

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**POLIFENOLIEM BAGĀTU EKSTRAKTU IEGŪŠANA NO *VACCINIUM*
ĢINTS OGU SPIEDPALIEKĀM, TO IZPĒTE UN BIOLOĢISKĀS
AKTIVITĀTES RAKSTUROŠANA**

Maģistra darbs

Autors: Linards Kļaviņš

Stud. apl. Nr. Ik11157

Darba vadītāja: asoc. prof., Dr. biol. Vizma Nikolajeva

RĪGA 2017

Saturs

Saturs.....	1
Apzīmējumu saraksts.....	3
Kopsavilkums.....	4
Abstract.....	5
Ievads.....	6
1. Literatūras apskats.....	8
1.1. <i>Vaccinium</i> ģints ogas, to raksturojums un izmantošanas iespējas.....	8
1.2. <i>Vaccinium</i> ģints ogu polifenoli.....	11
1.2.1. Antociāni.....	12
1.2.2. Hidroksibenzoskābes.....	15
1.2.3. Hidroksikanēļskābes.....	15
1.2.4. Flavonoli.....	16
1.2.5. Flavan-3-oli un to dimēri.....	16
1.2.6. Polifenolu sadalījums augos.....	17
1.2.7. Flavonoīdu ietekme uz veselību.....	17
1.3. Ogās atrodamo polifenolu iegūšanas un izpētes metodes.....	18
1.3.1. Polifenolu ekstrakcijas metodes.....	18
1.3.2. Polifenolu analītiskās izpētes metodes.....	18
1.3.3. Bioloģiskās aktivitātes raksturošanas metodes.....	19
2. Materiāli un metodes.....	21
2.1. Izmantotā aparatūra.....	21
2.2. Ogu un to spiedpalieku iegūšana un sagatavošana izpētei.....	21
2.3. Ogu polifenolu ekstrakcija.....	22
2.3.1. Ekstrakcijas optimizēšana.....	22
2.3.2. Ekstraktvielu attīrīšana.....	24
2.4. Ogu polifenolu sastāva izpētes metodes.....	25
2.4.1. Ogu ekstraktvielu summāro parametru analīzes metodes.....	25
2.4.2. Ogu ekstraktvielu antiradikālās aktivitātes analīze.....	27
2.4.3. Ogu polifenolu hromatogrāfiskās analīzes metodes.....	28
2.5. <i>Vaccinium</i> ģints ogu polifenolu bioloģiskās aktivitātes raksturojums.....	30
2.5.1. Antimikrobiālās aktivitātes izpētes metodes.....	30
2.5.2. Ogu ekstraktvielu ietekmes uz epitēlijšūnu attīstību izpētes metodes.....	31

2.6. Datu apstrādes un statistiskās analīzes metodes.....	32
3. Rezultāti un to apspriešana	33
3.1. Ogu polifenolu ekstrakcijas iespēju izpēte	33
3.1.1. Ekstrakcijas metodes un apstākļu izpēte.....	33
3.1.2. Ekstrakcijā izmantoto solventu kompozīcijas optimizācija	41
3.2. Ogu polifenolu ekstraktu attīrīšana.....	50
3.3. Ogu polifenolu ekstraktu vispārējs raksturojums.....	52
3.4. Ogu polifenolu ekstraktu sastāva izpēte	54
3.4.1. Antociānu sastāva izpēte.....	54
3.4.2. Ogu ekstraktvielās esošo polifenolu sastāva izpēte	56
3.5. Ogu polifenolu ekstraktu bioloģiskās aktivitātes izpēte.....	60
3.5.1. Ogu ekstraktu ietekme uz epitēlijšūnām.....	60
3.5.2. Ogu ekstraktu antimikrobiālā aktivitāte.....	64
Secinājumi	70
Pateicības.....	71
Izmantotā literatūra	72
Pielikumi	83

Apzīmējumu saraksts

- ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolīn-6-sulfonskābe) (no angļu val. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*)
- DMEM – Dulbeko modificētā Īgla barotne (no angļu val. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*)
- DPPH - 2,2-difenil-2-pikrilhidrazilhidrāts
- EDTA- etilēndiamīntetraetiķskābes dinātrijs sāls
- FRAP – dzelzs reducēšanas kavēšanas potenciāls (no angļu val. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)
- FBS – fetālais teļa serums (no angļu val. *Fetal Bovine Serum*)
- HRMS – augstas izšķirtspējas masas spektrometrija (no angļu val. *High Resolution Mass Spectrometry*)
- MIC - minimālā inhibējošā koncentrācija (no angļu val. *Minimum Inhibitory Concentration*)
- MBC - minimālā baktericīdā koncentrācija (no angļu val. *Minimum Bactericidal Concentration*)
- NAC- N-acetil- L- cisteīns
- PBS – fosfātu buferšķīdums (no angļu val. *Phosphate Buffered Saline*)
- PCA – principiālo komponentu analīze (no angļu val. *Principal Component Analysis*)
- ppm – miljonā daļa (no angļu val. *parts per million*)
- ROS – reaģētspējīgās skābekļa formas (no angļu val. *Reactive Oxygen Species*)
- RSM - atbildes (reakcijas) virsmas metode (no angļu val. *Response Surface Methodology*)
- TFA- trifluoretiķskābe (no angļu val. *Trifluoroacetic Acid*)
- TBHP- terc-butilhidroperoksīds
- UPLC-PDA – ultra augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfs ar fotodiožu detektoru (no angl.val. *Ultra High Performance Liquid Chromatograph with Photo Diode Array*)
- UV – ultravioletais starojums

Kopsavilkums

Latvijas teritorijā savvaļā sastopamās un kultivētās *Vaccinium* ģints ogas ir nozīmīgs resurss ar plašu, bet neapzinātu izmantošanas potenciālu, to sekundāro metabolītu sastāva izpēte ir nozīmīgs uzdevums, kas var iezīmēt šo ogu izmantošanas iespējas pārtikas rūpniecībā un medicīnā. Maģistra darba mērķis ir pētīt *Vaccinium* ģints ogu spiedpaliekās esošo polifenolu iegūšanu un to attīrīšanas iespējas, kā arī veikt to ķīmiskā sastāva izpēti un bioloģiskās aktivitātes raksturošanu. Veiktā ogu polifenolu ekstrakcijas apstākļu izpēte un optimizācija ļāva identificēt ultraskaņas ekstrakciju kā visefektīvāko ekstrakcijas metodi. Izmantojot virsmas reakcijas metodi, tika noskaidrota optimālā polifenolu un antociānu ekstrakcijā izmantojamā šķīdinātāja koncentrācija- ar trifluoretiķskābi paskābināts metanols vai etanols. Pierādīta 37 polifenolu klātbūtne iegūtajos ekstraktos un noteikti to daudzumi, kas ļāva veikt hemotaksonomijas analīzi. *Vaccinium* ģints ogu polifenolu koncentrātus (polifenolu saturs līdz 56%) raksturo augsta brīvo radikāļu saistīšanas spēja, kas tika noskaidrota veicot šūnu citometrijas testus, tāpat tika parādīta iegūto ekstraktu spēja kavēt dermas fibroblastu proliferāciju. Iegūtie ekstrakti parāda antimikrobiālu aktivitāti pret dažādām cilvēkam patogēnām baktērijām (*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*).

