluēšanu, izmanto šķīdinātāju maisījumus [84]. Pētījumā par PAO

dzeramajā ūdenī, tika salīdzināti divi cietfāzes ekstrakcijas eluenti: dihlormetāns un acetnitrils. Veicot PAOatdalīšanu ar dihlormetānu, tika iegūti labāki rezultāti [76]. Savukārt, salīdzinot dihlormetānu, acetonu un acetona – tetrahidrofurāna (1:1, v/v) maisījumu kā elentus 16 svarīgākoPAO piesārņotāju atdalīšanai, labāki rezultāti tika iegūti ar acetona un tetrahidrofurāna maisījumu [84].

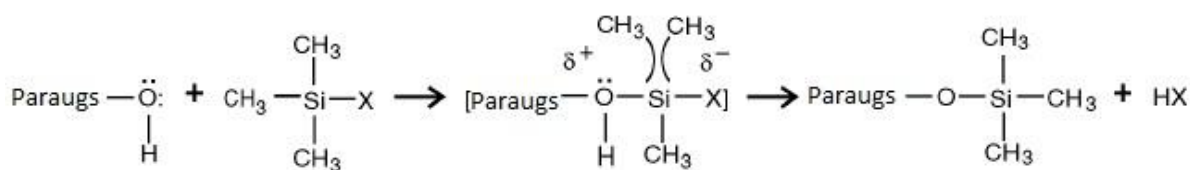
Tika izpētīta arī temperatūras ietekme uz PAO cietfāzes ekstrakciju. Augsta temperatūrapalielina šķīdinātāja stiprumu, samazinaaiztures faktoru un tilpumu, tādā veidā uzlabojot stipri piesaistītu vielu atgūstamību. Pētījumi parādīja, ka naftalīna, fluorēna, antracēna un fluorentēnaatdalīšana ir efektīvāka 50°C temperatūrā [82].

1.5. Gāzes hromatogrāfija

Hromatogrāfija ir maisījuma sadalīšanas process, kurā savienojumu maisījums tiek sadalīts starp divām fāzēm: stacionāro ar lielu virsmas laukumu un mobilo, kas plūst caur stacionāro fāzi. Paraugs tiek iztvaicēts un pārvietots ar mobilo fāzi (nesējgāze) pa kolonnu. Tie maisījuma savienojumi, kuri šķīst šķīdrajā fāzē dotajā temperatūrā, tiek aizturēti, bet tie, kas nešķīst tiek aiznesti tālāk ar nesējgāzi. Atkarībā no relatīvā tvaiku spiediena un līdzības ar stacionāro fāzi, maisījuma komponenti tiek atdalīti viens no otra [86].

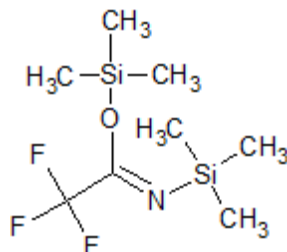
Viens no veiksmīgas gāzes hromatogrāfijas analīzes nosacījumiem ir analizējamā savienojuma gaistamība. Taču lielākā daļa dabas paraugu sastāvā ietilpstošo savienojumu ir pārāk polāri un negaistoši. Viens no risinājumiem šai problēmai ir derivatizācijas veikšana. Derivatizācija ir polāro savienojumu ķīmiskās modifikācijas process, kura rezultātā veidojas mazāk polārie savienojumi [87].

Derivatizācijas metode tiek iedalīta galvenokārt sililēšanā, acilēšanā un alkilēšanā. Par acilēšanas reaģentiem izmanto perfluorskābju anhidrīdus un halogenīdus un perfluoroacilimidazolus. Neitrālā vidē derivatizācijai tiek lietots *N*-metil-bis(trifluoroacetamīds). Alkilēšanas reaģenti aizvieto ūdeņradi ar alkilgrupu karbonskābēs un fenola savienojumos. Piemēram, dimetilformamīds-dialkilacetāls tiek izmantots karbonskābju un aromātisko skābju pārveidošanai metilesteros. Sililēšanas metodē funkcionālās grupas ūdeņradis tiek aizvietots ar trimetilsililgrupu (1.5.attēls).



1.5. att. Sililatvasinājuma veidošanās reakcijas mehānisms [88]

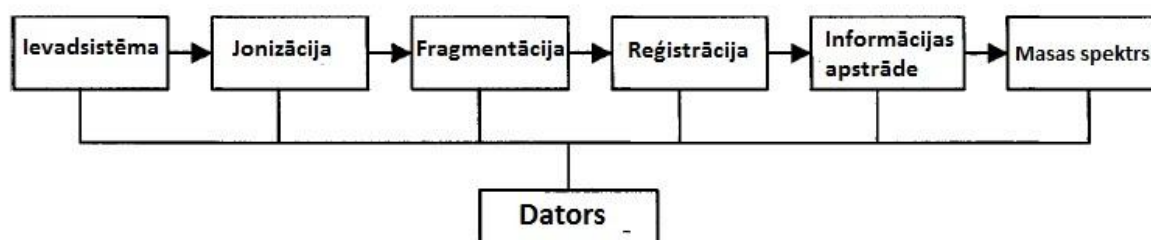
Sililēšanai izmanto tādus reaģentu, kā N,O-bis(trimetilsilil)acetamīds (BSA), N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoracetamīds (BSTFA) (1.6.attēls), dimetildihlorsilāns (DMDCS), N-trimetilsililimidazols (TMSI), u.c. [89]. Taču vispopulārākais sililatvasinājumu veidojošais reaģents ir BSTFA, jo tas reaģē ne tikai ar spirtiem, bet arī ar skābēm un amīniem [34].



1.6. att. Sililatvasinājumu veidojošāģenta N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoracetamīda (BSTFA) struktūrformula [88]

1.6. Masspektrometrijas pamatprincipi

Masspektrometrija ir fizikāli ķīmiskā analīzes metode, kuras pamatā ir jonizācijas procesā analizējamās vielas molekulas pārveidošana jonizētā formā, sekojoša fragmentācija un izveidojušos pozitīvu vai negatīvu jonu reģistrācija (skat. 1.7. att.). Savienojumu masas spektrs ļauj izdarīt secinājumus par tā molekulāro masu, sastāvu un struktūru. Masas spektri tiek attēloti grafiskā vai tabulas veidā. Grafiskā veida gadījumā, uz abscisu ass tiek atliktas jonu masas un lādiņaattiecības, uz ordinātu ass –signāla relatīvā intensitāte, t.i. to intensitāteattiecībā pret pamatlīniju (intensīvākā līnija masas spektrā).



1.7. att. Masas spektra iegūšanas shēma [90]

Mūsdienās savienojumu identifikācija ir iespējama, salīdzinot iegūto masas spektru ar spektru, kas atrodams datubāzē. Masspektrometriskaorganisku savienojumu fragmentācija ir pakļauta noteiktiem likumiem, tādēļ analizējamā savienojuma molekulāro masu, sastāvu, funkcionālās grupas un pat precīzu struktūru, ir iespējams noteiktbez datubāzes palīdzības,

balstoties uz fragmentācijas raksturu. Radniecisku savienojumu fragmentācijas mehānismi ir līdzīgi, kas palīdz pareizi interpretēt spektru. Masspektrometrijas metode ir visjūtīgākāanalīzeorganisku savienojumu kvantitatīvai noteikšanai [90].

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1 Izmantotās iekārtas un reaģenti

Iekārtas:

- Svari, analītiskie, *KERN ALJ 220* – 4 m_{Max}=220 g, (±0,1 mg),
- Žāvskapis, *Gallenkamp Plus II Oven* (T_{max}=300°C)
- Gāzes hromatogrāfs – masspektrometrs, *Clarus 680/ Clarus SQ8* aprīkots ar kapilāro kolonnu *Elite-5ms* (95% dimetilpolisilokskāns),
- Ultraskaņas vanna, *ColeParmer*, Sērijas Nr. ESD060386825 (100 W),
- Magnētiskais maisītājs, *Jenway 1000*, Sērijas Nr.36388,
- Rotācijas ietvaicētājs, *Heidolph Hei-VAP Advantage*,
- Kratītājs, *PSU-200* (135 rpm),
- Elektriskā plītiņa, *Heidolph MR Hei-Standard*,
- Cietfāzes ekstrakcijas iekārta, *Alltech*,
- Dzirnaviņas, *Aurum*,
- C18 (oktadecilsilikagēls) ekstrakcijas stikla kolonna, *Alltech*,
- SPE-NH₂ (aminopropilsilikagēls) ekstrakcijas kolonna, *Chromabond* (500 mg, 3 mL, kapacitāte 100 mg).

Reaģenti

- N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamīds (BSTFA) , *Fluka*
- Progesterons, analītiski tīrs, *Sigma-Aldrich*
- Palmitīnskābes metilesteris, analītiski tīrs, *Sigma-Aldrich*
- Hloroforms, tīrība 99,8%, *Lab-Scan*
- Heksāns, tīrība 95%, *Lab-Scan*
- Amonjaks, 25-29%, analītiski tīrs, *SIAEnola*
- Dietilēteris tīrība 99,7%, *Penta*
- Ledus etiķskābe, analītiski tīrs, *SIAEnola*
- Acetonitrils, tīrība 99,93%, *Sigma-Aldrich*
- Silikagēls 60Å, analītiski tīrs, *Sigma-Aldrich*
- Slāpekļis, tīrība 4.0, *AGA*
- Hēlijs, tīrība 5.0, *AGA*

Trauki

- Mērpipetes, 1 mL, 2 mL, 10 mL;
- Mikropipetes, 100 µL, 500µL;
- Merkolbas, B klase 50 mL, 100 mL;
- Mērcilindri;
- Vārglāzes.

2.2. Analizējamo briofītu raksturojums un ievākšanas apstākļi

Bakalaura darba ietvaros analīzes veica divām Latvijā sastopamajām lapu sūnu sugām - parastais dzegužlins (*Polytrichum commune*) un viļņainā divzobe (*Dicranum polysetum*) (3.1. att.). Parastā dzeguzlina raksturīgā augšanas apstākļi ir mitri skujkoku meži, bet viļņainā divzobeparasti aug jauktu un skuju koku mežu pārpurvotās vietās.



1

2

3.1.att. Analīzei izmantotie briofīti: 1 -*Polytrichum commune*, 2 – *Dicranum polysetum* [91, 92]

Paraugus ievāca 3 dažādās vietās Latvijā – lapkoku mežā Kurzemē, Kabiles tuvumā, priežu mežā pie Sudas purva, mežā pie Cenaspagasta. Briofītu paraugus ievāca 2013. gadapavasara/vasaras/rudens sezonā. Ievāca tikai svaigus un nebojātus briofītu dzinumus, lai novērstu augu sadalīšanās rezultātā veidoto metabolītu ietekmi. Šim nolūkam analīzēm ņēma auga augšējo daļu, kas attīstījusies konkrētā sezonā.

Augu ķīmisko sastāvu ietekmē tā vecums un saskare ar dažādiem stresa faktoriem (sausums, aukstums, UV stari, mehāniskie bojājumi, piesārņojošas vielas). Stresa apstākļos palielinās augā sintezētais peroksīdāzes daudzums, kas veicina daudzu polifenolu un lipīdu oksidēšanos [23, 93]. Tādēļ, lai varētu objektīvi novērtēt briofītu sugas ķīmisko sastāvu, paraugi netika ievākti ilgstošos sausuma periodos, kā arī briofītu ekstrakta ieguve netika

veiktatemperatūrā, kas pārsniedz +40°C, lai izvairītos nopolifenolu sadalīšanos un citu viegli gaistošu savienojumu iztvaikošanas.

Augus manuāli attīrīja no skujām, zemes un citu briofītu piemaisījumiem. Atdalījaaugu zaļo daļu, aptuveni 2-5 cm noaugšējās daļas un žāvēja istabas temperatūrā 2-7 dienas atkarībā no mitrumapakāpes. Līdz analizēmatīrītus briofītu uzglabāja-20°C temperatūrā.

2.3. Briofītu ekstraktu sagatavošana

Attīrītus briofītu paraugus žāvēja40°C temperatūrā žāvskapī*Gallenkamp Plus II Oven* līdz konstantai masai un sasmalcināja dzirnaviņās *Aurum*. Aizskrūvējamā stikla traukā pārnesa 1 g sasmalcinātu briofītaparauga un pievienoja 40 mL hloroforma. Ekstraktus 20 minūtes apstrādājaar ultraskaņu ultraskaņas vannā *ColeParmer* un kratīja 24 stundas kratītājā *PSU-200*. Pēc tam ekstraktus atkārtoti 20 minūtes apstrādājaar ultraskaņuultraskaņas vannā. Iegūtos ekstraktus ietvaicēja rotācijas ietvaicētājā*Heidolph Hei-VAP Advantage*<50°C temperatūrā. Līdz analizēm briofītu ekstraktus uzglabāja saldētavā pie -20°C temperatūras noslēgtās stiklapudelītēs.

2.4. Silikagēlaadsorbcijas kapacitātes noteikšana

Silikagēlaadsorbcijas izoterma uzņemšana. Adsorbcijas izoterma uzņemšanai astoņās 50 mL vārglāzēs iemērījaar pipetiattiecīgi 0,03 mL, 0,29 mL, 0,43 mL, 0,57 mL, 0,71 mL, 0,86 mL, 1 mL, 1,14 mL briofītaekstraktaar masas koncentrāciju $\gamma=0,035$ g/mL, atšķaidījaar 20 mL hloroforma. Ar spektrofotometru *Shimadzu UV-1800* - izmērīja iegūto šķīdumu gaismas absorbcijas pie $\lambda=280\text{nm}$ 1 cm kivetē pret tukšoparaugu. Rezultāti (A_1)apkopoti 2.1.tabulā.

2.1.tabula

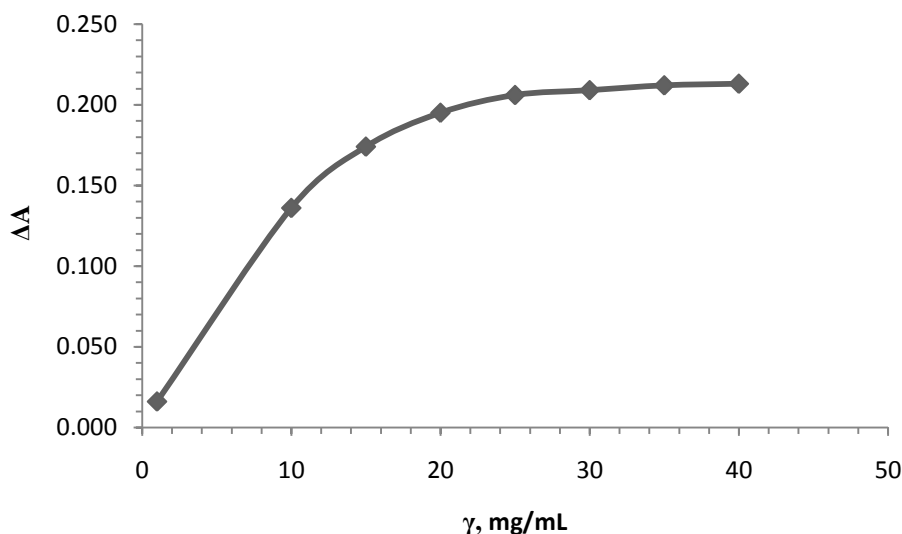
Gaismas absorbcijas atkarība no sausnes daudzuma ($\gamma, \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) briofītu ekstraktā

Nr.p.k.	Briofītaekstrakta masas koncentrācija γ , $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Sākumaabsorbciija A_1	Beigu absorbcija A_2	Absorbciiju starpība ΔA
1.	1	0,043	0,059	0,016
2.	10	0,363	0,499	0,136
3.	15	0,639	0,813	0,174
4.	20	0,911	1,106	0,195

Nr.p.k.	Briofīta ekstrakta masas koncentrācija γ , $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Sākuma absorbcija A_1	Beigu absorbcija A_2	Absorbciju starpība ΔA
5.	25	1,146	1,352	0,206
6.	30	1,443	1,652	0,209
7.	35	1,624	1,836	0,212
8.	40	1,685	1,898	0,213

Pirms cietfāzes ekstrakcijas silikagēlu aktivizēja, karsējot 6 stundas 150°C temperatūrā. 50 mL vārglāzē iesvēra 1,5 g iepriekš aktivētā silikagēla, pievienoja hloroformu un samaisīja, lai veidotos suspensija. Pagatavoto suspensiju pārnesa stikla kolonnā. Iepriekš sagatavotus paraugus uznesa uz kondicionētā sorbenta un kolonnu skaloja ar 15 mL hloroforma. Iegūtos eluātus atšķaidīja ar hloroformu līdz 20 mL un izmērīja absorbciju pie 280 nm, izmantojot 1 cm kvarca kivetes. Rezultāti (A_2) apkopoti 2.1. tabulā.

Silikagēla adsorbcijas kapacitāti noteic pēc grafika (skat. 2.1.att.), kur uz x ass ir hloroforma ekstrakta masas koncentrācija un uz y ass ir sākuma un beigu absorbciju starpība.



2.1.att. Silikagēla sorbenta adsorbcijas izoterma

2.5. Briofītu hloroforma ekstrakta frakcionēšana

Briofītu ekstrakta pakāpeniskai frakcionēšanai izmantoja silikagēlu un aminopropilmodificēto silikagēlu. Divas eluentu sistēmas tika izmantotas kā šķidrā fāze (skat. 2.2.tabulā). Katrai sistēmai tika izvēlēti dažādas polaritātes eluenti.

Analizēm izmantoto eluentu sistēmu sastāvs

Nr.p.k.	Sistēma №1	Sistēma №2
1.	Heksāns	Heksāns
2.	Heksāns/hloroforms 5:1	Hloroforms
3.	Hloroforms	3% amonjaka šķīdums metanolā
4.	Dietilēteris/ledus etiķskābe 98:2	

Šķīdumu gatavošana:

- **heksāna un hloroforma maisījums attiecībās 5:1:** 50 mL vārglāzē pārnesa 41,70 mL heksāna un 8,30 mL hloroforma un samaisīja;
- **dietilētera un ledus etiķskābes maisījums attiecībās 98:2:** 50 mL vārglāzē pārnesa 49 mL dietilētera un 1 mL ledus etiķskābes un samaisīja;
- **3% amonjaka šķīdums metanolā:** 50 mL vārglāzē pārnesa 6 mL 25% amonjaka un 44 mL metanola.

2.5.1. Briofītu ekstrakta cietfāzes ekstrakcija ar eluentu sistēmu №1

Briofītu ekstraktvielu cietfāzes ekstrakcija ar silikagēla sorbentu. Termoizturīgā stikla vārglāzē pārnesa briofītu hloroforma ekstraktu, tā, lai sausnes daudzums būtu 20 mg. Hloroformu ietvaicēja 60°C temperatūrā uz elektriskās plītiņas *Heidolph MR Hei-Standard* un sauso atlikumu šķīdināja 0,5 mL heksāna. Pilnīgai parauga izšķīšanai, šķīdumu 5 minūtes apstrādāja ar ultraskaņu ultraskaņas vannā. Cietfāzes ekstrakciju atkārtoja trīs reizes.

Pirms frakcionēšanas silikagēla sorbentu aktivizēja, karsējot 6 stundas 150°C temperatūrā. 50 mL vārglāzē iesvēra 1,5 g iepriekš aktivētā silikagēla, pievienoja heksānu un samaisīja. Pagatavoto suspensiju pārnesa stiklakolonnā (12x1,5 cm). Iepriekš sagatavotu paraugu uznesa uz kondicionētā sorbenta un eluēja ar ātrumu 1 mL/min pēc kārtas ar 8 mL heksāna, heksāna un hloroforma maisījuma attiecībās 5:1, hloroforma, ētera un etiķskābes maisījuma attiecībās 98:2. Frakcijas savāca 10 mL mēģenēs un veica apstrādi gāzes hromatogrāfijas-masspektrometrijas analīzei.

Briofītu ekstraktvielu cietfāzes ekstrakcija ar SPE-NH₂ sorbentu. Briofītu ekstrakta frakcionēšanai izmantoja SPE-NH₂ kolonnu ar sorbenta kapacitāti 100 mg [94]. Termoizturīgā stikla vārglāzē pārnesa briofītu hloroformaekstraktu, tā, lai sausnes daudzums būtu 80 mg (75 – 90% no sorbenta kapacitātes). Hloroformu ietvaicēja 60°C un sauso atlikumu izšķīdināja 2 mL heksāna. Pilnīgai parauga izšķīšanai, šķīdumu 5 minūtes apstrādāja ar ultraskaņu ultraskaņas vannā. Iepriekš sagatavotu paraugu uznesa uz kondicionētas kolonnas un eluēja ar eluentu sistēmu №1.

2.5.2. Briofītu ekstrakta cietfāzes ekstrakcija ar eluentu sistēmu №2

Briofītu ekstraktvielu cietfāzes ekstrakcija ar silikagēla sorbentu. Termoizturīgā stikla vārglāzē pārnesa hloroformaekstraktu, tā, lai sausnes daudzums būtu 20 mg. Hloroformu ietvaicēja 60°C uz elektriskās plītiņas un pievienoja 2 mL hloroforma. Pilnīgai parauga izšķīšanai, šķīdumu 5 minūtes apstrādāja ar ultraskaņu ultraskaņas vannā. Cietfāzes ekstrakciju atkārtoja trīs reizes.

Pirms frakcionēšanas silikagēla sorbentu aktivizēja, karsējot 6 stundas 150°C temperatūrā. 50 mL vārglāzē iesvēra 1,5 g iepriekš aktivētā silikagēla, pievienoja heksānu un samaisīja. Pagatavoto suspensiju pārnesa stikla kolonnā (12x1,5 cm). Iepriekš sagatavotu paraugu uznesa uz kondicionētas kolonnas un eluēja ar ātrumu 1 mL/min pēc kārtas ar 9 mL heksāna, hloroforma, 3% amonjaka šķīduma metanolā. Frakcijas savāca 10 mL mēģenēs un veica apstrādi gāzes hromatogrāfijas-masspektrometrijas analīzēm.

Briofītu ekstraktvielu cietfāzes ekstrakcija ar SPE-NH₂ kolonnu. Termoizturīgā stikla vārglāzē pārnesa briofītu hloroformaekstraktu, tā, lai sausnes daudzums būtu 80 mg (75 – 90% no sorbenta kapacitātes). Hloroformu ietvaicēja un sausajam atlikumam pievienoja 2 mL hloroforma. Pilnīgai parauga izšķīšanai, šķīdumu 5 minūtes apstrādāja ar ultraskaņu ultraskaņas vannā. Iepriekš sagatavotu paraugu uznesa uz kondicionētas kolonnas un veica cietfāzes ekstrakciju tāpat kā ar silikagēla kolonnu.

2.6. Briofītu ekstraktvielu gāzes hromatogrāfijas - masspektrometrijas analīze

Cietfāzes ekstrakcijas gaitā iegūto frakciju sagatavošana analīzei ar gāzes hromatogrāfiju. Cietfāzes ekstrakcijas gaitā iegūtās frakcijas ietvaicēja līdz sausam slāpekļaplūsmā. Pēc tam tās izturēja eksikatorā 24 stundas, lai nodrošinātu ekstraktu sausumu.

Sausiem paraugiem pievienoja 1,1 mL acetnitrila unapstrādāja 3 minūtes ar ultraskaņu ultraskaņas vannā. Šķīdumiem pievienoja 75 µL derivatizējošā aģenta – BSTFA un 1 stundu karsēja 60°C temperatūrā [95]. Pēc karsēšanas ekstraktiem pievienoja 0,5 mL progesterona un heptadekānskābes metilestera šķīduma acetnitrilā ($\gamma = 100 \text{ mg/L}$) kā iekšējo standartu.

Šķīdumu gatavošana:

- **progesterona un heptadekānskābes metilestera šķīdums ar koncentrāciju 100 mg/L:** 100 mL mērkolbā kvantitatīvi pārnesa 0,0100 g progesterona un 0,0100 g heptadekānskābes metilestera, šķīdināja acetnitrilā un mērkolbu uzpildīja līdz atzīmei.

Briofītu ekstrakta apstrādātajām frakcijām veica gāzes hromatogrāfiju - masspektrometriju. Gāzes hromatogrāfijas analīzes apstākļi apkopoti 2.3. tabulā.

2.3. tabula

Darbā izmantotā hromatogrāfiskās analīzes aparatūra un analīzes apstākļi

Gāzu hromatogrāfs-masspektrometrs <i>Clarus 680 – Clarus SQ 8 C (PerkinElmer)</i>	
Kolonna un tās parametri	Elite-5ms (95% dimetilpolisiloksāns); 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Darba temperatūras intervāls no 60° līdz 350°C.
Termostats	Temperatūras programma: 75°C (iztur 2 min.); 130°C ar ātrumu 20°C·min ⁻¹ ; 320°C ar ātrumu 4°C·min ⁻¹ ; 320°C (iztur 12 min.).
Nesējgāze	Helijs (tīrība 5.0); plūsmas dalījums ievades sistēmā 4:1. Nesējgāzes plūsmas programmētais ātrums: 2,0 mL·min ⁻¹ (iztur 0,5 min); 1,0 mL·min ⁻¹ .
Injektors	Temperatūra 290°C; ievade automātiska, analīzes tilpums 1,0 µl; šļirces skalošana ar acetnitrilu vai heksānu.
Detektors	Masselektīvais detektors ar kvadrupolu tipa analizatoru; elektronu triecienu jonizācija; elektronu enerģija 70 eV; jonu avota temperatūra: 280°C; vadules temperatūra: 250°C; jonu m/z intervāls: 42-550; uztveršanas laiks sākot no 3. min. (1,7 sek.); jonu pavairotais: 1700V.
Analīzes laiks	59.25 minūtes

Analīzes rezultātā iegūtie dati tika nolasīti un apstrādāti ar *GC/MS Turbo mass* datorprogrammas palīdzību. Integrēšana tika veikta 20-90 intensīvākajiem hromatogrammas joslām. Šiem signāliem tika iegūts masspektrs, kurš tika identificēts izmantotjot *NIST MS search*

2.0 datu bāzi. Savienojumu daudzums ekstraktā tika noteiktsar iekšējo standartu pēc vienādojuma (2.1.vienādojums):

$$\gamma_{sav} = \frac{S_{sav} \cdot \gamma_{st}}{S_{st}}, \quad (2.1.)$$

kur γ_{sav} – analizējamā savienojuma masas koncentrācijaekstraktā, mg/L;

S_{sav} – analizējamā savienojumapīķa laukums;

γ_{st} – standarta vielas masas koncentrācijaekstraktā, mg/L;

S_{st} – standarta vielas pīķa laukums.

Tālāk tikaaprēķināta savienojuma koncentrācija sauso briofītu masā, izmantojot 2.2. vienādojumu:

$$c_{sav} = \frac{\gamma_{sav} \cdot V_{an} \cdot V_{ekstr}}{V_{cfe} \cdot m_{briof}} \cdot 10^3, \quad (2.2.)$$

kur γ_{sav} – analizējamā savienojuma masas koncentrācijaekstraktā, mg/L;

V_{an} – analizējamā parauga tilpums, L;

c_{sav} – analizējamā savienojuma koncentrācija, $\mu\text{g/g}$;

V_{ekstr} – briofītu ekstrakta kopējais tilpums, L;

V_{cfe} – cietfāzes ekstrakcijā izmantotais briofītu ekstrakts tilpums, L;

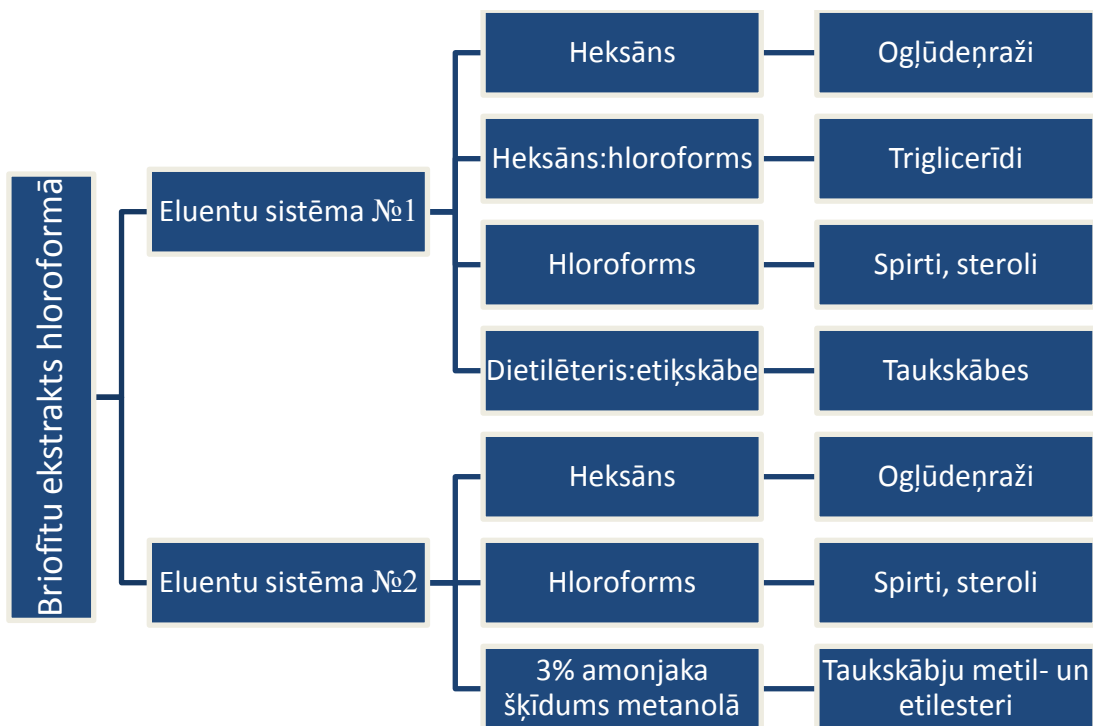
m_{briof} – sausu briofītu masa, g.

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Bakalaura darba ietvaros tika pētīta cietfāzes ekstrakcijas pielietojamība *Polytrichum commune* (PC) un *Dicranum polysetum* (DP) ekstraktos esošo savienojumu frakcionēšanai. Briofītu ķīmisko sastāvu veido dažādu organisko savienojumu klašu pārstāvji. Svarīgākie no tiem ir sekundārie metabolīti – taukskābes un to esteri, steroli, ogļūdeņraži [14]. Cietfāzes ekstrakcijai izmantotā sorbenta izvēli nosaka analīta polaritāte. Visbiežāk briofītos esošie savienojumi tiek ekstrahēti nepolārā šķīdinātājā, piemēram, hlōroformā, kas izraisa nepieciešamību polārā stacionārā fāzē. Lipīdu un citu hidrofobo savienojumu frakcionēšanai visbiežāk izmanto silikagēlu un aminopropilsilikagēlu [30, 62]. Polārās silanola grupas silikagēlā adsorbē polārus savienojumus un to eluēšana ir atkarīga no šķīdinātāja polaritātes. Kas attiecas uz aminopropilsilikagēlu, pirmējā amīna grupa viedo ūdeņraža saiti ar molekulu funkcionālām grupām, piemēram, hidroksilgrupu. Kā arī aminogrupai piemīt vājas jonu aizvietotāja īpašības un reaģējot ar skābēm, veidojas sāļi.

Pētījumi parādīja, ka monoacilglicerīdu, diacilglicerīdu, triacilglicerīdu un taukskābju frakcionēšana ir pilnīgāka ar aminopropilmodificēto silikagēlu [96]. Savukārt taukskābju esteru un ogļūdeņražu frakcionēšanai piemērotāks ir aktivēts un neaktivēts silikagēls [32, 56]. Šajā darbā tiek salīdzināti divi sorbenti briofītu ekstrakta frakcionēšanai - aminopropilmodificētais silikagēls un aktivētais silikagēls.

Analizējamo savienojumu frakcionēšanai tika izstrādātas divas metodes ar dažādām eluentu sistēmām. Izmantotie eluenti un atdalāmo savienojumu saraksts ir redzams 3.1. attēlā. Abās metodēs pirmā frakcija tiek iegūta, izmantojot heksānu. Šajā frakcijā tiek atdalīti visi alkāni [32, 33]. Tālāk eluentu polaritāte tiek pakāpeniski paaugstināta, lai panāktu savienojumu frakcionēšanu ar dažādu polaritāti. Taukskābes tiek eluētas ar dietilētera un etiķskābes maisījumu, bet taukskābju esteri ar 3% amonija šķīdumu metanolā [63, 66].



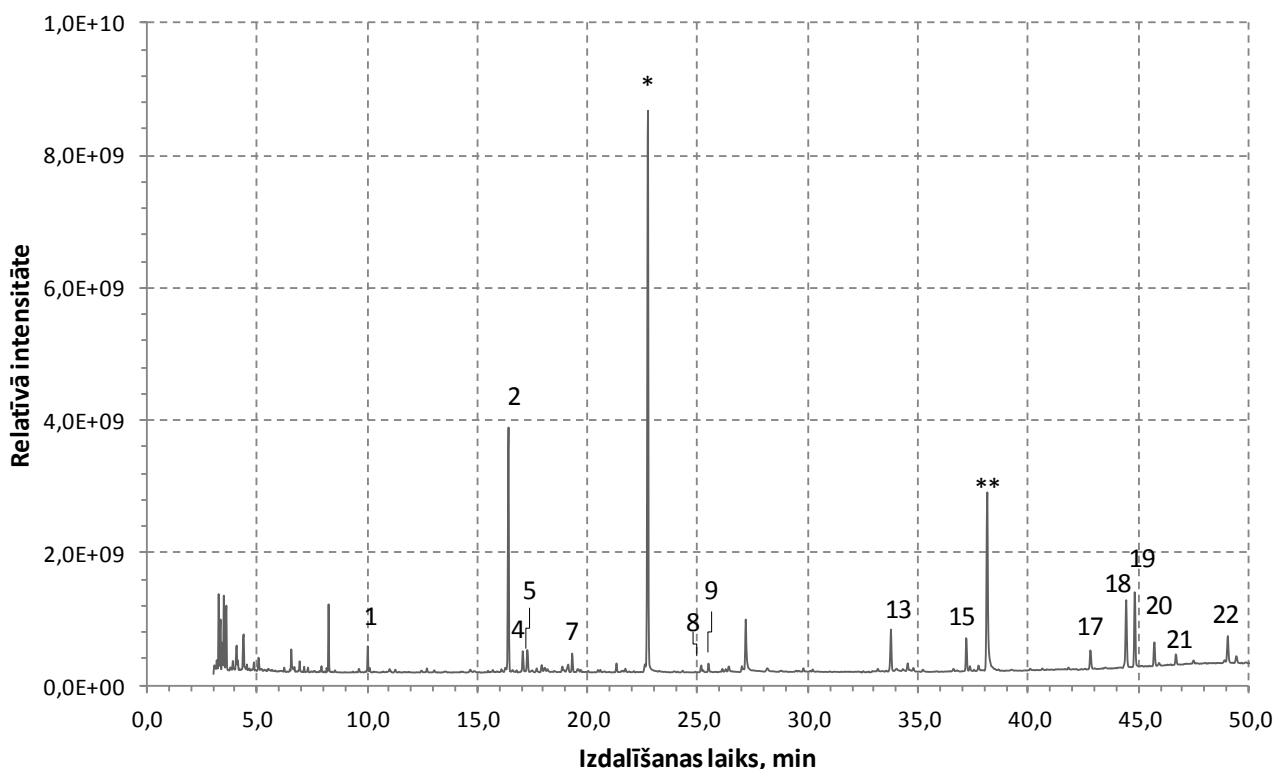
3.1.att. Cietfāzes ekstrakcijai izmantotie eluanti un atdalāmie savienojumi

3.1. Briofītu ekstraktu analīze

Briofītu ekstraktu analīzi veica izmantojot gāzes hromatogrāfiju-masspektrometriju. Savienojumu kvantitatīvai noteikšanai, paraugiem pievienoja divus iekšējos standartus – heptadekānskābes metilesteri un progesteronu. Šo savienojumu struktūra visvairāk atbilst briofītu sastāvā esošo savienojumu struktūrai, kā arī tie netika identificēti briofītu ekstraktos pirms tam un nevarētu ietekmēt rezultātus.