Atslēgas vārdi: *Vaccinium*; polifenoli; ekstrakcija; optimizācija; fibroblasti; antimikrobiālā aktivitāte; brīvo radikāļu saistīšana

Abstract

Berries of *Vaccinium* spp. found in bogs and forests of Latvia are a valuable, yet unappraised, resource with a great potential for the use in food and medical industries. The aim of this work was to investigate the possibilities of the polyphenolic extraction from berry press residues, to analytically describe the polyphenolic extracts and to investigate the possible biological activity of these extracts. Performed investigation of possibilities for the extraction of berry phenolics revealed ultrasound assisted extraction to be the method of choice for berry press residues. Response surface methodology was used to identify the optimal solvent concentrations used for the extraction of total polyphenols and anthocyanins, it was found that ethanol and methanol acidified with trifluoroacetic acid gave the highest extraction yield. In total 37 individual polyphenols were identified and quantified in the prepared extracts, allowing to perform chemotaxonomic analysis. The prepared polyphenol concentrates (polyphenolic contents up to 56%) were described to have a high radical scavenging activity, which was measured *in vitro* by cell cytometry, also the extract ability to interrupt proliferation of dermal fibroblasts was observed. Moreover, the prepared concentrates show antimicrobial activity against various pathogenic microorganisms (*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*). Translated captions of figures and tables can be found in the supplement (2., 2.1., 2.2., pielikums).

Keywords: *Vaccinium*; polyphenols; extraction; optimisation; fibroblasts; antimicrobial activity; radical scavenging activity

Ievads

Augu valsts sekundāro metabolītu sastāva un īpašību izpēte ir nozīmīgs pētījumu virziens, gan no augu valsts evolūcijas, gan bioķīmisko procesu augos izpratnes viedokļa. No praktiskās izmantošanas viedokļa nozīmīgs izpētes objekts ir *Vaccinium* ģints augi – lielogu dzērvenes (*Vaccinium macrocarpon* L.), augstās krūmmellenes (*Vaccinium corymbosum* L.), parastās mellenes (*Vaccinium myrtillus* L.), brūklenes (*Vaccinium vitis-idaea* L.) un purva dzērvenes (*Vaccinium oxycoccos* L.), kas tiek kultivēti, kā arī to ogas tiek ievāktas savvaļā. Viena no vielu grupām, kuras nosaka *Vaccinium* ģints ogu izmantošanas iespējas un bioloģisko aktivitāti, ir polifenoli (ar vairākām hidroksilgrupām modificēti aromātiskas struktūras saturoši savienojumi, kas konjugēti ar ogļhidrāta atlikumu), kuriem piemīt spēja saistīt brīvos radikāļus un cita veida bioloģiskā aktivitāte. Savukārt polifenolu vidū īpaši atzīmējami ir antociāni – polifenolu grupa, kas nosaka *Vaccinium* ģints ogu krāsu, kā arī veic daudzas citas nozīmīgas funkcijas. *Vaccinium* ģints ogu ekstraktiem un to polifenoliem ir pierādītas spējas inhibēt dažādu mikroorganismu augšanu, vēža šūnu proliferāciju, spēja saistīt brīvos radikāļus un kavēt šūnu novecošanos, kā arī cita veida aktivitātes (Bagchi et al., 2004; Juranic and Zizak, 2005; Nile and Park, 2014). Neskatoties uz *Vaccinium* ģints ogu potenciāli augsto bioloģisko aktivitāti un plašajām to izmantošanas spējām, kā arī padziļinātas izpētes aktualitāti, to polifenoli, bet īpaši antociāni ir pētīti relatīvi maz. No otras puses, nozīmīga problēma ogu izmantošanas risinājumu izstrādē ir ogu spiedpalieku izmantošanas iespēju izpēte, kas pašlaik ir pārtikas (ogu sulas) ražošanas atkritumprodukti, kas turklāt veidojas lielos apjomos, bet potenciāli var kļūt par augstas pievienotās vērtības produktu avotu. Galvenā problēma ogu spiedpalieku izmantošanā ir saistīta ar metožu izstrādi, kas nodrošina mērķsavienojumu (piemēram, polifenolu) efektīvu izdalīšanu, izmantojot, vēlams, videi draudzīgus risinājumus, respektīvi, ekstrakcijas procesu optimizāciju, atbrīvojoties no nevēlamām vielām, bet koncentrējot izpētei un izmantošanai perspektīvus savienojumus, iegūtu ekstraktvielu sastāva izpēti, saistot to ar izpratnes attīstīšanu par *Vaccinium* ģints ogu sekundāro metabolītu sastāvu un to bioloģiskajām funkcijām.

Maģistra darba mērķis ir veikt *Vaccinium* ģints ogu spiedpalieku polifenolus saturoša ekstrakta iegūšanu un attīrīšanu, tā ķīmiskā sastāva izpēti un bioloģiskās aktivitātes raksturošanu.

Maģistra darba uzdevumi ir: a) izstrādāt polifenolu un īpaši antociānu ekstrakcijas metodi no *Vaccinium* ģints ogu spiedpaliekām un optimizēt ekstrakcijas apstākļus; b) pētīt attīrītā, izmantošanai perspektīvā polifenolu ekstrakta sastāvu; c) pētīt attīrītā polifenolu ekstrakta bioloģisko aktivitāti, respektīvi, spējas saistīt brīvos radikāļus *in vitro* un ietekmi uz izvēlētām baktēriju sugām un fibroblastu šūnām.

Maģistra darba rezultātu aprobācija

L. Klavins (2017) Ekstrakcijas optimizācija no *Vaccinium* ģints ogu spiedpaliekām. Latvijas Universitātes 75. zinātniskās konferences rakstu krājums "Kūdra un sapropelis – ražošanas, zinātnes un vides sinerģija resursu efektīvas izmantošanas kontekstā", 188.

L.Klavins, J.Kviesis, M.Klavins (2017) Comparison of methods of extraction of phenolic compounds from American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* L.) press residues. *Agronomy Research*, 15(2), 1316-1330.

L.Klavins, A.Kukela, M.Klavins (2017) Berry press residues as a valuable source of polyphenolics: extraction optimisation and analysis. Abstract book of the 11th Baltic conference on Food Science and Technology "Food science and technology in a changing world", 26.

1. Literatūras apskats

1.1. *Vaccinium* ģints ogas, to raksturojums un izmantošanas iespējas

Viens no svarīgākajiem Latvijas dabas resursiem ir ogas, kuras tradicionāli tiek izmantotas pārtikā un etnomedicīnā. Mūsdienās šo ogu izmantošanai pārtikas rūpniecībā, biofarmācijā un kosmetoloģijā tiek pievērsta arvien lielāka uzmanība, pateicoties šo ogu veselību uzlabojošajām īpašībām. Nozīmīgas cilvēka uzturā lietotas savvaļas un kultivētas ogas pieder pie *Vaccinium* ģints. *Vaccinium* ģinti pārstāv lielogu dzērvenes (*Vaccinium macrocarpon* L.), augstās krūmmellenes (*Vaccinium corymbosum* L.), parastās mellenes (*Vaccinium myrtillus* L.), brūklenes (*Vaccinium vitis-idaea* L.) un purva dzērvenes (*Vaccinium oxycoccos* L.) (1.1. tabula). *Vaccinium* ģints pieder pie augstākajiem augiem, atrodas sēklaugu nodalījumā, segsēkļu apakšnodalījumā, divdīgļlapju klasē, Ēriku (*Ericaceae*) dzimtā. Brūklenes, dzērvenes un mellenes savvaļā sastopamas Eirāzijas, Ziemeļamerikas un Grenlandes tundras, mežatundras un skuju koku mežu zonā, kā arī kalnos – attiecīgās joslās uz dienvidiem līdz Alpiem, Kaukāzam, Altajam, Korejai un Japānas ziemeļu salām (Ritchie, 1996; Mauriņš un Zvirgzds, 2006), bet atrodas arī Dienvidamerikā (Jacquemart, 1996). Melleņu izplatība Eiropā ir nedaudz plašāka un tā sniedzas līdz Portugāles ziemeļu daļai, kā arī Spānijai, Itālijai (Ritchie, 1996). Ziemeļu robežas nav zināmas, bet ir noskaidrots, ka tās atrodas tālu aiz polārā loka, turklāt mellenes atrastas augstumā līdz 3000 m virs jūras līmeņa.

Pasaulē zināmas 350 – 450 zīleņu un melleņu sugas, tomēr Latvijā savvaļā sastopamas tikai divas – parastā mellene *Vaccinium myrtillus* L. un parastā zilene *Vaccinium uliginosum* L. (Mauriņš un Zvirgzds, 2006). Zīleņu, brūkleņu, dzērveņu un melleņu izplatība Latvijas apstākļos ir samērā augsta – tas saistāms ar mitru mežu un purvu biotopiem, kas ir piemēroti to augšanai. Savukārt krūmmellenes ir samērā jauna krūmogulāju kultūra (20.gs. sākums), kas izveidota Ziemeļamerikā no vairākām savvaļas melleņu sugām. Latvijā šis krūms savvaļā nav sastopams. Krūmmelleņu šķirņu skaits pasaulē sasniedz jau vairākus simtus, bet plaši izplatītas ir ap 60 šķirnēm, kuras ir vispiemērotākās komercstādījumiem (U.S. Highbush Blueberry Council, 2017). Līdzīgi arī lielogu dzērvenes (Amerikas dzērvenes, dižbrūklenes) Latvijā nav sastopamas savvaļā, tās tika ievestas Eiropā no Ziemeļamerikas 19.gs. vidū. Krūmmellenes un lielogu dzērvenes tiek kultivētas purvainās, skābās augsnēs, šīs *Vaccinium* ģints ogas pārtikas industrijā tiek izmantotas visvairāk (gan svaigā veidā, gan pārstrādātas), pateicoties šo ogu ražīgumam, ātraudzībai un piemērotībai Latvijas klimatam (U.S. Highbush Blueberry Council, 2017; US Cranberries, 2017).

Brūklenes ir plaši sastopamas visā Latvijas teritorijā, tās aug skuju koku un jauktajos mežos, purvos, krūmājos un izcirtumos. Brūklene ir līdz 25 cm augsts mūžzaļš puskrūms

ar ložņājošu sakneni un stāviem zarainiem stumbriem. Tradicionālajā medicīnā pārsvarā tiek lietots brūkleņu lapu uzlējums, lai ārstētu podagru vai kā diurētisku līdzekli nierakmeņu ārstēšanai. Ogas tiek izmantotas kā pretiekaisuma līdzeklis, augstas ķermeņa temperatūras samazināšanai un kā ēstgribu veicinošs līdzeklis (Rubine u.c., 1974). Mūsdienās pārsvarā tiek lietoti produkti, kas gatavoti no ogām, piemēram, sulas, ievārījumi, kā arī uztura bagātinātāji ar pretiekaisuma īpašībām (piemēram, pret urīnceļu iekaisumiem). Latvijā šīs ogas netiek kultivētas, tās tiek ievāktas savvaļā.

Mellene ir 15–20 cm augsts, neliels, vasarzaļš, zarains krūms ar šķautņainu stumbru, kas plaši sastopams visas Latvijas priežu egļu un jaukto koku mežos. Izmantošanai tautas medicīnā tiek atzīmēta melleņu savelkošā iedarbība, ko nosaka mellenēs esošās miecvielas. Melleņu drogas (ogas) spēj samazināt cukura daudzumu asinīs, tās tiek lietotas, lai samazinātu akūtus un hroniskus kuņģa un zarnu trakta darbības traucējumus, caureju bērniem. Ogu izvilkumi tiek lietoti arī pret žagām, cingu, gastrītu un kolītu (Rubine u.c., 1974). Arī mūsdienās mellenes tiek bieži pievienotas dažādām ārstnieciskām tējām. Pateicoties melleņu maigajam aromātam un intensīvajai krāsai, tās tiek plaši izmantotas dzērienu un piena produktu ražošanā. Kosmētikas rūpniecībā izmanto melleņu sēkliņu eļļu, tā satur daudz nepiesātinātās omega-3 un omega-6 taukskābes (Aston Chemicals, 2017).






Purva dzērvenes ir plaši izplatītas Latvijas purvos, tie ir aptuveni 5 cm augsti, 10–80 cm gari, ložņājoši krūmi. Purva dzērvenes tiek pārsvarā izmantotas ievārījumu (augsts pektīna saturs), alkoholisko dzērienu gatavošanai vai etnomedicīnā, tās ir aromātiskākas, kā lielogu dzērvenes. Ogas tiek ievāktas savvaļā, grūti pieejamos purvos, tās netiek kultivētas, tāpēc to iegūšanas apjomi ir salīdzinoši mazi. Medicīnā šīs ogas tiek izmantotas, lai novērstu dažāda veida infekciju slimības, augstu temperatūru un, lai samazinātu kuņģa skābes veidošanos (NatureGate, 2017).

Lielogu dzērvenes, to pieejamības dēļ, ir guvušas lielu popularitāti patērētāju vidū. Šīs ogas Latvijā tiek komerciāli audzētas plašās purva teritorijās. Lielogu dzērvene ir mūžzaļš krūms, kas var veidot līdz pat 1 metru gariem horizontāliem stublājiem. Lielogu dzērveņu ogas plaši tiek patērētas svaigā veidā, bet to sula, pateicoties to konservējošajām īpašībām, tiek pievienota citiem produktiem, kā dabīgs konservants. Ogu ekstrakti tiek pievienoti dažādiem uztura bagātinātājiem, kas izmantojami profilaktiskai urīnceļu infekciju ārstēšanai. Lielogu dzērveņu sula tiek rekomendēta kā probiotiķis, jo tā sekmē zarnu mikrofloras attīstību (AgMRC, 2017).