Polārus savienojumus apstrādāja ar derivatizējošo aģentu - *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamīdu (BSTFA). Šīs reakcijas rezultātā savienojumu funkcionālo grupu protoni tiek aizvietoti ar trimetilsilil- grupu, veidojot trimetilsililēterus un esterus [95].

DP briofīta ekstrakta hromatogramma ir redzama 3.2.attēlā. Tajā identificēja 15 savienojumus, no kuriem lielākā daļa ir steroli. To masas koncentrācija sausa briofītaparaugā ir robežās no 75,8 (cikloartenols) – 525,8 (stigmasterols) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. PC ekstraktā no steroliem ir atrodami kampesterols, stigmasterols un β -sitosterols, kuru daudzums mainās no 192,6 - 463,5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu.



3.2.att. *Dicranum polysetum* ekstrakta hromatogramma pirms frakcionēšanas. Signāls, kas apzīmēts ar * atbilst heptadekānskābes metilesterim un ar ** - progesteronam, kurus lieto kā iekšējos standartus. (Signālu numerācija atbilst 3.1.tabulā esošajai savienojumu numerācijai)

Pētāmajos briofītos identificēja tādus ogļhidrātus, kā D-tagatofuranoze, D-fruktofuranoze, D-fruktopiranoze, D-fruktoze, D-galaktoze, α -D-metilfruktofuranozīds. Vislielākais saturs DP sūnās ir D-tagatofuranozei – $542,8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga, bet PC sūnās - α -D-metilfruktofuranozīdam ($239,0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga). DP ekstraktā ir atrodami spirti ar garu ogļūdeņražu virkni - oktadekanols un fītols, kas tiek klasificēts kā izoprenoīda spirts. PC briofītu ekstraktā identificēja četras taukskābes ar oglekļa atomu skaitu no 19 - 22, divas no kurām ir nepiesātinātās. Vislielākā daudzumā ir atrodama oleīnskābe ($58,1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga), savukārt dokožānskābes koncentrācija ir vismazākā ($13,7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga). Lielā daudzumā PC briofītu sugas ekstraktā ir triterpēns skvalēns – $235,0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga (skat. 3.1.tabula).

Polytrichum commune un *Dicranum polysetum* ekstraktos identificētie savienojumi (savienojumu numerācija atbilst 3.2.attēlā esošajai signālu numerācijai)

Nr.	Izdalīšanas laiks, min	Savienojums	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās $\gamma, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
1	10,0	Ābolskābe	350, 147, 73	52,6	57,3
2	16,4	D-Tagatofuranoze	319, 97, 69	-	542,8
3	16,5	α -D-Metilfruktofuranozīds	379, 217	239,0	-
4	17,1	D-Fruktofuranoze	319, 127, 69	18,7	45,7
5	17,3	D-Fruktoze	437, 204	-	47,2
6	17,3	D-Fruktopiranoze	437, 204, 147	17,4	-
7	19,1	D-Galaktoze	217, 204,	-	16,1
8	25,2	Oktadekanols	482, 467	-	14,9
9	25,5	Fitols	368, 143	-	19,1
10	26,3	Linolskābe	382, 67	34,1	-
11	26,5	Oleīnskābe	354, 117	58,1	-
12	27,1	Stearīnskābe	356, 117	26,6	-
13	33,8	Palmitīnskābes β -monoglicerīds	371, 57, 43	177,6	92,8
14	34,7	Dokozānskābe	412, 397, 132	13,7	-
15	37,2	Stearīnskābes α -monoglicerīds	502, 399, 57	97,8	72,8
16	37,8	Skvalēns	410, 69	235,0	-
17	42,8	α -Tokoferols	502, 237	102,8	133,4
18	44,5	Kampesterols	192, 160	463,5	481,9
19	44,8	Stigmasterols	484, 83	480,9	525,8
20	45,7	β -Sitosterols	396, 43	192,6	166,8
21	46,7	Cikloartenols	496, 69	-	75,8
22	49,1	Fitola acetāts	123, 68, 43	-	192,4

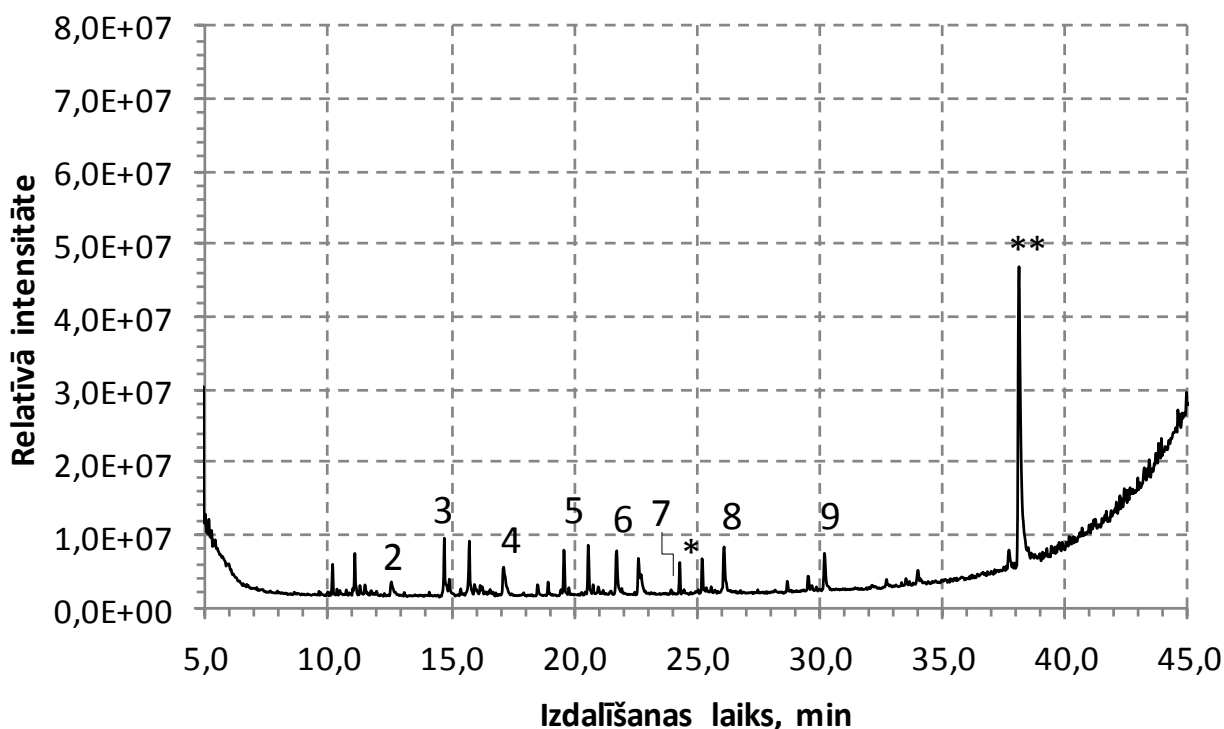
Abu briofītu ekstraktos identificēja palmitīnskābes β -monoglicerīdu un stearīnskābes α -monoglicerīdu. Lielākā daudzumā šie savienojumi ir PC sūnās – 177,6 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga un 97,8 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga, attiecīgi.

3.2. Briofītu ekstraktvielu frakcionēšana ar eluentu sistēmu №1

Briofītu ekstraktiem veica cietfāzes ekstrakciju ar silikagēla un aminopropilmodificētā silikagēla sorbentiem, eluējot pēc kārtas ar heksānu, heksāna un hloroforma maisījumu, hloroformu, dietilētera un etiķskābes maisījumu. Pirms cietfāzes ekstrakcijas briofītu ekstraktu ietvaicēja un šķīdināja heksānā.

3.2.1. Heksāna frakcija №1

Heksāna frakcijā, cietajai fāzes izmantojot silikagēlu, atdalīja nesazarotus piesātinātus alkānus ar oglekļa atomu skaitu no 14 līdz 24, izņemot pentadekānu (skat.3.3.att.). DP sūnu frakcijā neidentificēja tetradekānu, bet alkānu C₁₉ ($28 \pm 3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga) un C₂₂ ($29 \pm 4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga) masas koncentrācija ir lielāka nekā PC sūnās (28 ± 3 un $29 \pm 4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu, attiecīgi) (skat. 3.2. tabula). Šajā frakcijā eluēto alkānu daudzums mainās no 5 ± 1 (C₂₁) līdz 51 ± 14 (C₂₂) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu PC sūnu un no 3 ± 1 (C₂₁) līdz 37 ± 9 (C₁₇) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu DP sūnu.



3.3.att. *Dicranum polysetum* ekstrakta heksāna frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja silikagēlu). Signāls, kas apzīmēts ar * atbilst heptadekānskābes metilesterim un ar ** - progesteronam, kurus lieto kā iekšējos standartus. (Signālu numerācija atbilst 3.2.tabulā esošajai savienojumu numerācijai)

Heksāna frakcijā identificētie savienojumi (n=3). Alkāniem norādīta m/z vērtība molekulārajam jonam(savienojumu numerācija atbilst 3.3.attēlā esošajai signālu numerācijai)

Eluents	Sorbents	Nr	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Heksāns	Silikagēls	1	Tetradekāns	8,7	198	13±2	-
		2	Heksadekāns	12,6	226	7±1	9±2
		3	Heptadekāns	14,7	240	51±14	37±9
		4	Oktadekāns	17,1	254	25±8	18±4
		5	Nonadekāns	19,6	268	19±6	28±3
		6	Eikozāns	21,7	282	32±7	27±6
		7	Heneikozāns	24,0	296	5±1	3±1
		8	Dokozāns	26,1	310	17±3	29±4
		9	Tetrakozāns	30,2	338	40±11	22±8

Briofītu ekstraktus eluējot ar heksānu uz aminopropilmodificēto silikagēlu, atdalīja alkānus ar 14 – 23 oglekļa atomu skaitu, izņemot C₁₅ (skat.3.3.tabula). Kopumā šo savienojumu daudzums heksāna frakcijā ir palielinājies. Tā, PC sūnās atdalīto alkānu daudzums svārstās no 63±12 (C₁₅) līdz 215±37 (C₁₆) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu, bet DP – no 86±5 (C₁₅) līdz 191±50 (C₁₆) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu. Šī frakcija lielā daudzumā satur arī α -tokoferolu un sterolus – kampesterols, stigmasterols, β -sitosterols. Kampesterola saturs šajā frakcijā ir vislielākais abu sūnu paraugos - 1125±46 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu PC sūnu un 1295±34 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu DP sūnu.

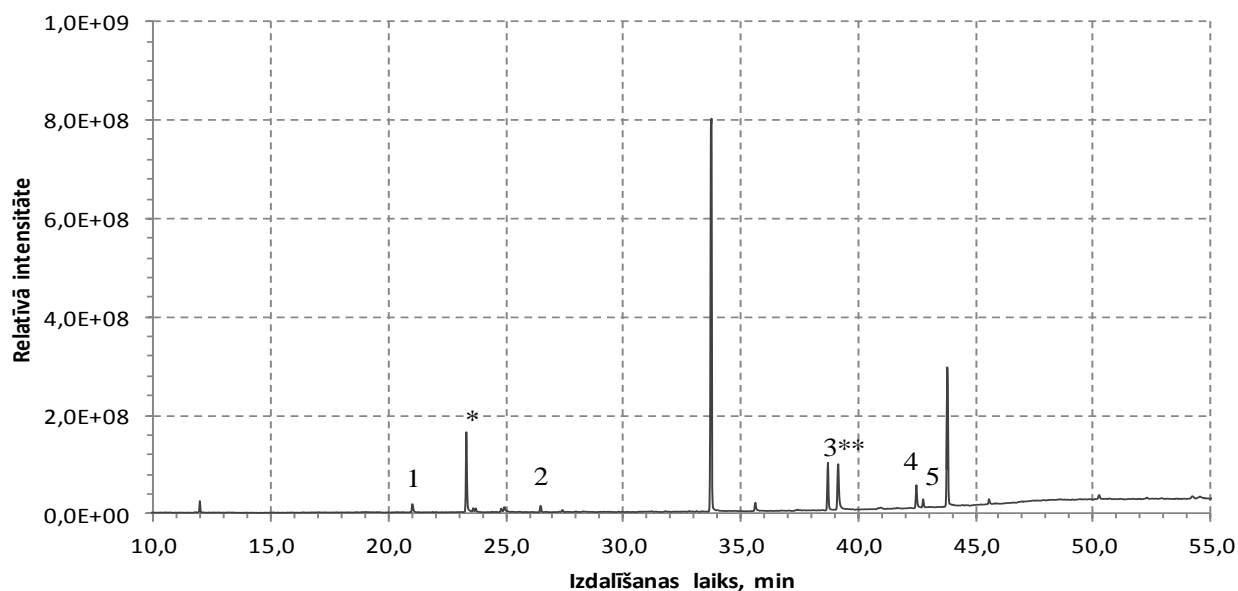
Heksāna frakcijā identificētie savienojumi (n=3). Alkāniem norādīta m/z vērtība molekulārajam jonam

Eluents	Sorbents	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Heksāns	SPE-NH ₂	Tetradekāns	8,5	198	63±12	86±5
		Heksadekāns	15,2	226	215±37	191±50
		Heptadekāns	16,0	240	126±18	145±15
		Oktadekāns	17,1	254	188±22	171±28
		Nonadekāns	18,7	268	161±17	145±10

Eluents	Sorbents	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Heksāns	SPE-NH ₂	Eikozāns	20,3	282	139±24	131±20
		Heneikozāns	23,1	296	78±4	94±9
		Dokozāns	24,7	310	124±9	103±11
		Trikozāns	27,7	324	29±8	47±4
		α -Tokoferols	35,4	502, 237	230±65	214±95
		Kampesterols	36,4	192, 160	1125±46	1295±34
		Stigmasterols	36,7	484, 83	1119±103	1293±124
		β -Sitosterols	37,3	396, 43	267±39	373±81

3.2.2. Heksāna un hlороформа frakcija

PC un DP ekstraktus, apstrādājot ar heksāna un hlороформа eluentu uz silikagēla sorbenta, atdalīja tādus savienojumus kā palmitīnskābes metilesteris, skvalēns, fītols, α - un γ -tokoferols (skat. 3.4.att.). Šo savienojumu daudzumi ir nelieli.



3.4.att. *Polytrichum commune* ekstrakta heksāna un hlороформа frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja silikagēlu). Signāls, kas apzīmēts ar * atbilst heptadekānskābes metilesterim un ar ** - progesteronam, kurus lieto kā iekšējos standartus. (Signālu numerācija atbilst 3.4.tabulā esošajai savienojumu numerācijai)

Vislielākā masas koncentrācija sausrē abu briofītu paraugos ir α -tokoferolam. Tā koncentrācija PC sūnās ir $243 \pm 45 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu, bet DP briofītā - $237 \pm 24 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu (skat. 3.4.tabula).

3.4.tabula

Heksāna un hloroforma frakcijā identificētie savienojumi(n=3)(savienojumu numerācija atbilst

3.4.att. esošajai signālu numerācijai)

Eluents	Sorbents	Nr	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Heksāns: Hloroforms	Silikagēls	1	Palmitīnskābes metilesteris	21,0	270, 87	8 ± 2	3 ± 1
		2	Fitols	26,5	368, 143	$6,3 \pm 0,1$	11 ± 3
		3	Skvalēns	38,7	410, 69	46 ± 13	32 ± 7
		4	γ -Tokoferols	42,5	488, 223	31 ± 9	59 ± 12
		5	α -Tokoferols	43,8	502, 237	243 ± 45	255 ± 26
	SPE-NH ₂	4	Palmitīnskābes metilesteris	21,7	270, 87	81 ± 15	73 ± 9
		5	γ -Tokoferols	42,5	488, 223	5 ± 1	14 ± 3
		6	α -Tokoferols	43,8	502, 237	213 ± 38	237 ± 24

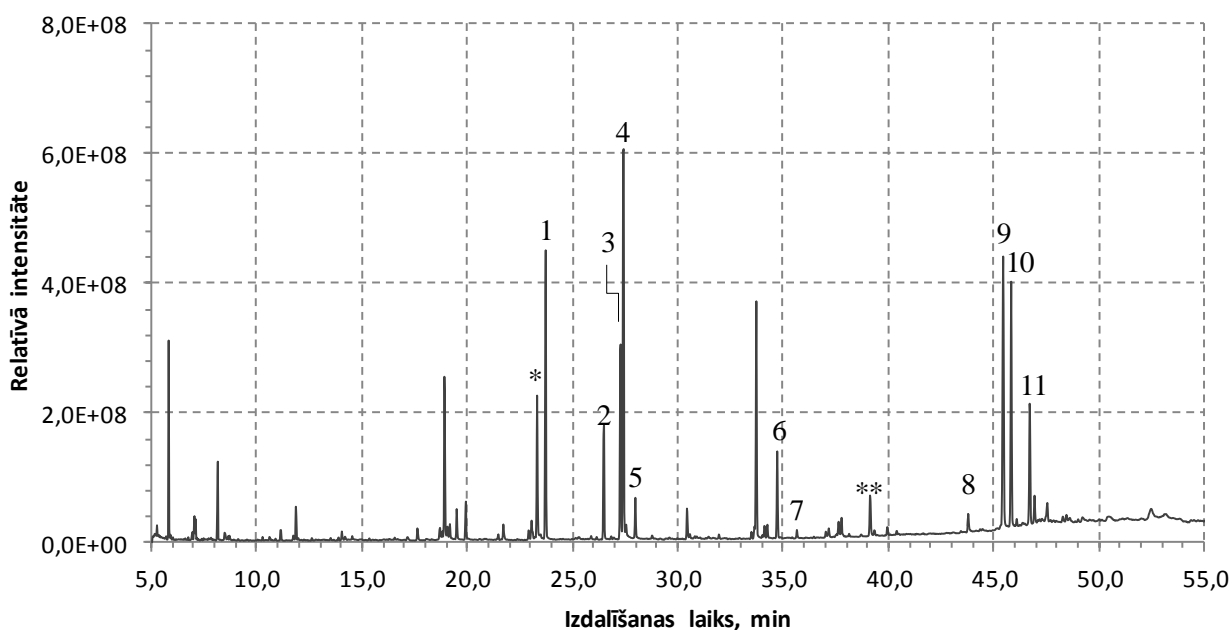
Briofītu ekstraktus eluējot ar heksāna un hloroforma maisījumu uz aminopropilmodificētā silikagēla, izdevās atdalīt tikai trīs savienojumus: palmitīnskābes metilesteri, α - un γ -tokoferolu. Palmitīnskābes metilestera koncentrācija šajā frakcijā ir lielāka ($81 \pm 15 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu PC sūnu un $73 \pm 9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu DP sūnu) nekā ar silikagēlu iegūtajā frakcijā. Tokoferolu atdalītais daudzums ir mazāks nekā izmantojot silikagēlu.

3.2.3. Hloroforma frakcija №1

PC un DP ekstraktus eluējot ar tīru hloroformu uz silikagēla kolonnas, atdalīja daudz dažādus savienojumus. Šī frakcija satur piesātinātās un nepiesātinātās taukskābes ar oglekļu atomu skaitu no 16 – 22 (skat. 3.5.att.) Dominējošā taukskābe abu briofītu hloroforma frakcijā ir α -linolēnskābe. Tās daudzums PC sūnās ir $220 \pm 35 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga, savukārt DP sūnās - $236 \pm 47 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga. Dokožānskābes koncentrācija ir vismazākā PC hloroforma

frakcijā un DP frakcijā tāds savienojums netika identificēts. Nelielā daudzumā šī frakcija satur palmitīnskābes β -monoglicerīds un fitolu.

Vēl viena savienojumu klase, kura tiek eluēta hloroforma frakcijā, ir steroli. Visizplatītākie steroli briofītos ir kampesterols, stigmasterols un sitosterols. Šo savienojumu masas koncentrācijas augstāk minētajā frakcijā ir $555 \pm 63 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu, $500 \pm 59 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu un $236 \pm 38 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu PC sūnu, attiecīgi (483 ± 51 , 439 ± 22 un $225 \pm 34 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu DP sūnu, attiecīgi).



3.5.att. *Polytrichum commune* ekstrakta hloroforma frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja silikagēlu). Signāls, kas apzīmēts ar * atbilst heptadekānskābes metilesterim un ar ** - progesteronam, kurus lieto kā iekšējos standartus. (Signālu numerācija atbilst 3.5.tabulā esošajai savienojumu numerācijai)

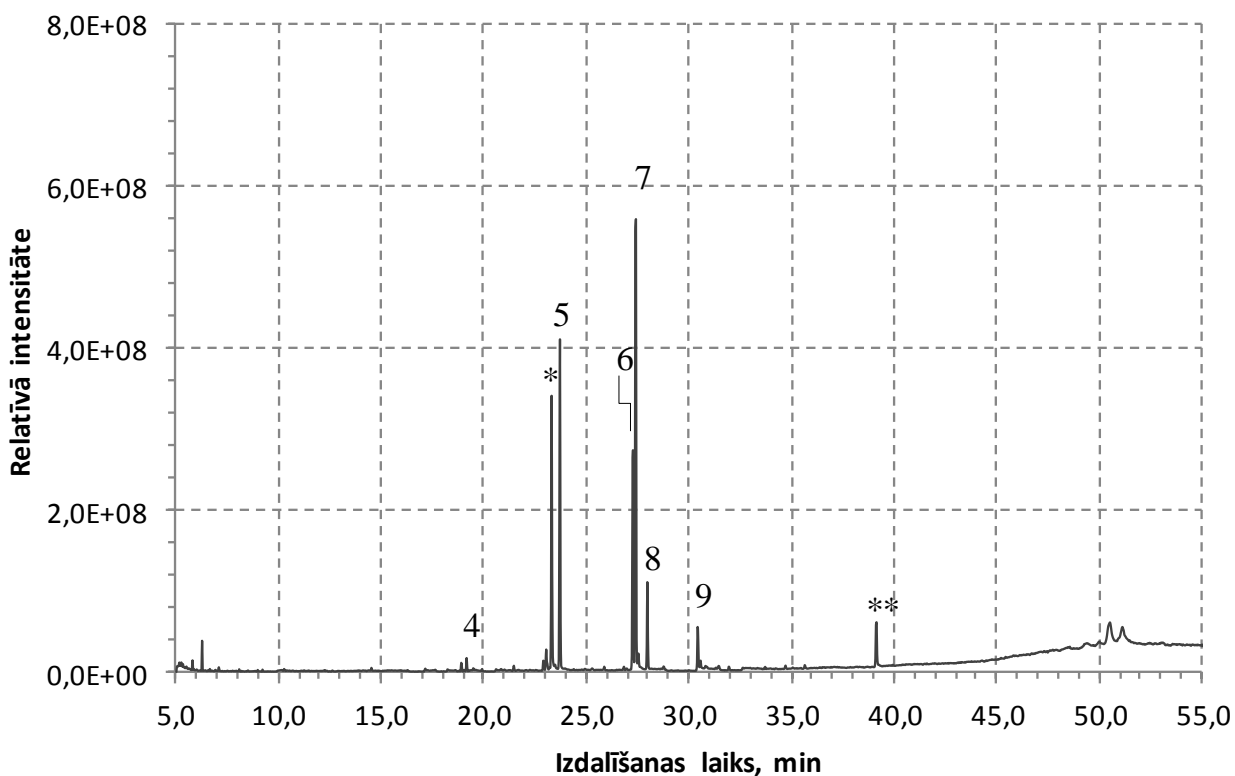
Briofītu ekstraktu eluējot ar hloroformu uz aminopropilmodificētā silikagēla, atdalīto savienojumu skaits ir ievērojami mazāks nekā uz silikagēla. Taču dotā frakcija satur lielāku daudzumu kampesterola un stigmasterola, bet palmitīnskābes β -monoglicerīds un β -sitosterola koncentrācija ir zemāka (skat. 3.5.tabula).

Hloroforma frakcijā identificētie savienojumi(n=3)(savienojumu numerācija atbilst 3.5.att. esošajai signālu numerācijai)

Eluents	Sorbents	Nr	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Hloroforms	Silikagēls	1	Palmitīnskābe	23,7	328, 313, 117	163±28	119±18
		2	Fitols	26,5	368, 143	64±12	70±21
		3	Linolskābe	27,3	382, 67	106±37	132±30
		4	α -Linolēnskābe	27,4	350, 79	220±35	236±47
		5	Oktadekānskābe	28,0	356, 341, 117	23±4	15±2
		6	Palmitīnskābes β -monoglicerīds	34,7	371, 43	49±9	36±5
		7	Dokozānskābe	35,7	412, 397, 117	4±1	-
		8	α -Tokoferols	43,8	502, 237	35±11	54±19
		9	Kampesterols	45,5	192, 160	555±63	483±51
		10	Stigmasterols	45,8	484, 83	500±59	439±22
		11	β -Sitosterols	46,7	396, 43	236±38	225±34
	SPE-NH ₂	1	Palmitīnskābes β -monoglicerīds	34,7	371, 43	34±11	21±6
		2	Kampesterols	45,5	192, 160	656±24	704±37
		3	Stigmasterols	45,8	484, 83	708±56	689±45
		4	β -Sitosterols	46,7	396, 43	296±39	271±21

3.2.4. Dietilētera un etiķskābes frakcija

Dietilētera un etiķskābes frakcija satur pārsvarā tikai piesātinātās un nepiesātinātās taukskābes ar oglekļa atomu skaitu no 4 - 20 (skat. 3.6.att.). Silikagēla frakcija no taukskābēm satur tikai butānskābi un oktadekānskābi. Taču šajā frakcijā PC sūnās tika identificēts arī glicerīns ar masas koncentrāciju $9 \pm 1 \mu\text{g/g}$ sausūnu.



3.6.att. *Polytrichum commune* ekstrakta ardielēteri un etiķskābi eluētās frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja aminopropilmodificēto silikagēlu). Signāls, kas apzīmēts ar * atbilst heptadekānskābes metilesterim un ar ** - progesteronam, kurus lieto kā iekšējos standartus. (Signālu numerācija atbilst 3.6.tabulā esošajai savienojumu numerācijai)

Dielētera un etiķskābes frakcijā ar aminopropilmodificēto silikagēlu ir atrodamas četras visizplatītākās taukskābes briofītos: palmitīnskābe, α -linolēnskābe, linolskābe, arahidonskābe [1]. Šajā frakcijā dominējošā ir α -linolēnskābe. Tās daudzums PC sūnās ir $108 \pm 34 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga, bet DP sūnās - $92 \pm 26 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga. Otrā izplatītākā taukskābe šajā frakcijā ir palmitīnskābe PC sūnās un linolskābe DP sūnās. Arahidonskābes saturs viszemākais - $10 \pm 3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga PC sūnās un $15 \pm 1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu DP sūnu (skat. 3.6.tabula).

Dietilētera un etiķskābes frakcijā identificētie savienojumi(n=3) (savienojumu numerācija atbilst 3.6.att. esošajai signālu numerācijai)

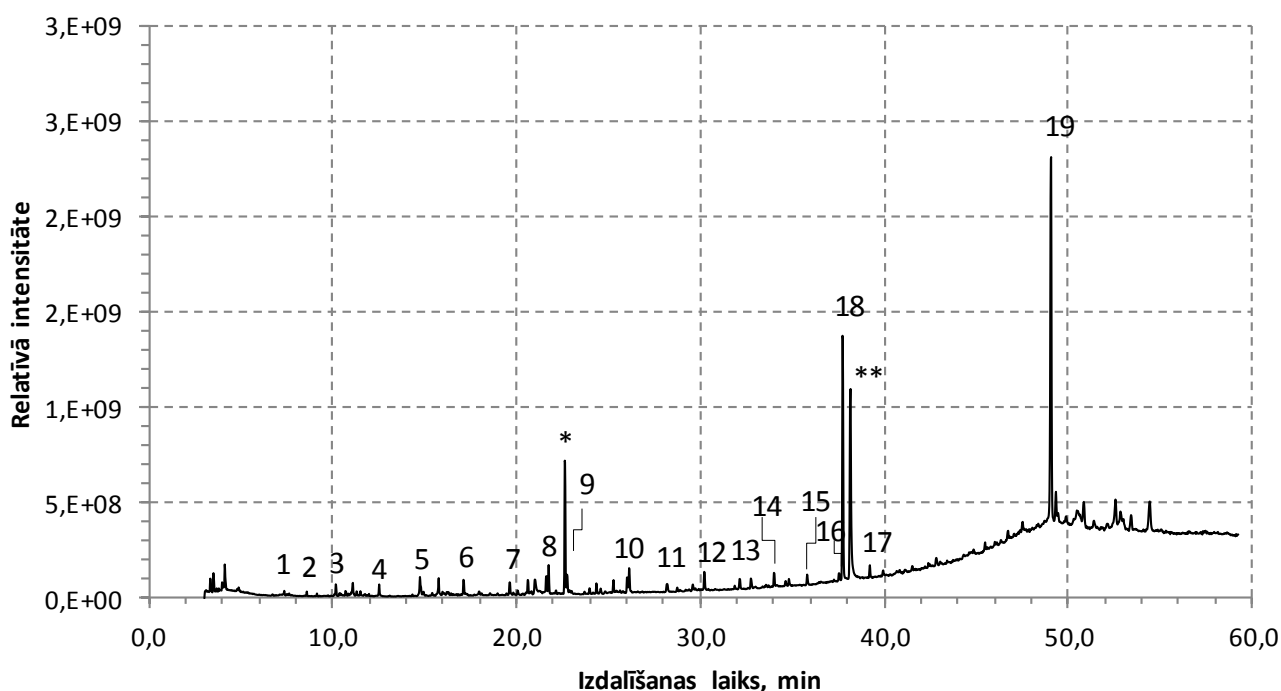
Eluents	Sorbents	Nr	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Dietilēteris: ledus etiķskābe	Silikagēls	1	Butānskābe	6,3	160, 145, 75	28±4	13±2
		2	Glicerīns	6,7	205, 147	9±1	-
		3	Oktadekānskābe	27,9	356, 341, 117	2,6±0,2	5±1
	SPE- NH ₂	4	Tetradekānskābe	19,2	300, 117	3,2±0,3	-
		5	Palmitīnskābe	23,7	328, 313, 117	66±19	58±14
		6	Linolskābe	27,3	382, 67	52±8	59±16
		7	α-Linolēnskābe	27,4	350, 79	108±34	92±26
		8	Oktadekānskābe	28,0	356, 341, 117	21±7	37±5
		9	Arahidonskābe	30,4	376, 150, 79	10±3	15±1

3.3. Briofītu ekstraktvielu frakcionēšana ar eluentu sistēmu №2

Briofītu ekstraktā esošos alkānus, tuskābju metil- un etilesterus frakcionēja ar eluentu sistēmu №2. Briofītu ekstraktu hloroformā uznesa uz sorbenta un eluēja ar heksānu, lai atdalītu visus ogļūdeņražus. Spirtu un sterolu frakcionēšanai, eluēja ar hloroformu. Tuskābju esterus atdalīja trešajā frakcijā ar 3% amonjaka šķīdumu metanolā.

3.3.1. Heksāna frakcija №2

Analizējamo briofītu heksāna frakcijā ar silikagēla sorbentu identificēja piesātinātus alkānus ar oglekļa atomu skaitu no 13 – 29 (skat. 3.7. att.). Alkānu masas koncentrācija PC briofītos svārstās no 28±8 līdz 189±3 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga, bet DP sūnās no 31±2 - 177±2 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausa parauga, kas redzams 3.7. tabulā. Pētāmo briofītu ekstraktos dominējošie alkāni ir C₂₀, C₂₂ un C₂₄.



3.7.att. *Dicranum polysetum* heksāna frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja silikagēlu). Signāls, kas apzīmēts ar * atbilst heptadekānskābes metilesterim un ar ** - progesteronam. (Signālu numerācija atbilst 3.7.tabulā esošai savienojumu numerācijai)

Abu briofītu heksāna frakcija satur skvalēnu. Tā daudzums briofītos ir robežās no 119 ± 7 līdz $126 \pm 10 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu. Kā redzams 3.7.attēlā, visintensīvākais signāls ir fitola acetātam ($176 \pm 14 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu). To identificēja tikai DP sūnās (skat. 3.7. tabula).

3.7.tabula

Heksāna frakcijā identificētie savienojumi (n=3). Alkāniem norādīta m/z vērtība molekulārajam jonam (savienojumu numerācija atbilst 3.7. att. esošajai signālu numerācijai)

Eluents	Sorbents	Nr	Izdalīšanās laiks, min	Savienojums	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Heksāns	Silikagēls	1	7,4	Tridekāns	184	-	33 ± 1
		2	8,6	Tetradekāns	198	28 ± 8	31 ± 2
		3	10,2	Pentadekāns	212	85 ± 13	68 ± 10
		4	12,5	Heksadekāns	226	46 ± 5	79 ± 2
		5	14,7	Heptadekāns	240	120 ± 7	113 ± 14
		6	17,1	Oktadekāns	254	93 ± 9	97 ± 2
		7	19,6	Nonadekāns	268	67 ± 2	82 ± 2

Eluents	Sorbents	Nr	Izdalīšanās laiks, min	Savienojums	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Heksāns	Silikagēls	8	21,7	Eikozāns	282	189±3	177±2
		9	24,0	Heneikozāns	296	34±8	38±2
		10	26,1	Dokozāns	310	176±15	160±11
		11	28,2	Trikozāns	324	56±7	50±5
		12	30,2	Tetrakozāns	338	118±10	126±11
		13	32,1	Pentakozāns	352	54±2	66±1
		14	34,0	Heksakozāns	366	106±7	99±11
		15	35,8	Heptakozāns	380	83±6	73±6
		16	37,5	Oktakozāns	394	50±18	54±13
		17	39,2	Nonakozāns	408	67±3	85±4
		18	37,7	Skvalēns	410, 69	126±10	119±7
		19	49,1	Fitola acetāts	123, 68, 43	-	176±14

Heksāna frakcijā, cietfāzes ekstrakciju veicot ar aminopropilmodificēto silikagēlu, identificēja tādus pašus alkānus kā ar parasto silikagēlu, izņemot trikozānu DP sūnās. Šo alkānu saturs kopumā ir mazāks nekā heksāna – silikagēla frakcijā, bet dominējošo alkānu sadalījuma tendence ir līdzīga (skat. 3.8. tabula). Šajā frakcijā atdalīja arī sterolus - kampesterolu, stigmasterolu, β -sitosterolu; γ - un α - tokoferolu. β -sitosterols un γ -tokoferols netika identificēti briofītu ekstrakta kopējās hromatogrammās.