Tāpat kā lielogu dzērvenes, arī krūmmellenes tiek plaši kultivētas visā Latvijas teritorijā. Krūmmellenes ir 2–4 m augsti krūmi, kas zied maijā un ogu ražu dod no jūlija līdz augustam. Ražas laikā ogu krūmi spēj veidot lielus, zilu ogu ķekarus, kas tiek izmantots arī

apstādījumos kā dekoratīvs elements. Šīs ogas visvairāk izmanto svaigā veidā, pateicoties to izskatam (lielas, sulīgas ogas), tās pievienojot dažādiem desertiem, piena produktiem un izmanto sulas iegūšanai. Medicīnā tiek izmantotas gan krūmmelleņu ogas, gan lapas, lai ārstētu caureju, aterosklerozi, acu slimības, diabētu (Wildflower center, 2017).

1.1. tabula. Pētījumā izmantotās *Vaccinium* ģints ogas.

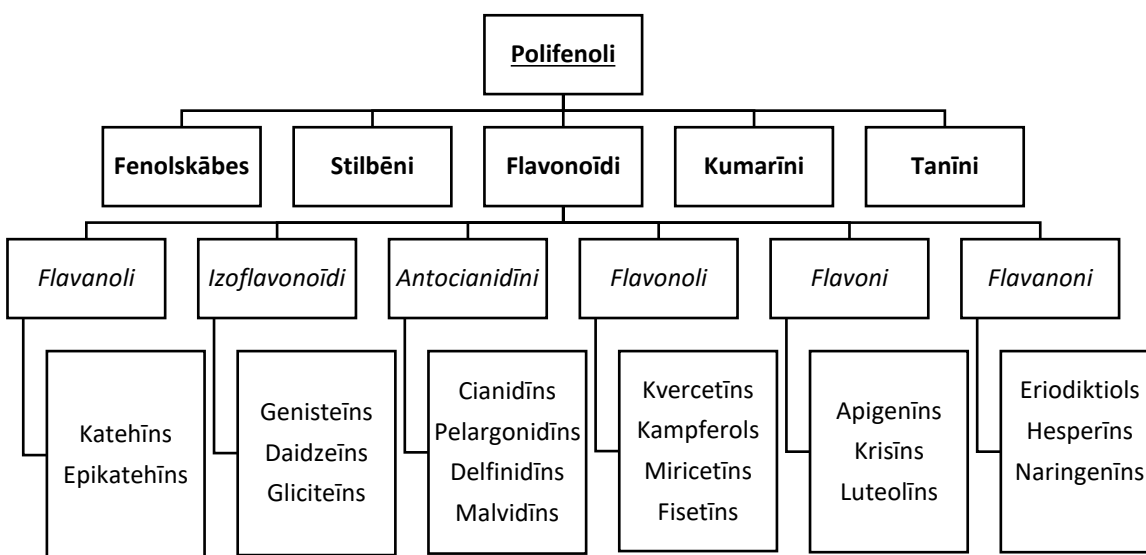
Nosaukums latīņu val.	Nosaukums latviešu val.	Nosaukums angļu val.	Attēls
<i>Vaccinium macrocarpon</i> L.	Lielogu dzērvene	<i>American cranberry</i>	
<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	Augstā krūmmellene	<i>Blueberry</i>	
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Parastā mellene	<i>Bilberry</i>	
<i>Vaccinium oxycoccos</i> L.	Purva dzērvene	<i>Bog cranberry</i>	
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	Brūklene	<i>Lingonberry/cowberry</i>	

Ņemot vērā *Vaccinium* ģints ogu plašās izmantošanas iespējas dažādu infekciju novēršanai un slimību ārstēšanai ir svarīgi pētīt to sastāvu. *Vaccinium* ģints ogas satur vitamīnus, minerālos elementus, organiskās skābes, fenola savienojumus, glikozīdus un antociānus, kuriem ir spēcīgu antioksidantu īpašības. Ogas krāsu nodrošina ūdenī šķīstoši pigmenti – antociāni, kas, iespējams, ir būtiski veselību uzlabojoši savienojumi (potenciāli ietekmē iekaisuma procesus, sirds un asinsvadu saslimšanas), to koncentrācija ogās ir īpaši augsta.

1.2. *Vaccinium* ģints ogu polifenoli

Polifenoli ir augu sekundārie metabolīti, kas sastāv no aromātisko ogļūdeņražu gredzeniem, kuros viens vai vairāki ūdeņraža atomi aizvietoti ar fenolu hidroksilgrupām. Augi satur lielu fenolu un polifenolu dažādību, piemēram, benzoskābes, kanēļskābes, flavonoīdus, izoflavonoīdus, lignānus, tanīnus un citus. Ogās galvenās fenolu klases ir hidroksibenzoskābes, hidroksikanēļskābes, flavonoli, antociāni, flavan-3-oli, proantocianidīni un elagitanīni (1.1. attēls).

Polifenolu biosintēzes nozīmīgs starpprodukts ir fenilalanīns, kura priekštecis ir šikīmskābe, no kuras sekojoši veidojas trans-kanēļskābe, kas ir prekursors daudzām fenolskābēm. T-kanēļskābe var pārvērsties par p-kumarīnskābi, kuras molekula savukārt var tikt hidroksilēta 3 un 5 pozīcijā un metilēta veidojot kafijskābi, ferulīnskābi un citas vielas – visus šos savienojumus sauc par fenilpropanoīdiem un tie satur fenola gredzenu (C6) un blakus virkni (C3) (Shahidi and Nacz, 2003; Shahidi and Chandrasekara, 2010).



1.1. attēls. Polifenolu klasifikācija ar flavonoīdu grupās ietilpstošo vielu piemēriem.

Arī benzoskābes atvasinājumi tiek sintezēti no fenilpropanoīdiem, atšķeļot divus oglekļa atomus saturošu virkni. Fenilpropanoīdu hidroksilēšana un metilēšana noved pie dažādu savienojumu sintēzes, piemēram, dihidroksibenzoskābes, protokatehīnskābes, vanilīnskābes, ceriņskābes, gallusskābes. Hidroksibenzoskābes visbiežāk ir sastopamas saistītā formā un ir sarežģītu struktūru sastāvdaļa, veidojot, piemēram, tanīnus, kā arī to vienkāršā formā kā organiskās skābes un cukuru atvasinājumi (Shahidi and Nacz, 2003; Robert and Mike, 2006).

Flavonoīdi veidojas kondensācijas reakcijā ar malonilkoenzīmu A no fenilpropanoīdiem (C6–C3), veidojot halkonus un pēcāk skābā vidē cikliskus savienojumus. Šādā veidā tiek veidoti flavanoli, flavan-3-oli un citi ar tiem saistīti savienojumi. Kopumā aprakstīti ir ap 8150 dažādu flavonoīdu, tie iedalās 12 klasēs un atšķiras ar molekulā esošo gredzenu aizvietotību (Markham and Andersen, 2006) (1.1. attēls).

1.2.1. Antociāni

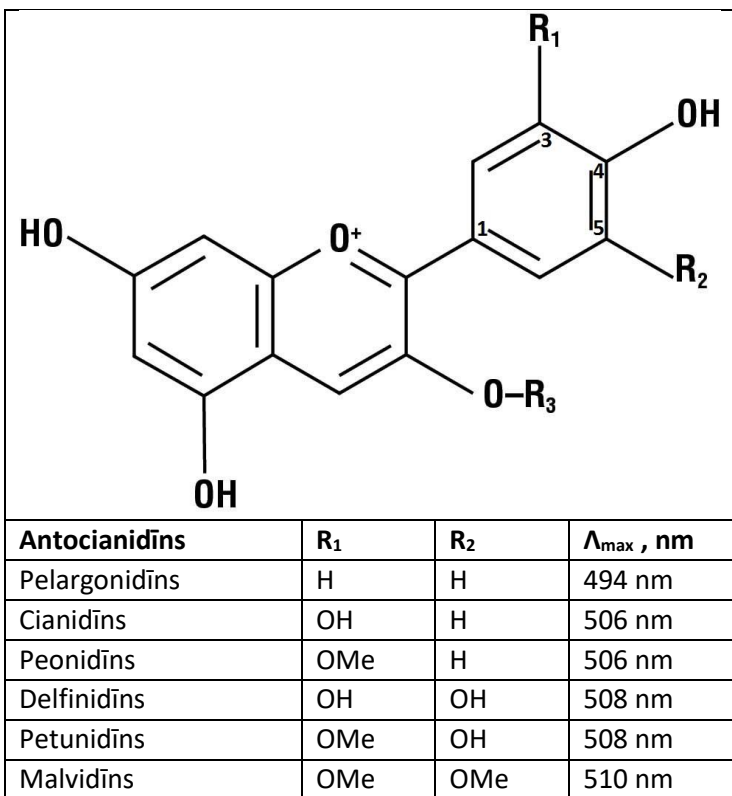
Vārds antociāni ir cēlies no grieķu vārdiem *anthos* (zieds) un *kyanos* (zils), kas senāk tika izmantots, lai aprakstītu rudzupuķes (*Centaurea cyanus*) ziedus. Antociāni ir polifenoli, kas atbild par augu pigmentāciju (ziedi, augļi, lapas), sākot ar gaiši rozā krāsu līdz pat sarkanai, violetai vai tumši zilai krāsai, un tie ir lielākā ūdenī šķīstošo pigmentu grupa ar augu izcelsmi (Strack and Wray, 1994). Pēdējo desmit gadu laikā ir strauji pieaudzis identificēto antociānu skaits, kas ir izskaidrojams ar modernu metožu izmantošanu to identifikācijā un paaugstināto interesi par šīm molekulām to iespējamās bioloģiskās aktivitātes dēļ. Šobrīd pilnībā aprakstītas ir 575 antociānu molekulas un to struktūras (Andersen and Jordheim, 2006; Andersen, 2007) .

Balstoties uz zināmajiem flavonoīdu biosintēzes ceļiem, ir pieņemts uzskatīt, ka dažādas flavonoīdu grupas ir parādījušās secīgi augu evolūcijas ceļā. Saskaņā ar šo pieņēmumu vienkāršākas vielu grupas (piemēram, flavanoni), kas parādās ātrāk biosintēzes ceļā, ir radušās pirmajos augos, kas veica fotosintēzi, bet vielu grupas, kas biosintēzes ceļā parādās vēlāk, ir sastopamas augos, kas evolucionāri izcēlušies nesen (Stafford, 1991; Cooper-Driver and Bhattachary, 1998). Jaunākos pētījumos šie pieņēmumi tiek apstrīdēti, jo antociāni ir atrasti aknu sūnās un paparžaugos, kas nozīmē, ka spēja sintezēt antociānus ir daudz senāka, nekā tika uzskatīts un evolūcijas gaitā antociāni ir ieguvuši daudzas funkcijas, kas saistītas ar augu fizioloģiju.

Antociāni sastāv no aglikona (antocianidīns), ogļhidrāta paliekas un diezgan bieži tie satur acilgrupas. Antociāna aglikona daļu veido C₁₅ struktūra (C6–C3–C6) (Andersen and Jordheim, 2006). Zemā pH antociānu molekulām ir pozitīvs lādiņš, šo formu sauc par flavīlija katjonu, pH vērtībām mainoties, antociānu molekula var mainīt atomu un saišu izvietojumu, tādējādi mainot krāsu. Neskatoties uz antociānu dažādību (aptuveni 30 dažādas vielas), aptuveni 90% no visiem antociāniem sastāv no pelargonidīda, cianidīna, delfinidīna, peonidīna, petunidīna vai malvidīna, kas savā starpā atšķiras ar 3. gredzena metoksilētajām un hidroksilētajām grupām B gredzenā (Andersen and Jordheim, 2006) (1.2. attēls).

Lielākā daļa antociānu pie C3 hidroksilgrupas satur 1, 2 vai 3 ogļhidrāta atlikumus. Ogļhidrāta atlikums var saistīties ne tikai pie 3. pozīcijas, bet arī pie 5., 7. un retāk pie 4. pozīcijas (Brouillard, 1988; Fossen et al., 2003; Williams and Grayer, 2004) ar ēteru saitēm (Saito et al., 2003). Antociānu struktūras veidošanā visbiežāk piedalās glikoze (90%), ramnoze, galaktoze, ksiloze, arabinoze (1.2. attēls, R₃). Visretāk sastopamais ar

antocianidīniem konjugētais monosaharīds ir glikuronskābe (Andersen and Jordheim, 2006).



1.2. attēls. Dabā visbiežāk sastopamie antocianidīni, to B–gredzena aizvietojošās grupas (satur R₁ un R₂) un savienojumu sorbcijas maksimumi (Giusti and Wrostad, 2003).

Vairāk kā 65% no identificētajiem antociāniem, kam noteikta struktūra, ir acilēti un antociānu daudzveidība ir cieši saistīta ar to spēju savienoties ar acilgrupām (Andersen and Jordheim, 2006). Antociānu cukura vienības var tikt acilētas ar alifātiskām vai aromātiskām acilgrupām. Aromātiskās acilgrupas ietver dažādas hidroksikanēļskābes (p-kumarīnskābe, kafijskābe, ferulīnskābe) un hidroksibenzoskābes (p-hidroksibenzoskābe, gallusskābe). Alifātiskās acilgrupas veido malonskābe (visbiežāk sastopamais acilatlikums antociānu molekulās), etiķskābe, maleīnskābe, dzintarskābe, vīnskābe, skābeņskābe (Andersen and Jordheim, 2006).

Daudz pūļu ir pielikts, lai izskaidrotu krāsu variācijas, ko spēj dot antociānu molekulas augos un īpaša uzmanība tiek pievērsta zilajai krāsai (Brouillard and Dangles, 1994; Andersen and Jordheim, 2006). Tiek izdalīti četri mehānismi, kas stabilizē antociānus šūnas iekšienē: 1) pašasociācija, 2) intramolekulāra kopigmentācija, 3) intermolekulāra kopigmentācija starp dažādām molekulām un 4) kompleksu veidošana starp antociāniem un metāla joniem (Nerdal and Andersen, 1991). Papildus faktori (antociānu līdzsvara formas, to glikozilēšana un acilēšana, ārējo faktoru iedarbība, kā pH, temperatūra) var ietekmēt iepriekš minētos stabilizācijas mehānismus. Kopigmentācija kopā ar pH ir

visbūtiskākais mehānisms, kas ietekmē krāsu veidošanos tieši zilajos ziedos (Goto and Kondo, 1991; Brouillard and Dangles, 1994; Harborne and Williams, 2000) .