3.8.tabula

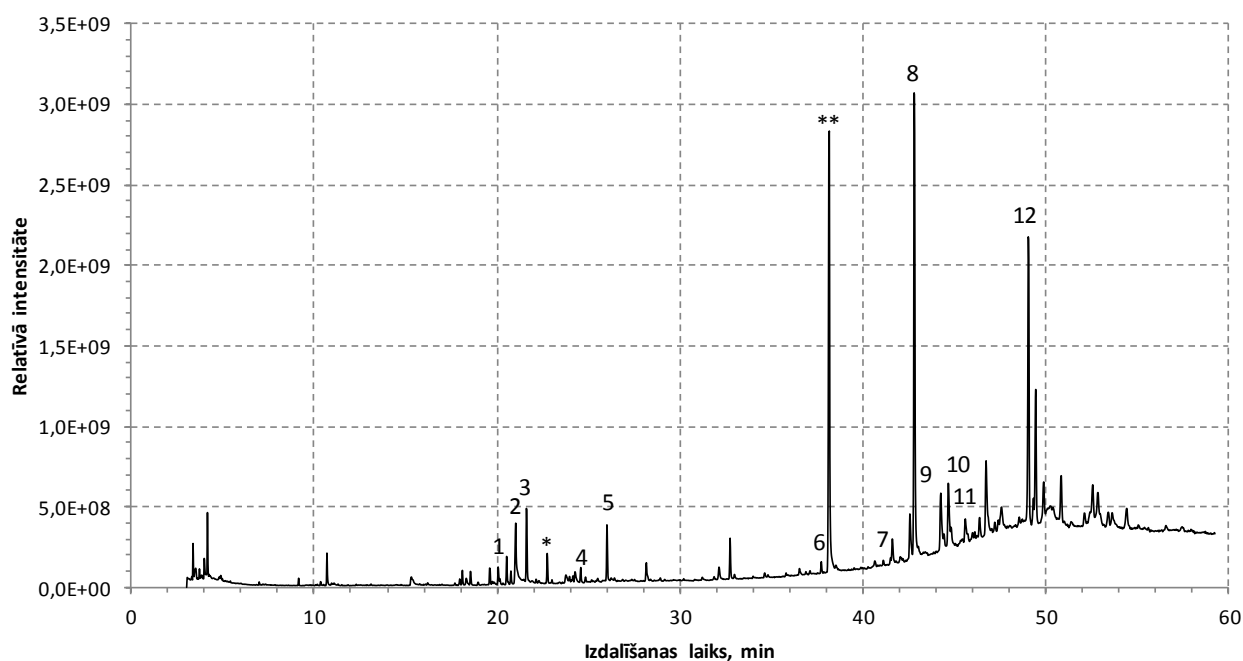
Heksāna frakcijā identificētie savienojumi (n=3). Alkāniem norādīta m/z vērtība molekulārajam jonam

Eluents	Sorbents	Izdalīšanās laiks, min	Savienojums	m/z	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Heksāns	SPE- NH ₂	7,4	Tridekāns	184	-	64±16
		8,6	Tetradekāns	198	36±9	50±11
		10,2	Pentadekāns	212	149±18	157±21
		12,5	Heksadekāns	226	101±15	96±14
		14,7	Heptadekāns	240	99±8	115±8

Eluents	Sorbents	Izdalīšanās laiks, min	Savienojums	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Heksāns	SPE- NH ₂	15,7	Oktadekāns	254	85±9	106±5
		17,1	Nonadekāns	268	134±15	142±12
		21,7	Eikozāns	282	145±4	154±9
		24,0	Heneikozāns	296	48±8	65±7
		26,1	Dokozāns	310	130±25	145±8
		28,2	Trikozāns	324	66±1	-
		30,2	Tetrakozāns	338	122±7	118±25
		32,1	Pentakozāns	352	113±12	119±8
		34,0	Heksakozāns	366	71±18	74±12
		35,8	Heptakozāns	380	53±20	71±17
		37,5	Oktakozāns	394	38±4	48±6
		39,2	Nonakozāns	408	64±6	83±20
		37,7	Skvalēns	410, 69	76±10	84±7
		41,6	γ -Tokoferols	488, 223	-	3,0±0,9
		42,8	α -Tokoferols	502, 237	19±7	23±1
		44,2	Kampesterols	192, 160	122±6	118±10
		44,7	Stigmasterols	484, 83	109±9	133±8
		45,6	β -Sitosterols	396, 43	29±5	32±4
49,1	Fitola acetāts	123, 68, 43	-	137±2		

3.3.2. Hloroforma frakcija №2

Hloroforma frakcijā identificēja taukskābes, to etil- un metil- esterus, sterolus, tokoferolus (skat. 3.8. att.). No taukskābēm šī frakcija satur tikai heksadekānskābi. Lielā daudzumā hloroforma frakcijā ir palmitīnskābes un stearīnskābes etilesteri - $265 \pm 7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu un $189 \pm 10 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu PC briofītā, attiecīgi. DP sūnās šo esteru saturs ir lielāks - $290 \pm 24 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu un $234 \pm 1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu, attiecīgi. Savukārt augstāk minēto taukskābju metilesteru daudzums sausā paraugā ir gandrīz trīs reizes mazāks.



3.8.att. *Dicranum polysetum* briofīta hloroforma frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja silikagēlu). Signāls, kas apzīmēts ar * atbilst heptadekānskābes metilesterim un ar ** - progesteronam, kurus lieto kā iekšējos standartus. (Signālu numerācija atbilst 3.9.tabulā esošai savienojumu numerācijai)

Tāpat kā heksāna frakcija, hloroforma frakcija satur sterolus un tokoferolus. α -tokoferola daudzums sausā paraugā ($116 \pm 5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ un $124 \pm 9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), ekstraktu eluējot ar hloroformu uz silikagēla sorbenta, ir lielāks nekā ar heksānu un aminopropilmodificēto silikagēlu. Pretēja situācija ir ar steroliem - stigmasterola, kampesterola un γ -sitosterola atdalīšana ir pilnīgāka, izmantojot heksānu kā eluentu un aminopropilmodificēto silikagēlu (skat. 3.9. tabula).

3.9.tabula

Hloroforma frakcijā identificētie savienojumi (n=3) (savienojumu numerācija atbilst 3.8. att. esošajai signālu numerācijai)

Eluents	Sorbents	Nr	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausū sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausū sūnu
Hloroforms	Silikagēls	1	Palmitīnskābes metilesteris	20,1	270, 87	87 ± 19	62 ± 15
		2	Palmitīnskābe	21,0	328, 117	194 ± 16	237 ± 9
		3	Palmitīnskābes etilesteris	21,6	284, 101, 88	265 ± 7	290 ± 24

Eluents	Sorbents	Nr	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Hloroforms	Silikagēls	4	Stearīnskābes metilesteris	24,6	298, 87, 74	43±3	55±11
		5	Stearīnskābes etilesteris	26,0	312, 101, 88	189±10	234±1
		6	Skvalēns	37,7	410, 69	67±2	46±4
		7	γ -Tokoferols	41,6	502, 237	-	6±2
		8	α -Tokoferols	42,8	502, 237	116±5	124±9
		9	Kampesterols	44,3	192, 160	29±4	18±2
		10	Stigmasterols	44,7	484, 83	14±2	19±2
		11	β -Sitosterols	45,6	396, 43	8±3	6,4±0,2
		12	Fitola acetāts	49,1	123, 68, 43	-	71±16

Cietfāzes ekstrakcijai izmantojot SPE-NH₂kolonnu atdalīja lielāku daudzumu sterolu (skat. 3.10. tabula). Tā, piemēram, kampesterola daudzums PC sūnās, frakcionēšanai izmantojot silikagēlu, ir tikai 29±4 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu, bet ar aminopropilmodificēto silikagēlu - 160±31 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu.

3.10.tabula

Hloroforma frakcijā identificētie savienojumi (n=3)

Eluents	Sorbents	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Hloroforms	SPE-NH ₂	Tetradekānskābe	16,3	300, 117,	-	4,9±0,2
		Palmitīnskābes metilesteris	20,1	270, 87	46±14	38±12
		Palmitīnskābe	21,0	328, 313, 117	58±7	65±9
		Linolskābes metilesteris	23,8	382, 67	49±15	33±14

Eluents	Sorbents	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Hloroforms	SPE-NH ₂	α -Linolēnskābes metilesteris	23,9	294, 81, 67	33±2	55±7
		Stearīnskābes metilesteris	24,6	298, 87, 74	9±1	7,2±0,3
		Arahidonskābes metilesteris	27,3	318, 91, 79	29±4	38±2
		α -Tokoferols	42,8	502, 237	18±3	11±4
		Kampesterols	44,3	192, 160	160±31	143±21
		Stigmasterols	44,7	484, 83	154±14	151±10
		β -Sitosterols	45,6	396, 43	32±4	44±6

3.3.3. Amonjaka frakcija

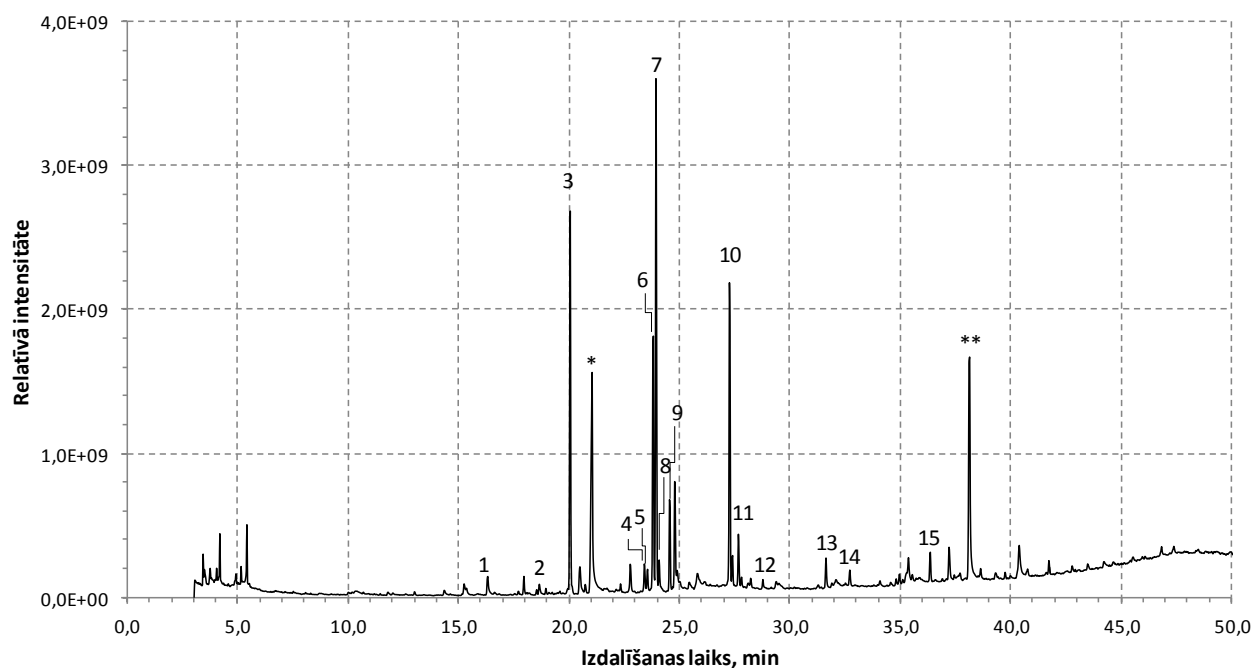
Taukskābju esteru fracionēšanai, cietfāzes ekstrakcijas kolonnu skaloja ar 3% amonjaka šķīdumu metanolā. Fracionēšanai izmantojot silikagēla kolonnu, atdalīja 8 taukskābju esterus. Visizplatītākais esteris abu pētamo briofītu amonjaka frakcijās ir α -linolēnskābes metilesteris ($991 \pm 26 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausū PC sūnās un $1020 \pm 19 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausū DP sūnās) (skat. 3.11.tabula). Šis esteris bija visizplatītākais arī hloroforma frakcijā.

Dotā frakcija satur tādu taukskābju esterus, kuri netika atdalīti iepriekš, piemēram, 8,11,14-eikozatriēnskābes metilesteris. Šī savienojuma koncentrācija pētāmajos briofītos ir robežās no $240 \pm 31 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausū sūnās (PC sūnās) līdz $190 \pm 53 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausū sūnās (DP sūnās). Amonjaka frakcijā pirmo reizi atdalīja stearīnskābi. Iepriekš tika identificēti tikai stearīnskābes esterī. Tās koncentrācija PC sūnās ir $51 \pm 13 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausū sūnās, bet DP sūnās ir $43 \pm 15 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausū sūnās.

Amonjaka frakcijā identificētie savienojumi (n=3)

Eluents	Sorbents	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācija PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācija DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Metanols	Silikagēls	Palmitīnskābes metilesteris	19,9	270, 87	754±23	834±18
		γ -Linolēnskābes metilesteris	23,3	292, 79	123±14	121±20
		Linolskābes metilesteris	23,7	382, 67	449±39	638±21
		α -Linolēnskābes metilesteris	23,8	294, 81, 67	991±26	1020±19
		Stearīnskābes metilesteris	24,5	326, 87, 74	160±32	153±46
		Stearīnskābe	25,1	284, 73, 43	51±13	43±15
		Fitols	25,4	368, 143	62±8	58±21
		Arahidonskābes metilesteris	27,2	318, 91, 79	712±45	834±20
		8,11,14-Eikozatriēnskābes metilesteris	27,6	359, 126, 113	240±31	190±53
		Tetrakozānskābes metilesteris	36,3	382, 87, 74	77±2	86±6
		α -Tokoferols	42,8	502, 237	19,2±0,3	31±15
		Kampesterols	44,2	192, 160	124±5	99,5±0,2
		Stigmasterols	44,6	484, 83	109±6	115±5
β -Sitosterols	45,5	396, 43	21±3	31,7±0,5		

Amonjaka frakcija, cietfāzes ekstrakcijai izmantojot aminopropilmodificēto silikagēla kolonnu, lielā daudzumā satur taukskābju esterus (skat. 3.9. att.). Daudzi esteri tika atdalīti arī amonjaka frakcijā izmantojot silikagēlu, to daudzums šajā frakcijā ir ievērojami samazinājies (skat. 3.12.tabula). Tā, piemēram, arahidonskābes metilestera koncentrācija PC sūnās, cietfāzes ekstrakciju veicot ar silikagēlu, ir $712 \pm 45 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausūnu, bet izmantojot aminopropilsilikagēlu - $165 \pm 31 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausūnu. Taču abās frakcijās dominējošais esters ir α -linolēnskābes metilesteris. Atšķirībā no iepriekšējās frakcijas, šajā nav atrodami steroli, bet nelielā daudzumā identificēja tetradekānskābi, pentadekānskābi un palmitīnskābes propilesteri.



3.9.att. *Dicranum polysetum* briofita amonjaka frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja aminopropilsilikagēlu). Signāls, kas apzīmēts ar * atbilst heptadekānskābes metilesterim un ar ** - progesteronam, kurus lieto kā iekšējos standartus. (Signālu numerācija atbilst 3.12.tabulā esošai savienojumu numerācijai)

3.12.tabula

Amonjaka frakcijā identificētie savienojumi (n=3) (savienojumu numerācija atbilst

3.9. att. esošajai signālu numerācijai)

Eluents	Sorbents	Nr	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācij a PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācij a DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Metanols	SPE- NH ₂	1	Tetradekānskābe	16,3	228, 185, 129,	15±3	11±2
		2	Pentadekānskābe	18,7	242, 129, 43	-	6±1
		3	Palmitīnskābes metilesteris	20,1	270, 87	220±23	223±34
		4	γ -Linolēnskābes metilesteris	23,4	292, 79	28±4	15±3
		5	Stearidonskābes metilesteris	23,6	91, 79,6 7	6±1	12±3
		6	Linolskābes metilesteris	23,8	382, 67	122±10	142±16

Eluents	Sorbents	Nr	Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	m/z, Da	Masas koncentrācij a PC sūnās $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu	Masas koncentrācij a DP sūnās, $\gamma \pm S_n$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sausu sūnu
Metanols	SPE- NH ₂	7	α -Linolēnskābes metilesteris	23,9	294, 81, 67	260±27	293±29
		8	11-oktadecēnskābes metilesteris	24,1	296, 55, 41	13±2	15±4
		9	Stearīnskābes metilesteris	24,5	326, 87, 74	56±9	52±13
		10	Arahidonskābes metilesteris	27,3	318, 91, 79	165±31	174±22
		11	8,11,14-Eikozatriēnskābes metilesteris	27,7	359, 126, 113	44±12	30±8
		12	Eikozānskābes metilesteris	28,9	326, 87, 74	5,0±0,2	-
		13	Palmitīnskābes propilesteris	31,6	298, 61	9±2	17±2
		14	Dokozānskābes metilesteris	32,7	354, 87, 74	6±1	9,0±0,2
		15	Tetrakozānskābes metilesteris	36,4	382, 87, 74	23±4	17±1

SECINĀJUMI

1. Bakalaura darba pētījumā izmantotie briofīti (*Polytrichum commune* un *Dicranum polysetum*) satur lielu skaitu sekundāro metabolītu, kuriem piemīt potenciāli augsta bioloģiskā aktivitāte, tomēr pilnīgākai visu savienojumu izpētei nepieciešams izstrādāt ekstraktvielu frakcionēšanas metodes.
2. Briofītu hloroforma ekstrakta svarīgāko savienojumu grupu selektīvā sadalīšana ir efektīvāka cietfāzes ekstrakcijas frakcionēšanai pielietojot aminopropilsilikagēlu, taču tādu savienojumu atdalīšanai kā skvalēns, fītols un fītola acetāts, piemērotāks ir aktivēts silikagēls.
3. Briofītu sekundāro metabolītu ekstraktvielu frakcionēšanu un briofītu sastāvu izpēti iespējams nodrošināt izmantojot eluentu sistēmu №1 sterolu un taukskābju atdalīšanai, bet eluentu sistēmu №2 alkānu un taukskābju esteru frakciju iegūšanai.
4. Briofītu hloroforma ekstraktu frakcionēšana ļauj izdalīt un kvantificēt tādas savienojumu grupas kā alkāni, taukskābju esteri, taukskābes, sekot to izmaiņām atkarībā no pētītās briofītu sugas, sezonāliem procesiem.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Dembitsky, V. M. Lipids of bryophytes. *Prog Lipid Res.* **1993**, 32, 281-356.
2. Glime, J. M. Bryophyte ecology. Vol. 1. Physiological Ecology. 2007. <http://www.bryoecol.mtu.edu/>(skatīts 15.12.2013).
3. Strazdiņa, L.; Liepiņa, L.; Mežaka, A.; Madžule, L. Sūnu ceļvedis dabas pētniekiem. LU Akadēmiskais apgāds: Rīga, 2011.
4. Zaccone, C.; Said-Pullicino, D.; Gigliotti, G.; Miano, T. M. Diagenetic trends in the phenolic constituents of *Sphagnum*-dominated peat and its corresponding humic acid fraction. *Org. Geochem.* **2008**, 39, 830-838.
5. Huang, X.; Xue, J.; Zhang, J.; Qin, Y.; Meyers, P. A.; Wang, H. Effect of different wetness conditions on *Sphagnum* lipid composition in the Erxianyan peatland, central China. *Org. Geochem.* **2012**, 44, 1-7.
6. Piervittori, R.; Alessio, F.; Usai, L.; Maffei, M. Seasonal variations in lipids of *Xanthoria parietina* growing at high elevations. *Phytochem.* **1995**, 40, 717-723.
7. Goffinet, B.; Shaw, A.J. Bryophyte biology. Cambridge, Cambridge University Press, 2008.
8. Orlov, D. S.; Sadovnikova, L. K. Soil organic matter and protective functions of humic substances in the biosphere. In: *Use of humic substances to remediate polluted environments*. Perminova, I. V.; Hattfield, K.; Hertkorn, N. Eds.; Nato Science Series IV: Earth and Environmental Sciences, Vol. 52, Springer: The Netherlands, 2005, pp 37-52.
9. Dembitsky, V. M.; Rezanka, T.; Bychek, I. A.; Afonina, O. M. Polar lipid and fatty acid composition of some bryophytes. *Phytochem.* **1993**, 33, 1009-1014.
10. Melick, D.R.; Seppelt, R.D. Loss of soluble carbohydrates and changes in freezing point of Antarctic bryophytes after leaching and repeated freeze-thaw cycles. *Antarc. Sci.* **1992**, 4 (4), 399-404.
11. Smirnoff, N. The carbohydrates of bryophytes in relation to desiccation tolerance. *J. Bryol.* **1991**, 17, 185-191.
12. Dembitsky, V. M.; Rezanka, T. Distribution of diacylglycerylhomoserines, phospholipids and fatty acids in thirteen moss species from southwestern Siberia. *Biochem. Syst. Ecol.* **1995**, 23, 71-78.
13. Dembitsky, V. M.; Rezanka, T. Distribution of acetylenic acids and polar lipids in some aquatic bryophytes. *Phytochem.* **1995**, 40, 93-97.
14. Asakawa, Y. Biologically active compounds from bryophytes. *Pure Appl. Chem.* **2007**, 79, 557-580.