Retos gadījumos antociānu molekulas veido kompleksus ar metāla joniem, kas var būtiski ietekmēt antociānu krāsu. Piemēram, komelinīna molekula, kas tika atklāta *Commelina communis* ziedos, ir molekula, kas satur divus magnija atomus un veido makromolekulu ar sešām konjugētām antociānu struktūrām un sešiem flavonu atlikumiem (Kondo et al., 1992). Ir zināms arī tas, ka antociāni ar hidroksilgrupām orto- pozīcijās var veidot kompleksus ar trīskārši lādētiem metāla joniem, kas ietekmē, piemēram, krāsu izmaiņas *Hydrangea macrophylla*, ko izraisa pH izmaiņas un alumīnija jonu kompleksācija (Kondo et al., 1992).

Antociāni ir iesaistīti insektu un citu dzīvnieku pievilināšanā apputeksnēšanas un sēklu dispersijas sekmēšanai (Strack and Wray, 1994; Harborne and Williams, 1995). Antociānu lokalizēšanai augšējā lapu daļā vai epidermālajās šūnās ir fizioloģiska nozīme auga izdzīvošanai. Antociānu daudzums palielinās, kad augs tiek pakļauts aukstumam, barības vielu deficītam (fosfātu deficīts), kaitēkļu uzbrukumam, patogēnu uzbrukumam. Šajā kontekstā antociāni pilda adaptogēna funkciju sausuma, aukstuma stresa pārvarēšanai, oksidatīvā stresa un UV gaismas ietekmes samazināšanai (Simmonds, 2003; Close and Beadle, 2003).

Pēdējo piecpadsmit gadu laikā antociāniem ir pievērsta liela uzmanības saistībā ar to potenciālo ietekmi uz veselību un tie tiek pieskaitīti pie nozīmīgām vielu grupām funkcionālās pārtikas izstrādei. Šī interese radusies pateicoties to iespējamajai aktivitātei kā antioksidantiem un tiem ir potenciālas izmantošanas iespējas kardiovaskulāru slimību ārstēšanā, vēža ārstēšanā, dažādu vīrusu inhibēšanā (HIV-1) un redzes uzlabošanā (Kamei et al., 1995; Nakaishi et al., 2000; Stintzing et al., 2002; Wrolstad et al., 2002; Moyer et al., 2002; Rechner and Kroner, 2005; Cecchini et al., 2005; Cooke et al., 2005; Beattie et al., 2005; Jang et al., 2005; Kalt, 2014; Yusuf et al., 2016). Antioksidatīvās īpašības un citas veselību uzlabojošās īpašības, kas novērotas *in vitro*, ir atkarīgas no šo savienojumu absorbcijas *in vivo*, to metabolisma un sadalījuma organismā (Rice-Evans, 2003). Neskatoties uz to, ka daudzi pētījumi ir parādījuši antociānu minimālo absorbciju serumā, interese par šīm molekulām joprojām nav mazinājusies, jo nesenāki pētījumi parāda antociānu pozitīvo iedarbību kuņģa–zarnu traktā (He et al., 2009).

Plašā antociānu sastopamība ziedaugos ļauj tos izmantot hemotaksonomijā, lai identificētu augus (Cooper-Driver, 2001). Ņemot vērā ziedu krāsu veidošanās biosintēzes ceļu, kas ir plaši izpētīts, var atlasīt ģēnus, kas kodē šī ceļa enzīmus, no publiski pieejamām DNS datubāzēm.

Cilvēki uzturā izmanto daudzus produktus, kas ir bagāti ar antociāniem, piemēram, dažādi augļi, ogas, sarkanvīns, sakņaugi un citi dārzeņi. Cianidīns ir pārtikā visvairāk atrodamais antocianidīns (Manach et al., 2004). Antociānu daudzums, kas atrodams pārtikas

produktos, visbiežāk ir proporcionāls krāsas intensitātei un, piemēram, var sasniegt no 2 līdz 4 g antociānu uz kg melleņu. Augļiem nogatavojoties, antociānu daudzums var palielināties. Vīns satur aptuveni 220–340 mg antociānu/L un vīnam nogatavojoties antociāni var veidot dažādas kompleksas struktūras tādējādi mainot vīna krāsu. Nav skaidri noteikts dienā uzņemamo antociānu daudzums, tas svārstās no 5 līdz 9 mg dienā, līdz 215 mg vasarā un 180 mg ziemā (Clifford and Brown, 2005).

Vēsturiski antociānus saturoši produkti ir lietoti dažādiem mērķiem. Piemēram, Otrā Pasaules kara laikā Britu Karalisko gaisa spēku pilotu ēdienkartē tika iekļautas mellenes, tādējādi uzlabojot viņu redzi lidojot naktī. Černobiļas AES avārijā cietušajiem cilvēkiem tika ieteikts uzturā lietot daudz aroniju, tādējādi samazinot augsto radioaktivitātes devu izraisītās sekas (Wrolstad, 2004).

Pasaulē ir palielinājusies interese par dabīgas izcelsmes krāsvielu izmantošanu, kas saistīta ar patērētāju interesi par dabīgiem produktiem un sintētisku krāsvielu izmantošanas ierobežojumiem. Tirgū, arī Latvijā, ir pieejamas dažādas izcelsmes dabīgas krāsvielas, kas ražotas no vīnogām (*Vitis* spp.), plūškoka ogām (*Sambucus nigra*), sarkanajiem kāpostiem (*Brassica oleracea*), aronijām (*Aronia melanocarpa*). Neskatoties uz šādu produktu pieejamību, tos pārsvarā izmanto tikai dzērienu un saldumu ražošanā, ņemot vērā to zemo stabilitāti ūdens šķīdumos, kur pH ir augstāks par 3.

1.2.2. Hidroksibenzoskābes

Hidroksibenzoskābes ir benzoskābes atvasinājumi. Šo skābju dažādību nosaka aromātiskā gredzena hidroksilēšana un metilēšana atšķirīgās aromātisko gredzenu pozīcijās, tās var būt sastopamas šķīstošā formā konjugētas ar cukuriem vai organiskajām skābēm, vai arī piestiprinātas pie šūnas sienām (lignāna) (Schuster and Herrmann, 1985; Strack, 1997). Hidroksibenzoskābes, kas atrodamas ogās, ir p-hidroksibenzoskābe, gallusskābe, protokatehīnskābe, vanilīnskābe, ceriņskābe. *Vaccinium* un *Rubus* ģints ogas, piemēram, mellenes, zilenes, brūklenes, lācenes, aronijas un avenes satur daudz hidroksibenzoskābju (Määttä-Riihinen et al., 2004a; Määttä-Riihinen et al., 2004b; Taruscio et al., 2004; Mattila et al., 2006). Gallusskābe tika identificēta kā visvairāk sastopamā hidroksibenzoskābe avenēs, lācenes, rožu augļos, bet protokatehīnskābe lielos daudzumos atrasta brūklenēs, dzērvenēs, ērkšķogās, jāņogās un upenēs (Mattila et al., 2006; Tuberoso et al., 2010).