15. You, J.; Zhao, X.; Suo, Y.; Li, Y.; Wang, H.; Chen, G. Determination of long-chain fatty acids in bryophyte plants extracts by HPLC with fluorescence detection and identification with MS. *J. Chrom. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, *848*, 283–291.
16. Baas, M.; Pancost, R.; van Geel, B.; Sinnighe Damste, J. S. A comparative study of lipids in *Sphagnum* species. *Org. Geochem.* **2000**, *31*, 535-541.
17. Chiu, P.; Patterson, G. W.; Fenner, G. P. Sterols of bryophyte. *Phytochem.* **1985**, *24*, 263-266.
18. Bragazza, L.; Freeman, C. High nitrogen availability reduces polyphenol content in *Sphagnum* peat. *Sci. Total Environ.* **2007**, *377*, 439-443.
19. Zaccone, C.; Said-Pullicino, D.; Gigliotti, G.; Miano, T. M. Diagenetic trends in the phenolic constituents of *Sphagnum*-dominated peat and its corresponding humic acid fraction. *Org. Geochem.* **2008**, *39*, 830-838.
20. Mellegård, H.; Stalheim, T.; Hormazabal, V.; Granum, P. E.; Hardy, S. P. Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in *Sphagnum papillosum* against foodborne bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **2009**, *49*, 85-90.
21. Wilschke, J.; Sprengel, B.; Wolff, C.; Rudolph, H. A hydroxibutenolide from *Sphagnum* species. *Phytochem.* **1989**, *28*, 1725-1727.
22. Rasmussen, S.; Wolff, C.; Rudolph, H. Compartmentalization of phenolic constituents in *Sphagnum*. *Phytochem.* **1995**, *38*, 35-39.
23. Rudolph, H.; Samland, J. Occurrence and metabolism of sphagnum acid in the cell walls of bryophytes. *Phytochem.* **1985**, *24*, 745-749.
24. Iwashina, T. Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biol. Sci. Space.* **2003**, *17*, 24-44.
25. Zinsmeister, H.D.; Mues, R. (eds.) *Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy*. Oxford, Oxford University Press, 1990.
26. Basile, A.; Giordano, S.; Lopez-Saez, J. A.; Cobianchi, R. C. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochem.* **1999**, *52*, 1479-1482.
27. Lopez-Saez, J. A.; Perez-Alonso, M. J.; Velasco-Negueruela, A. Evolution of mosses according to biflavonoid and triflavonoid composition: preliminary considerations. *Ars Pharm.* **1996**, *37*, 83-95.
28. Guide to solid phase extraction.
<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> (Skatīts 03.12.2013.)
29. New mechanisms of solid phase extraction to improve your analytical results.
<https://www.chromspec.com/pdf/e/uct09.pdf> (Skatīts 04.01.2014.)

30. Kaluzny, A. M.; Duncan, L. A.; Merritt, M. V.; Epps, D. E. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase column. *J.Lipid Res.***1985**, *26*, 135-140.
31. Wagner, Ch.; Neukom, H.-P.; Galetti, V.; Grob, K. Determination of mineral paraffins in feeds and foodstuffs by bromination and pre-separation on aluminium oxide: Method and results of a ring test. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* **2001**, *92*, 231–249.
32. Moret, S.; Barp, L.; Grob, K.; Conte, L. S. Optimised off-line SPE-GC-FID method for the determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) in vegetable oils. *Food chem.***2011**, *129*, 1898-1903.
33. Purcaro, G.; Tranchida, P. Q.; Barp, L.; Moret, S.; Conte, L. S.; Mondello, L. Detailed elucidation of hydrocarbon contamination in food products by using solid-phase extraction and comprehensive gas chromatography with dual detection. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *773*, 97-104.
34. Nichols, J. E. Procedures for extraction and purification of leaf wax biomarkers from peats. *Mires and Peat* **2010/11**, *3*, 1-7.
35. Hopia, A.I.; Piironen, V. I.; Koivistoinen, P. E.; Hyvönen, L. E. T. Analysis of lipid classes by solid-phase extraction and high-performance size-exclusion chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.***1992**, *69*, 772-776.
36. Marquez-Ruiz, G.; Jorge, N.; Martin-Polvillo, M.; Dobarganes M. C. Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oil solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard. *J. Chrom.***1996**, *749*, 55-60.
37. Sebedio, J. L.; Septier, Ch.; Grandgirard, A. Fractionation of commercial frying oil samples using Sep-Pak cartridges. *J. Am. Oil Chem. Soc.***1986**, *63*, 1541-1543.
38. International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Method 2.507: Determination of polar compounds in frying fats. In: *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, 7th Edition. Blackwell: Oxford, 1987.
39. Christie, W. W. Chromatographic analysis of phospholipids. *Z Lebensm Unters Forsch* **1985**, *181*, 171-182.
40. Blunk, H. C.; Steinhart, H. Separation of phospholipids in bovine tissue with disposable silica gel extraction columns. *Z Lebensm Unters Forsch* **1990**, *190*, 123-125.
41. Silver ion chromatography using solid-phase extraction columns packed with a bonded-sulfonic acid. *J. Lipid Res.* **1989**, *30*, 1471-1473.

42. Perez-Camino, M.C.; Moreda, W.; Cert, A. Determination of diacylglycerol isomers in vegetable oils by solid-phase extraction followed by gas chromatography on a polar phase. *J. Chromatogr.* **1996**, *721*, 305-314.
43. Perez-Camino, M.C.; Cert, A. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1558-1562.
44. Nota, G.; Naviglio, D.; Romano, R.; Sabia, V.; Musso, S.S.; Improta, C. Determination of the wax ester content in olive oils. Improvement in the method proposed by EEC regulation 183/93. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 202-205.
45. Azadmard-Damirchi, S.; Dutta, P. C. A single step solid-phase extraction method for complete separation of sterol oxidation products in food lipids. *J. Chromatogr.* **2009**, *1216*, 36-42.
46. Ruiz-Gutierrez, V.; Perez-Camino, M. C. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J. Chromatogr.* **2000**, *885*, 321-341.
47. Bosinger, S.; Luf, W.; Brandl, E. 'Oxysterols': Their occurrence and biological effects. *Int. Dairy J.* **1993**, *3*, 1-33.
48. Horstmann, P.; Montag, A. New methods for rapid isolation of steroids from lipids. *Fette Seifen Anstrichm.* **1986**, *88*, 262-264.
49. Amelio, M.; Rizzo, R.; Varazini, F. Determination of sterols, erythrodiol, uvaol and alkanols in olive oils using combined solid-phase extraction, high-performance liquid chromatographic and high-resolution gas chromatographic techniques. *J. Chromatogr.* **1992**, *606*, 179-185.
50. Nourooz-Zadeh, J.; Appelqvist, L. A. Isolation and quantitative determination of sterol oxides in plant-based foods: soybean oil and wheat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 288-293.
51. Azadmard-Damirchi, S.; Dutta, P. C. A single step solid-phase extraction method for complete separation of sterol oxidation products in food lipids. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 36-42.
52. Chen, C. W.; Sun, L. C. Determination of free and esterified cholesterol contents in lard. *Food Sci.* **1996**, *23*, 367-376.
53. Mounts, T. L.; Nash, A. M. HPLC analysis of phospholipids in crude oil for evaluation of soybean deterioration. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 757-760.
54. Nash, A. M.; Frankel, E. N. Limited extraction of soybean with hexane. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1986**, *63*, 244-246.
55. Carelli, A. A.; Brevedan, M. I. V.; Crapiste, G. H. Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 511-514.

56. Wilson, R.; Smith, R.; Wilson, P.; Shepherd, M. J.; Riemersma, R. A. Quantitative gas chromatography – mass spectrometry isomer-specific measurement of hydroxyl fatty acids in biological samples and food as a marker of lipid peroxidation. *Anal. Biochem.* **1997**, *248*, 76-85.
57. Guitierrez, F.; Albi, M. A.; Palma, R.; Rios, J. J.; Olias, J. M. Bitter taste of virgin olive oil: correlation of sensory evaluation and instrumental HPLC analysis. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 68-70.
58. Guitierrez-Rozalez, F.; Perdiguero, S.; Guitierrez R.; Olias, J. M. Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 394-395.
59. Mannino, S.; Cosio, M. S.; Bertuccioli, M. High performance liquid chromatography of phenolic compounds in virgin olive oils using amperometric detection. *Ital. J. Food Sci.* **1993**, *4*, 363-366.
60. Pirisi, M. F.; Angioni, A.; Cabras, P.; Garau, V. L.; Sanjust di Teulada, M. T.; Karim dos Santos, M.; Bandino, G. Phenolic compounds in virgin olive oils I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution. *J. Chromatogr A.* **1997**, *768*, 207-213.
61. Eder, K.; Buchmeiser, M. R.; Bonn, G. K. New cation-exchange resins with high reversed-phase character for solid-phase extraction of phenols. *J. Chromatogr A.* **1998**, *810*, 43-52.
62. Juaneda, P.; Rocquelin, G. Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* **1985**, *20*, 40-41.
63. Bateman, G. H.; Jenkins, T. C. Method for extraction and separation by solid phase extraction of neutral, free fatty acids, and polar lipid from mixed microbial cultures. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 132-134.
64. Kim, H. Y.; Salem, N. Separation of lipid classes by solid phase extraction. *J. Lipid Res.* **1990**, *32*, 2285-2289.
65. Tsikas, D. Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to assess in vivo synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, isoprostanes and related compounds in humans. *J. Chromatogr. B* **1998**, *717*, 201-245.
66. Prasad, M. R.; Jones, R. M.; Young, H. S.; Kaplinsky, L. B.; Das, D. K. Analysis of tissue free fatty acids isolated by aminopropyl bonded-phase columns. *J. Chromatogr. B* **1988**, *428*, 221-228.

67. Wong, S. H. Y.; Knight, J. A.; Hopfer, S. M.; Zaharia, O.; Leach, C. N., Jr.; Sunderman, F. W., Jr. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.* **1987**, *33*, 214-220.
68. Carbonneau, M. A.; Peuchant, E.; Sess, D.; Canioni, P.; Clerc, M. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 1423-1429.
69. Suttner, J.; Čermak, J.; Dyr, J. E. Solid-phase extraction in malondialdehyde analysis. *Anal. Biochem.* **1997**, *249*, 20-23.
70. Bernhardt, T. G.; Cannistraro, P. A.; Bird, D. A.; Doyle, K. M.; Laposta, M. Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **1996**, *675*, 189-196.
71. Manoli, E.; Samara, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 417-428.
72. Kiss, G.; Varga-Puchony, Z.; Hlavay, J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1996**, *725*, 261-272.
73. Harrak El, R.; Callul, M.; Marce, R. M.; Borrull, F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase extraction membranes. *J. Environ. Anal. Chem.* **1996**, *64*, 47-57.
74. Harrak El, R.; Callul, M.; Marce, R. M.; Borrull, F. Influence of the organic solvent in on-line solid phase extraction for the determination of PAHs by liquid chromatography and fluorescence detection. *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, *21*, 667-670.
75. Lopez Garcia, A.; Blanco Gonzalez, E.; Garcia Alonso, J. J.; Sanz Medel, A. Potential of micelle-mediated procedures in the sample preparation steps for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waters. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *264*, 241-248.
76. Sargenti, S. R.; McNair, H. M. Comparison of solid-phase extraction and supercritical fluid extraction for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking water. *J. Micro. Sep.* **1998**, *10*, 125-131.
77. Nirmaier, H. P.; Fischer, E.; Meyer, A.; Henze, G. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **1996**, *730*, 169-175.
78. Urbe, I.; Ruana, J. Application of solid-phase extraction discs with glass fiber matrix to fast determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *J. Chromatogr. A* **1997**, *778*, 337-345.

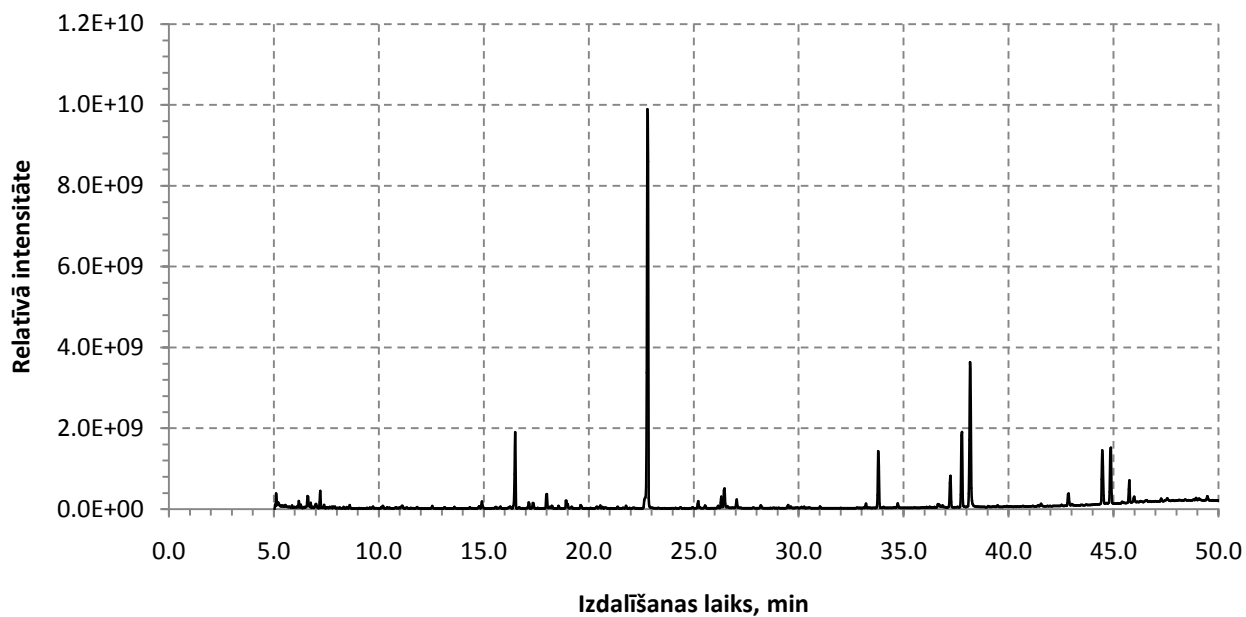
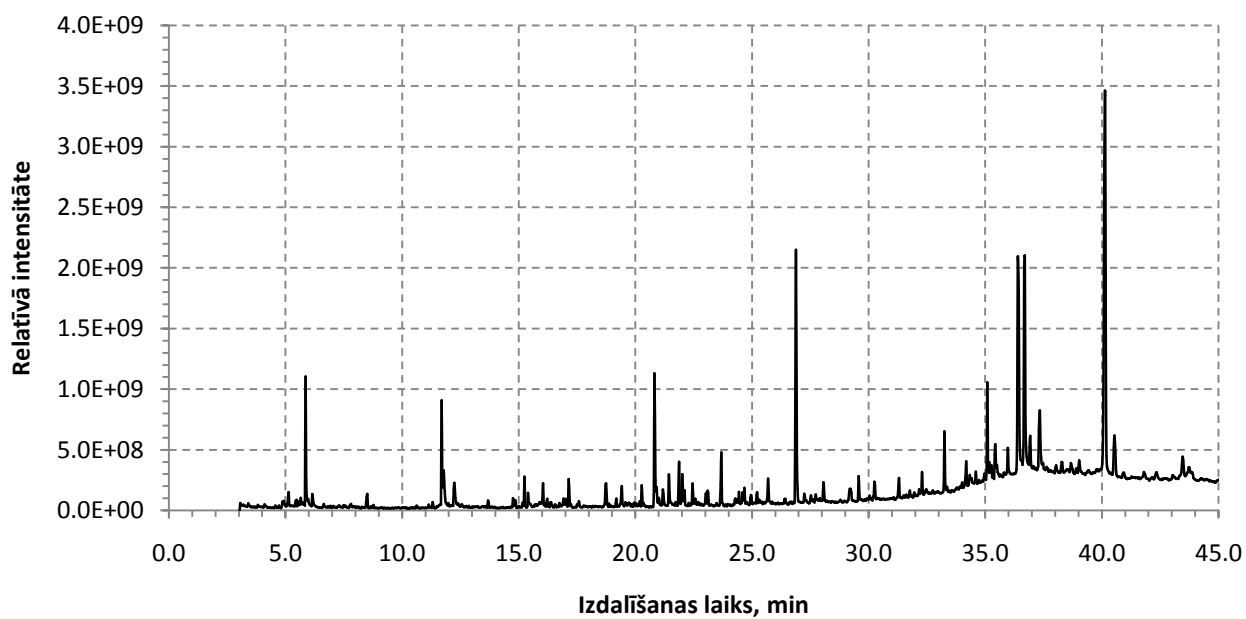
79. Berset, J. D.; Ejem, M.; Holzer R.; Lischer, P. Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 383, 263-275.
80. Thompson, D.; Jolley, D.; Maher, W. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in oyster tissues by High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Microchem. J.* **1993**, 47, 351-362.
81. Leeming, R.; Maher, W. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in lake sediments. *Org. Geochem.* **1990**, 15, 469-476.
82. He, Y.; Lee, H. K. Trace analysis by combined use of off-line solid-phase extraction, on-column sample focusing and U-shape flow cell in capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1998**, 808, 79-86.
83. Kootstra, P. R.; Straub, M. H. C.; Stil, G. H.; Van der Velde, E. G.; Hesselink, W.; Land, C. C. *J. Chromatogr. A* **1995**, 697, 123-129.
84. Sun, F.; Littlejohn, D.; Gibson, M. D. Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of US EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet adsorption detection. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 364, 1-11.
85. Marce, R. M.; Borrull, F. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *J. Chromatogr. A* **2000**, 885, 273-290.
86. McNair, M. H.; Miller, M. J. Basic gas chromatography. Techniques in analytical chemistry. New York, A Wiley-Interscience publication. 1993.
87. McMaster, Marvin C. GC/MS. A practical user's guide second edition. New York, A Wiley-Interscience publication. 2008.
88. Sigma-Aldrich Home page. BSTFA. Product specification.
http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/General_Information/bstfa.pdf (Skatits 20.12.2013.)
89. Sigma-Aldrich Home page. Analytical chemistry and Chromatography products. Gas chromatography literature: Guide to derivatization reagents for GC.
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/t196909.Par.0001.File.tmp/t196909.pdf> (Skatits 29.12.2013)
90. Лебедев А. Т. *Методы в химии. Масс-спектрометрия в органической химии*. БИНОМ: Москва, 2003; 13-14 стр.
91. Biopix. Rugose Fork-moss (*Dicranum polysetum*).
http://www.biopix.com/rugose-fork-moss-dicranum-polysetum_photo-54494.aspx

(Skatīts 25.05.2014.)