1.2.3. Hidroksikanēļskābes

p- kumarīnskābe, kafijskābe un ferulīnskābe ir visbiežāk sastopamās hidroksikanēļskābes augos, kuras ir saistītas pie šūnapvalka vai atrodas citoplazmā konjugētas ar ogļhidrātiem. Tikai neliela daļa no visām augos atrodamajām hidroksikanēļskābēm ir brīvā formā. Dažādi kafiju saturoši dzērieni, kā arī āboli, pīlādži un mellenes satur daudz hidroksikanēļskābes, piemēram, hlorogēnskābi, kas ir kafijskābes esteris un ir plaši sastopams augos (Mattila et al., 2006). Ferulīnskābe un p-kumarīnskābe ir galvenās kanēļskābes, kas ir saistītas ar hemicelulozi un citiem šūnapvalka materiāliem (Andreasen

et al., 2001; Niño-Medina et al., 2010). Tādas hidroksikanējskābes kā sinepskābe ir atrasta rapšu sēklās (Vuorela et al., 2003; Khattab et al., 2010), pīlādži satur daudz hlorogēnskābes (Kähkönen et al., 2001; Hukkanen et al., 2006; Mattila et al., 2006), mellenes, aronijas un krūmmellenes un dažādi pīlādžu kultivāri satur daudz kafijskābes atvasinājumu (Määttä-Riihinen et al., 2004a; Määttä-Riihinen et al., 2004b; Taruscio et al., 2004; Hukkanen et al., 2006; Mattila et al., 2006), upenes, jāņogas, brūklenes, dzērvenes, lācenes, avenes, zemenes, smiltsērķšķi satur daudz p-kumarīnskābes, bet to kopējais hidroksikanējskābju daudzums ir zems (Määttä-Riihinen et al., 2004a; Määttä-Riihinen et al., 2004b; Taruscio et al., 2004; Mattila et al., 2006).

1.2.4. Flavonoli

Kampferols, kvercētīns, miricētīns un izoramnetīns ir galvenie ogās sastopamie flavonoli. Pārtikā visbiežāk tie ir *O*-glikozīdu veidā, kur glikoze ir visbiežāk sastopamais cukura atlikums. Flavonoli ir ar iedzeltenu krāsu, tiem ūdenī ir zema šķīdība un tie sastopami aptuveni 80% augstāko augu lapās vai augļos (Kühnau, 1976). Krūmmellenes, mellenes un upenes satur daudz flavonolu, it īpaši kvercētīnu. Mellenēs ir īpaši augsta flavonolu koncentrācija, to sastāda kvercētīna un miricētīna atvasinājumi (Häkkinen et al., 1999; Määttä-Riihinen et al., 2004a; Borges et al., 2009). Lielogu dzērveņu spiedpaliekās ir atrodams daudz flavonolu, tikmēr lācenēs un avenēs, kas ir *Rubus* ģints ogas, tika atrastas ļoti zemas flavonolu koncentrācijas. Kopumā ņemot kvercētīnu atvasinājumi ir visvairāk sastopamie flavonoli, ar izņēmumiem, piemēram, ērkšķogās, kur galvenais flavonols ir izoramnetīns, un upenēs, smiltsērķšķos, kur galvenais flavonols ir miricētīns (Määttä-Riihinen et al., 2004a; Määttä-Riihinen et al., 2004b; Taruscio et al., 2004; Borges et al., 2009; Tuberoso et al., 2010).

1.2.5. Flavan-3-oli un to dimēri

Proantocianidīni ir veidoti no flavan-3-olu vienībām, savienojot tos ar interflavanu saitēm. Flavan-3-oliem ir C₆–C₃–C₆ flavonoidu struktūra. Visizplatītākie flavan-3-oli ir (+) katehīns, (-) epikatehīns, gallokatehīns un epigallokatehīns. Monomērās flavanu struktūras ir savienotas ar citām flavanu vienībām ar C-C (oglekļa) saitēm. B tipa proantocianidīniem ir viena interflavanu saite, kura C₄ pozīcijā savienojas ar citas vienības C₈ vai C₆. A tipa proantocianidīniem ir divas interflavanu saites, kur viena saite veidojas no C₄ ar C₆ vai C₈ un otra saite veidojas no C₂ ar C₅ vai C₇ (Santos-Buelga et al., 2000). Dabā ir sastopami proantocianidīni, kuri veidoti no 2 līdz 10 flavanu vienībām. Šis polimēru molekulas spēj izgulsnēt proteīnus, tajā pašā laikā tās var viegli sabrukt paaugstinātā temperatūrā, skābā vidē vai skābekļa iedarbībā.

Proantocianidīni ir atrodami kakao augļos, kā arī daudzās ogās, piemēram, aronijās, dzērvenēs un brūklenēs (Määttä-Riihinen et al., 2004a; Hellström et al., 2009). Visbiežāk ir sastopami B tipa proantocianidīni, bet plaši sastopami ir arī A tipa proantocianidīni tādās ogās kā lielogu dzērvenes, brūklenes, mellenes, melnās vistenes u.c. (Hellström et al., 2009). No medicīnā izmantojamajiem flavonoīdiem proantocianidīni ir ar vislielāko izmantošanas potenciālu.

1.2.6. Polifenolu sadalījums augos

Polifenolu savienojumi ir nevienmērīgi sadalīti augos (Macheix et al., 1990). Zināšanas par polifenolu sadalījumu augos ļautu sagatavot produktus, kas ir bagāti ar šīm vielām un optimizēt polifenolu ekstrakcijas iznākumus, iegūstot tos maksimāli lielus. Šie savienojumi ir pārsvarā lokalizēti šūnapvalkā, kur atrodams lignīns un dažādas vienkāršākas uzbūves molekulas (flavonoīdi, ferulskābes esteri), vai vakuolās, kur lokalizējas šķīstoši polifenoli un to atvasinājumi. Vīnogās flavonolu glikozīdi, antociāni un hidroksikanēļskābes esteri akumulējas subepidermālajās šūnās (Moskowitz and Hrazdina, 1981).