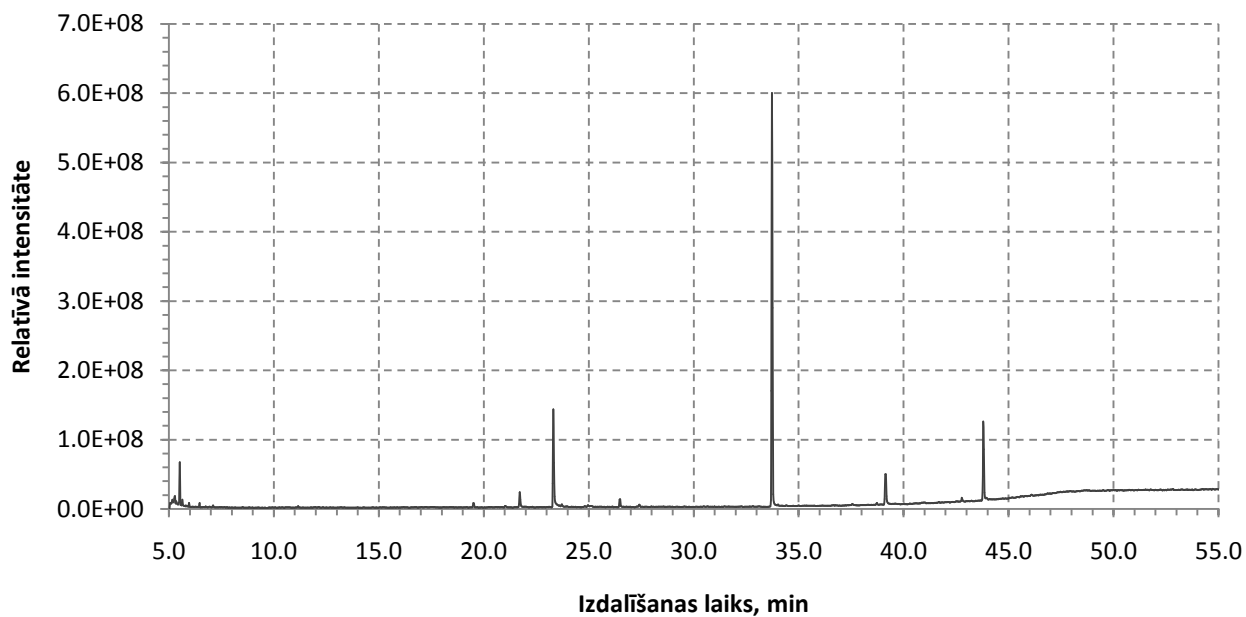
92. The bryophytes of Cornwall and the isles of Scilly. *Polytrichum commune* var. *perigoniale*.
http://www.cisfbr.org.uk/Bryo/Cornish_Bryophytes_Polytrichum_commune_var_perigoniale.html (Skatīts 25.05.2014.)
93. Tutschek, R. Characterization of a peroxidase from *Sphagnum magellanicum*.
Phytochemistry **1979**, *18*, 1437-1439.
94. BDN home page. CHROMABOND® NH2, 3 ml, 500 mg.
<http://www.bdl-cee.com/home/chromabond-nh2-3-ml-500-mg> (Skatīts 16.04.2014.)
95. Schummer, C.; Delhomme, O.; Appenzeller, B. M. R.; Wenning, R.; Millet, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta* **2009**, *77*, 1473-1482.
96. Giacometti, J.; Milosevic, A.; Milin, C. Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **2002**, *976*, 47-54.

PATEICĪBAS

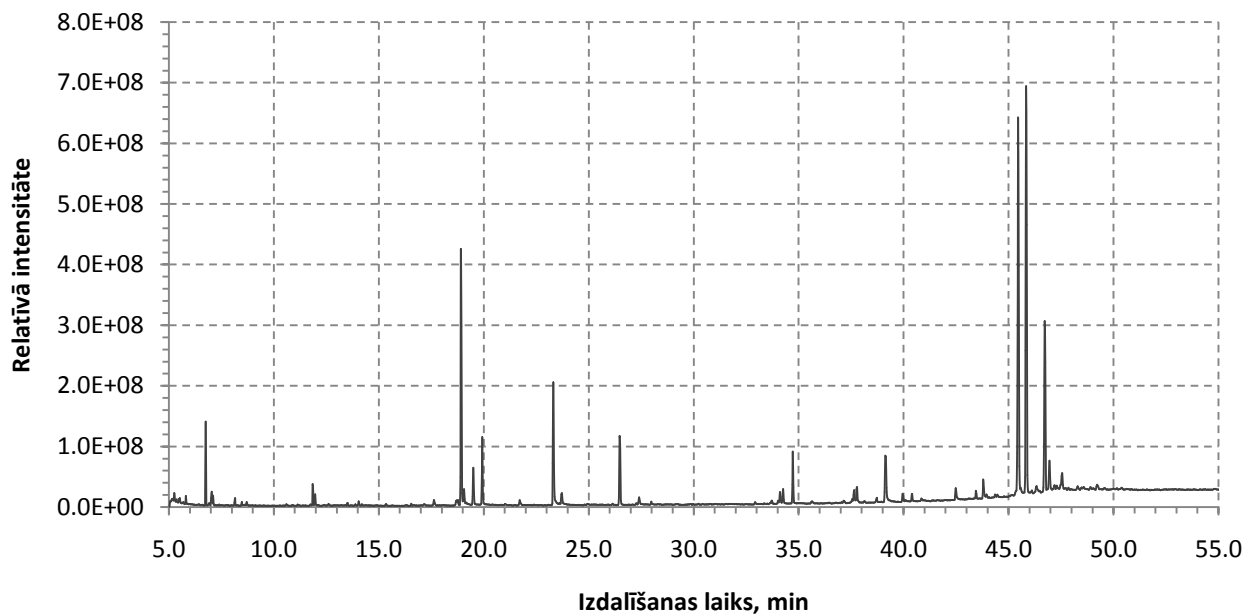
Izsaku pateicību prof. Mārim Kļaviņam par sniegto iespēju izstrādāt bakalaura darbu Ģeogrāfijas un Zemes zinātņu fakultātē vides ķīmijas laboratorijā un par vērtīgiem padomiem. Laurai Kļaviņai par palīdzību darba izstrādē un īstenošanā. Laurim Arbidanam par veltīto laiku apmācībām un palīdzību analīžu veikšanā. Prof. Arturam Vīksnam par atsaucību un ieteikumiem darba noformējumā.

1) *Polytrichum commune* ekstraktvielu hromatogramma pirms frakcionēšanas2) *Dicranum polysetum* ekstrakta heksāna frakcijas №1 hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja aminopropilsilikagēlu)

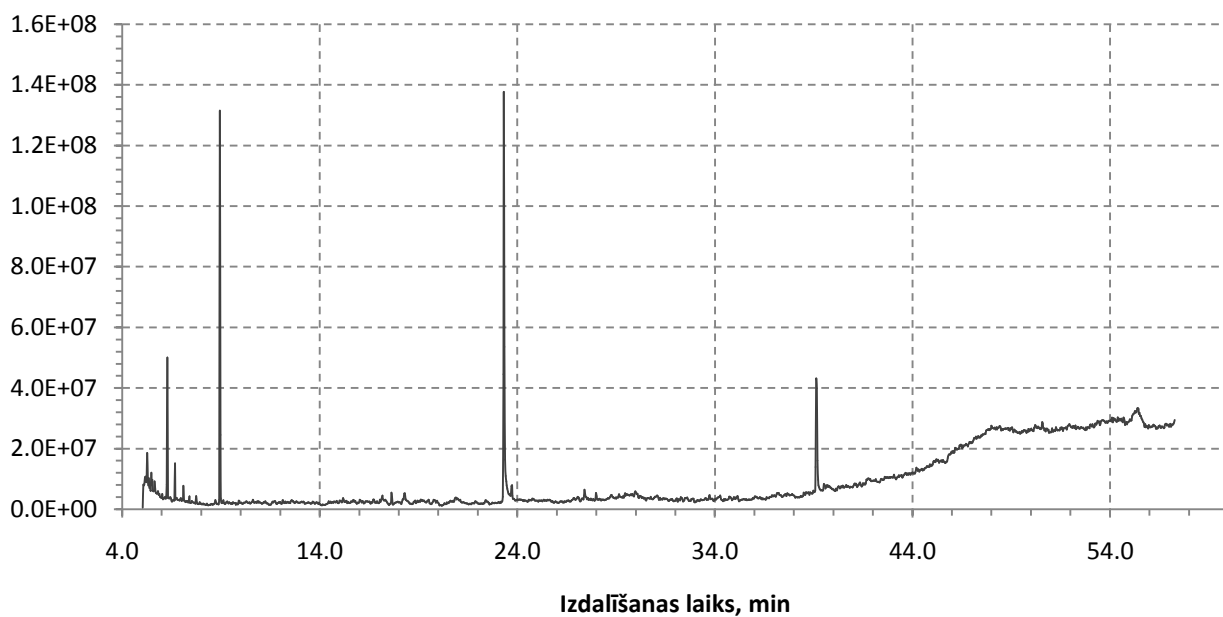
- 3) *Polytrichum commune* ekstrakta heksāna un hloroforma frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja aminopropilsilikagēlu)



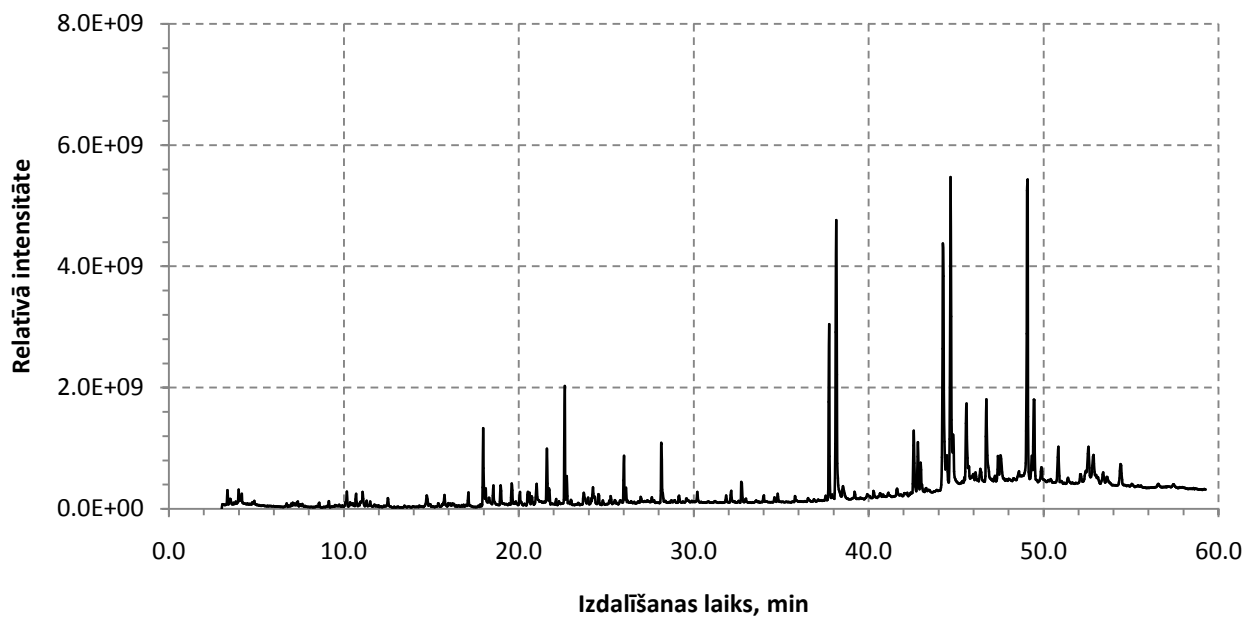
- 4) *Polytrichum commune* ekstrakta hloroforma №1 frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja aminopropilsilikagēlu)



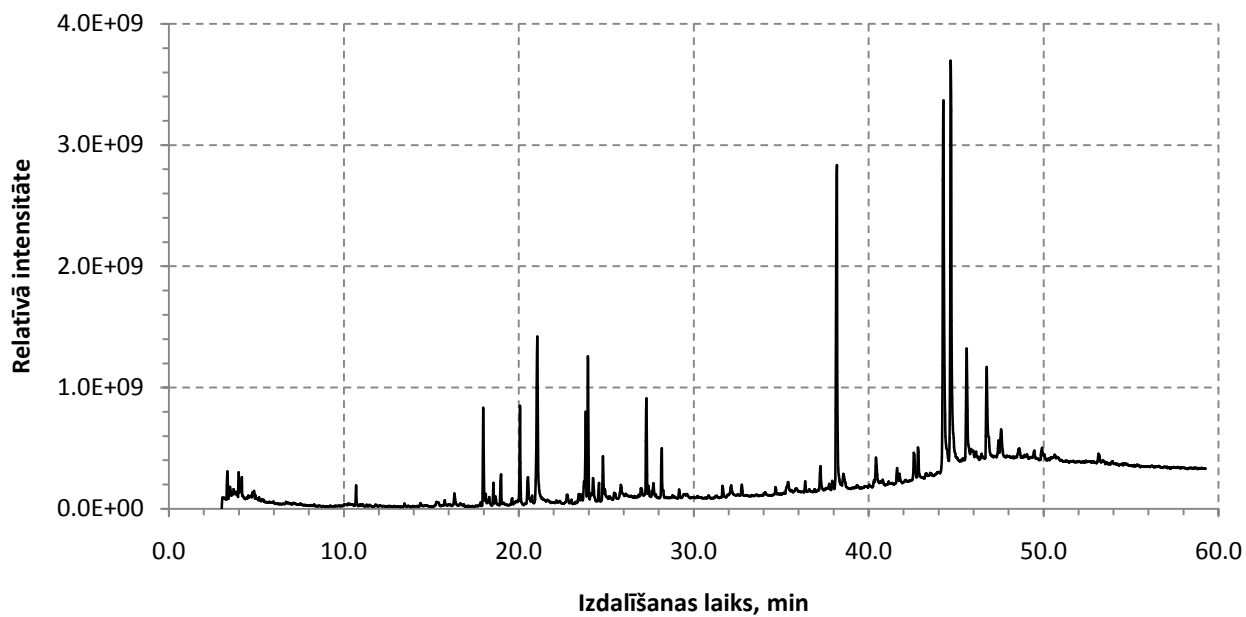
5) *Polytrichum commune* ekstrakta ar dietilēteri un etiķskābi iegūtās frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja silikagēlu)



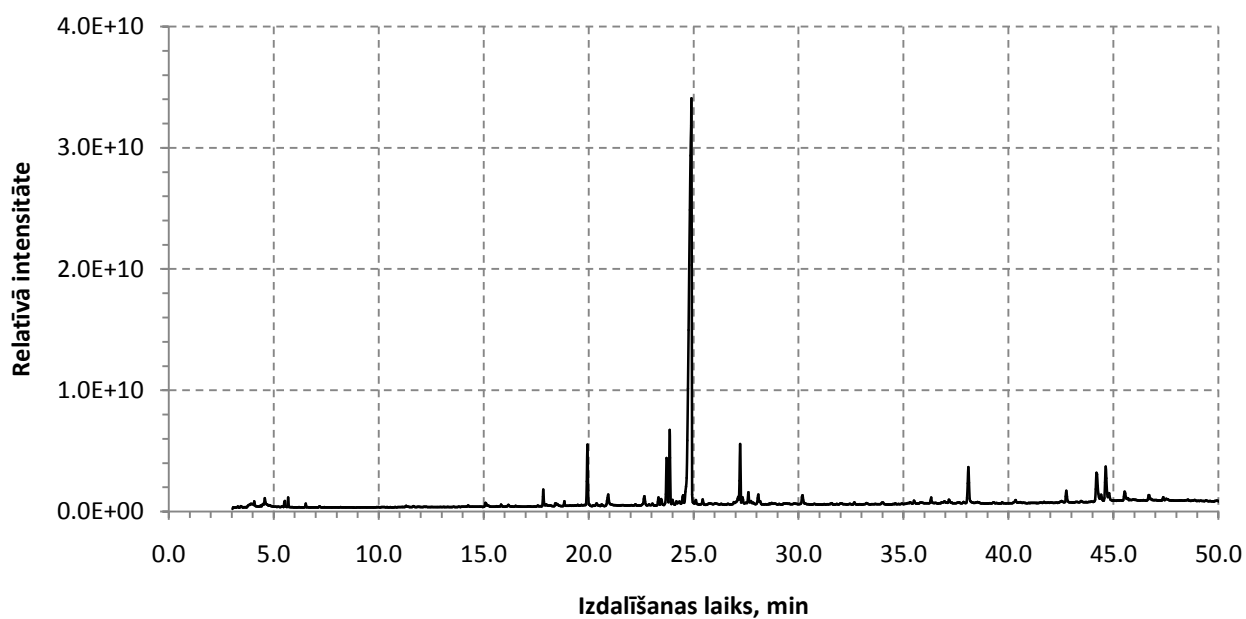
6) *Dicranum polysetum* ekstrakta heksāna №2 frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja aminopropilsilikagēlu)



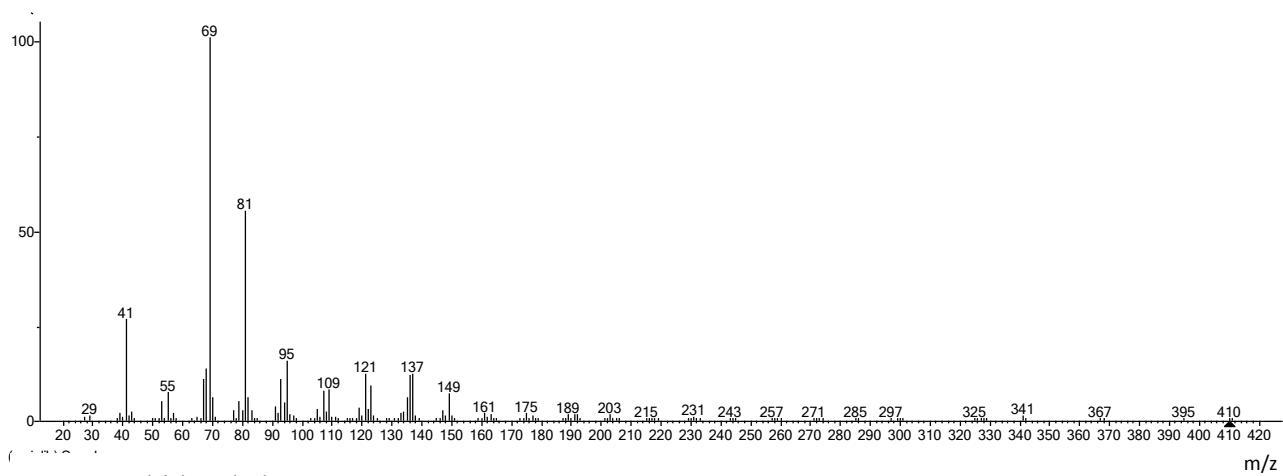
7) *Dicranum polysetum* ekstrakta hloroforma №2 frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja aminopropilsilikagēlu)



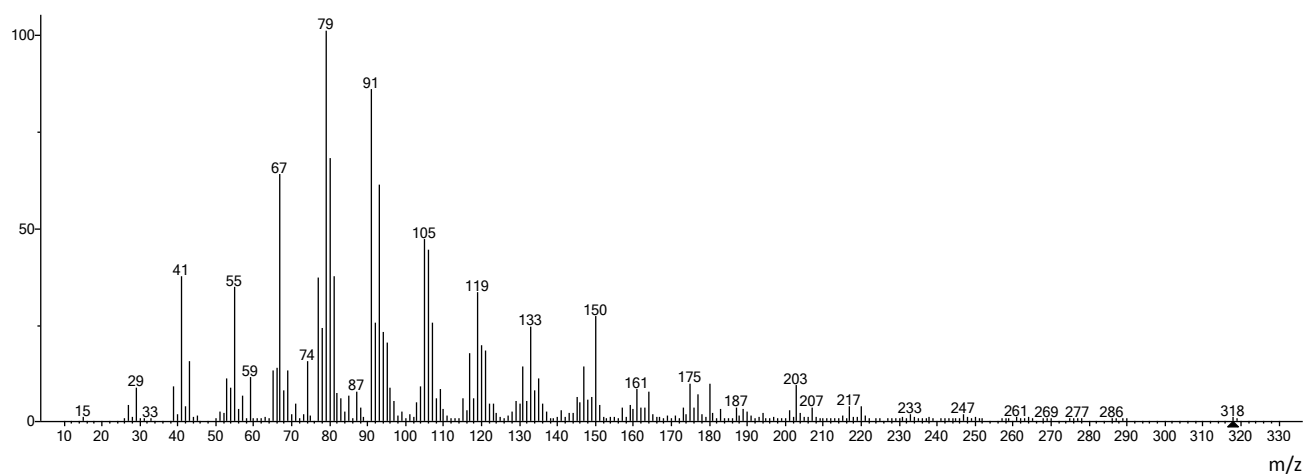
8) *Dicranum polysetum* ekstrakta amonjaka frakcijas hromatogramma (cietfāzes ekstrakcijai izmantoja silikagēlu)



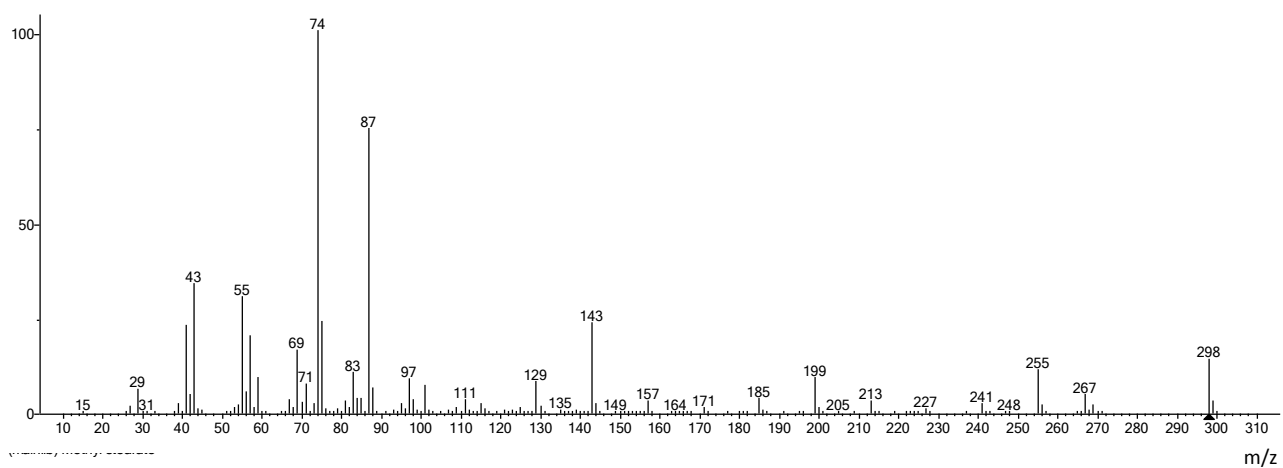
1) Skvalēna masspektrs



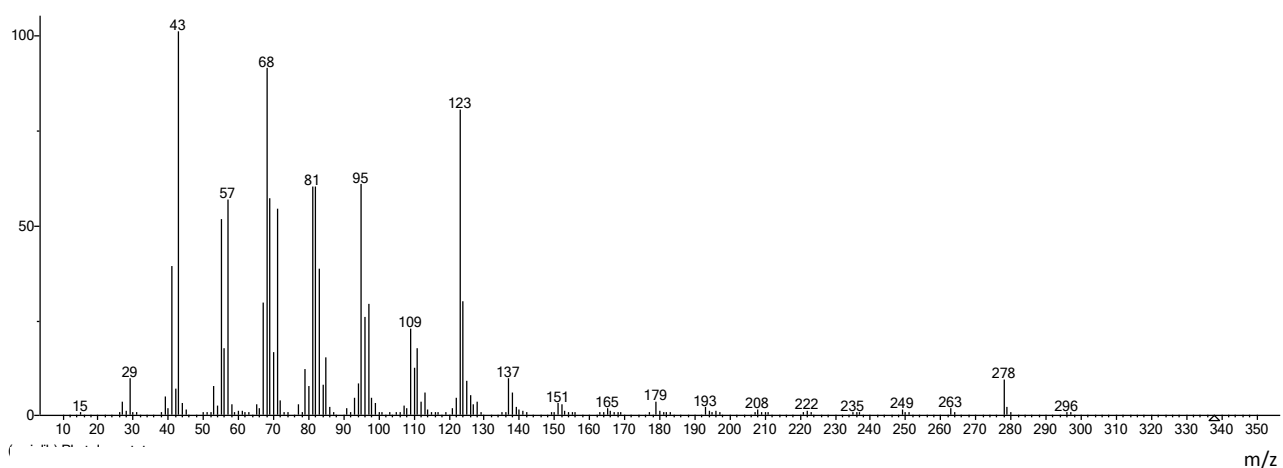
2) Arahidonskābes metilestera masspektrs



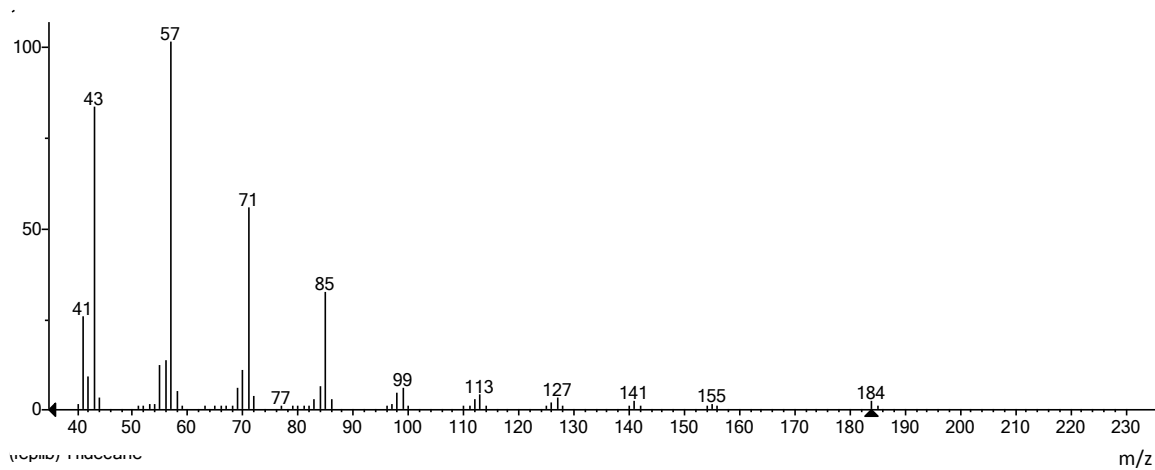
3) Stearīnskābes metilestera masspektrs



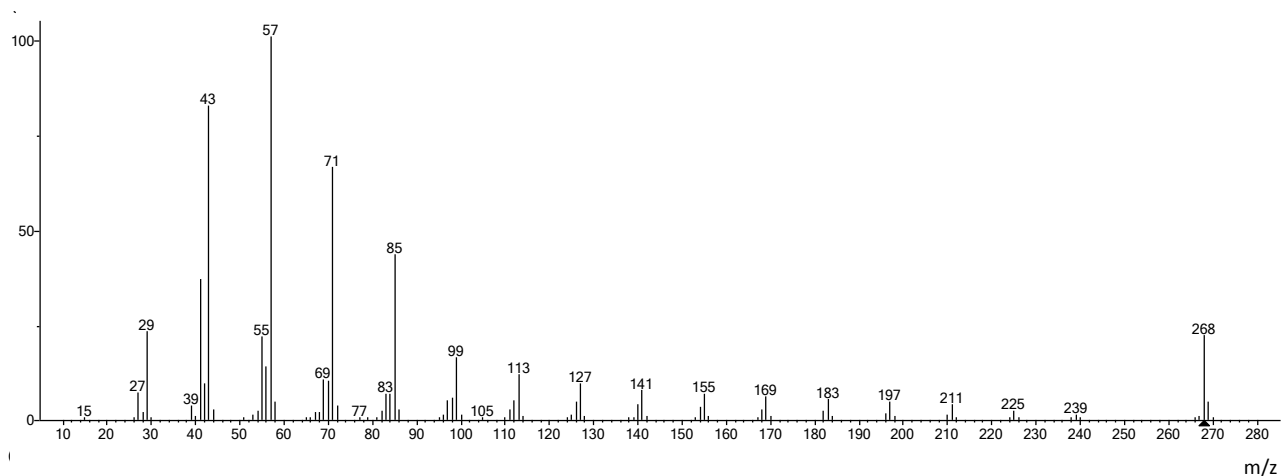
4) Fitola acetāta masspektrs



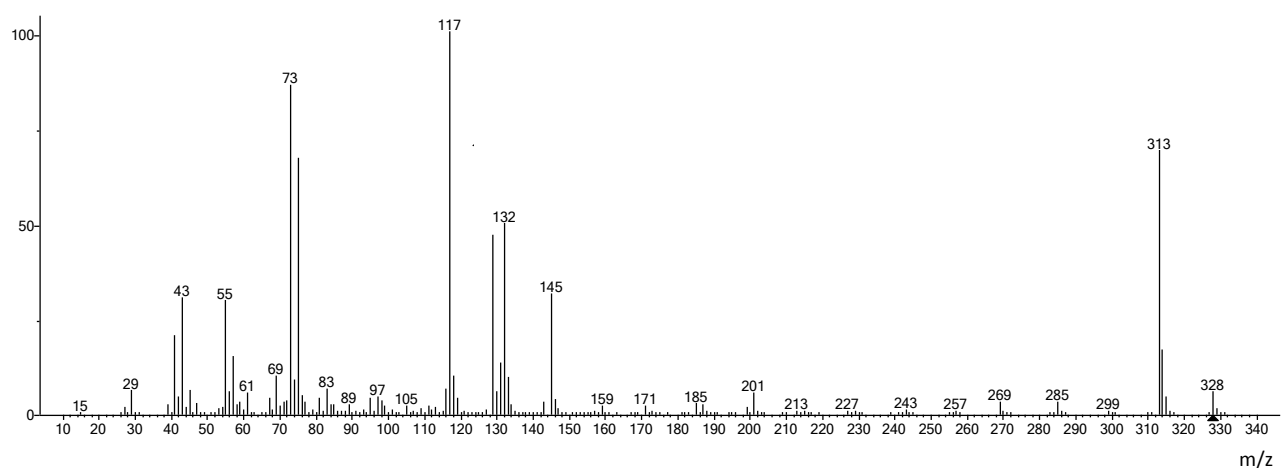
5) Tridekāna masspektrs



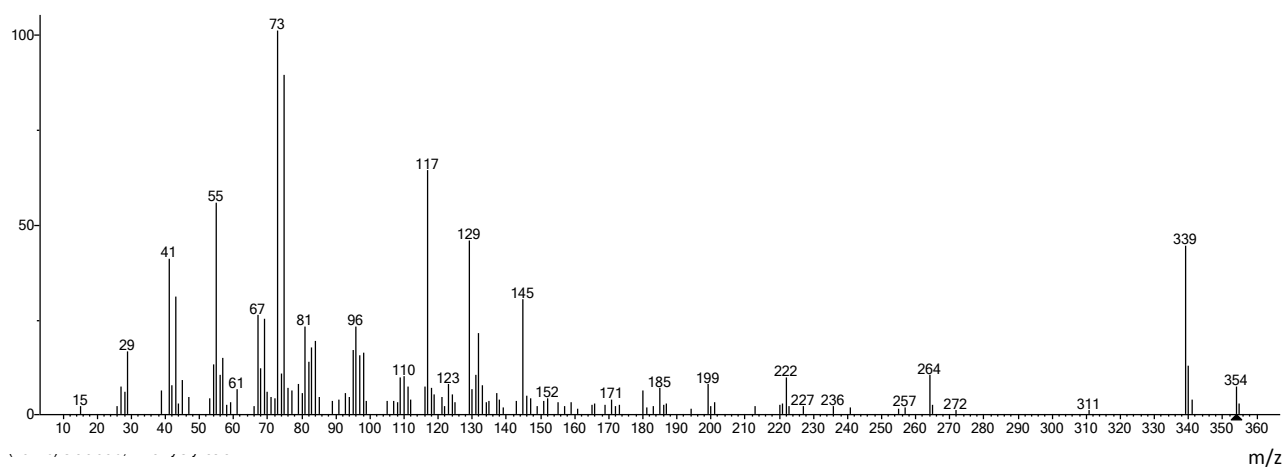
6) Nonadekāna masspektrs



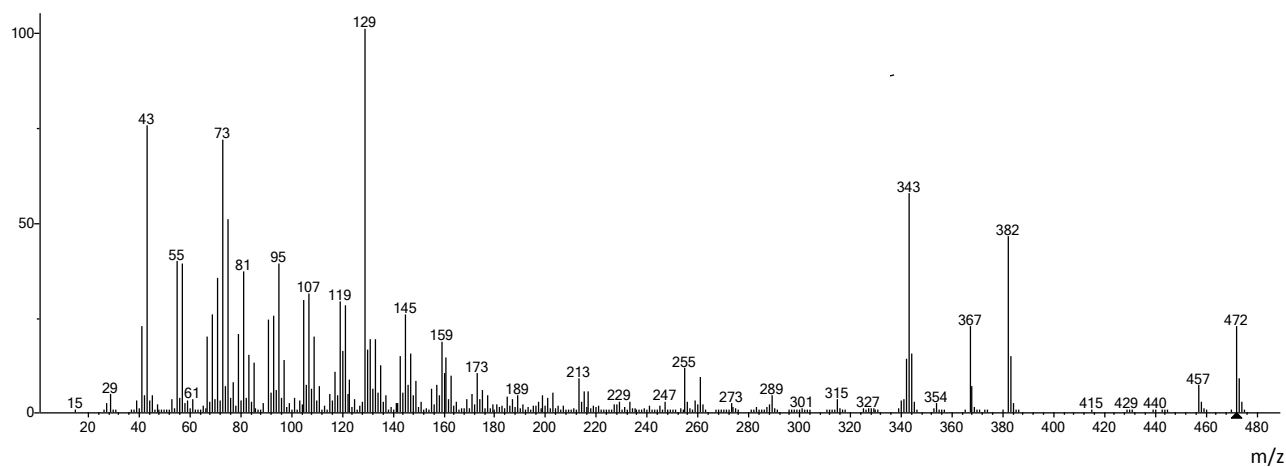
7) Palmitīnskābes trimetilsililestera masspektrs



8) Oleīnskābes trimetilsililestera masspektrs



9) Kampesterola trimetilsililestera masspektrs



10) Stigmasterola trimetilsililestera masspektrs