Šķīstošie polifenoli pārsvarā uzkrājas augļu ārējos šūnu slāņos – epidermālajās un subepidermālajās šūnās, nevis augļa iekšpusē, mīkstumā (Macheix et al., 1990). Ļoti liela loma polifenolu sintēzē ir gaismai, tieši tāpēc lielākā daļa polifenolu ir atrodami tieši ogu un augļu miziņās. Upenēs, vīnogās, ābolos un persikos flavonolu glikozīdi ir pārsvarā atrodami augļa mizā (Price et al., 1999). Antociāni var būt sadalīti visā augā (zemenes, upenes, mellenes), vai tikai miziņā (krūmmellenes, lieloģu dzērvenes). Arī katehīni un tanīni visbiežāk ir atrodami lielākās koncentrācijās tieši ārējos augļa slāņos. Bumbieros un ābolos (+) katehīns un (-) epikatehīns ir augstākās koncentrācijās mizā nekā visā pārējā auglī. Tāpat arī hidroksikanēļskābes ir atrastas augstākās koncentrācijās gatavu augļu mizā, bet ābolos hidroksikanēļskābes sadalījums ir atkarīgs no ābolu kultivāra (Macheix et al., 1990; Price et al., 1999; Pandey and Rizvi, 2009). Polifenolu sadalījums un koncentrācija augos un to augļos ir atkarīga no nogatavināšanās pakāpes, kopumā tiek uzskatīts, ka polifenolu koncentrācija ir augstāka negatavos augļos un svaigos dzinumos. Gaišiem augļiem nogatavojoties polifenolu saturs vienmērīgi samazinās (gaišās vīnogas, mango, banāni), bet sārtiem augļiem polifenolu saturs strauji paaugstinās tieši nogatavošanās pēdējā stadijā, kas ir skaidrojams ar antociānu akumulāciju augļos (Macheix et al., 1990; Pandey and Rizvi, 2009).

1.2.7. Flavonoīdu ietekme uz veselību

Flavonoīdu ietekme uz veselību, to spēcīgā antioksidatīvā iedarbība un *in vitro* efekti tiek pētīti jau kopš 1966. gada (Clemetson and Andersen, 1966). Flavonoīdi ne tikai darbojas kā spēcīgi antioksidanti, bet tiem ir arī potenciāla nozīme dažādu nevēlamu transkripcijas faktoru inhibīcijā, piemēram, NF-kB transkripcijas faktors, kurš regulē daudzus gēnus, kas atbildīgi par atbildi uz iekaisuma stresu (Karlsen et al., 2008). Ir pieņemts uzskatīt, ka flavonoīdi tiek absorbēti pasīvās difūzijas ceļā pēc glikozīdu grupu atšķelšanas, ko veic zarnu mikrobiota (Hollman et al., 1995). Tiek pievērsta arī uzmanība šo savienojumu spējai efektīvi inhibēt šūnas ciklu, šūnu dalīšanos, oksidatīvo stresu, inducēt detoksifikācijas enzīmus, apoptozi un imūnsistēmas aktivizēšanu. Flavonoīdi arī uzlabo kognitīvās funkcijas (Zafra-Stone et al., 2007). Procianidīni, it īpaši A-tipa procianidīni, kas atrodami dzērvenēs, traucē uropatogēno baktēriju piestiprināšanos pie urīnceļiem (Foo

et al., 2000), dzērvēnes saturoši produkti ir plaši pieejami aptiekās un tiek piedāvāti kā preventīvi līdzekļi urīnceļu iekaisumiem.

1.3. Ogās atrodamo polifenolu iegūšanas un izpētes metodes

1.3.1. Polifenolu ekstrakcijas metodes

Ekstrakcija ir viens no vissvarīgākajiem soļiem polifenolu izpētē, identifikācijā un izmantošanā, tomēr, neskatoties uz to, nav izveidota viena, standartizēta ekstrakcijas metode šo savienojumu iegūšanai. Ekstrakcijas izmantojot šķīdinātājus ir visbiežāk izmantotā tehnika polifenolu izdalīšanai (Baydar et al., 2004; Bucic-Kojic et al., 2007). Liels pētījumu skaits tiek veltīts polifenolu analīzei un ekstrakcijai no augļiem, dārzeņiem, vīna, kafijas, tējas, garšaugiem, labības (Balasundram et al., 2006; Luthria and Pastor-Corrales, 2006; Naczk and Shahidi, 2006). Polifenoli tiek ekstrahēti izžāvējot, liofilizējot un sasmalcinot izmantojamo augu materiālu un lietojot solventus, lai šos savienojumus atgūtu. Izmantojot šādu pieeju iegūst ne tikai polifenolus, bet arī citus savienojumus, piemēram, cukurus, organiskās skābes un proteīnus no kā ir jāatbrīvojas papildus attīrīšanas soļos (Castaneda-Ovando et al., 2009).

Polifenolu savienojumu iegūšanai pārsvarā izmanto cietās fāzes–šķidrums (*solid-liquid*) un šķidrums–šķidrums ekstrakciju, kur polifenolus saturošs augu materiāls tiek sajaukts ar solventu. Šķīdinātājs, kam ir līdzīga polaritāte ar interesējošo vielu grupu, sevī uzņem šos savienojumus, tādējādi veidojot tīru ekstraktu. Šāda pieeja tiek lietota ražošanā, kur veidojas šķidri blakusprodukti, piemēram, dzērienu industrijā (Muller et al., 2008). Cietās fāzes–šķidrums ekstrakcija balstās uz masas transporta procesu, kad cietas vielas, kas atrodas matricā, izšķīst apkārt esošajā šķīdinātājā. Šo metodi izmanto lieltonnāžas ražošanā, lai atgūtu vērtīgas vielas, piemēram, saharozi no cukurbietēm vai cukurniedrēm, lipīdus no rapšu sēklām, dzīvnieku barībā izmantojamus proteīnus, fitoķīmikālijas un polifenolus no augļiem vai dārzeņiem. Vairāki faktori ietekmē ekstrakcijas iznākumu– temperatūra, materiāla–šķīdinātāja attiecība, daļiņu izmērs, lietotais šķīdinātājs (Hayouni et al., 2007). Visbiežāk izmantotie solventi šāda veida ekstrakcijai ir paskābināts etanols un metanols, bet izmantots tiek arī etilacetāts, hloroforms, 2–10M NaOH, petrolēteris, acetons, heksāns, dietilēteris un ūdens (Ignat et al., 2011). Tiek izmantotas arī konvencionālas ekstrakcijas metodes, piemēram, sildīšana, vārīšana, vārīšana zem atceses, bet šīs metodes var samazināt polifenolu koncentrāciju ekstraktos pateicoties tam, ka nestabilās molekulas var hidrolizēties vai oksidēties. Pēdējos 10 gados polifenolu ekstraktu iegūšanai izmanto ultraskaņas, enzimatisku, mikroviļņu un superkritisko šķidrums ekstrakciju. Starp šīm metodēm izceļas ultraskaņas ekstrakcija kā lēta, vienkārša un efektīva alternatīva konvencionālajām ekstrakcijas metodēm (Wang and Weller, 2006).

1.3.2. Polifenolu analītiskās izpētes metodes

Augos esošo polifenolu kvantificēšanai ir izveidotas vairākas spektrofotometriskās metodes. Šīs metodes balstās uz dažādiem principiem un tās izmanto, lai noteiktu dažādu strukturālo grupu klātesamību iegūtajos polifenolu ekstraktos. Folina-Šikoltē (*Folin-*

Ciocalteu) metode tiek plaši izmantota, lai noskaidrotu kopējo polifenolu daudzumu, vanilīna proantociānīdu metode tiek izmantota, lai noskaidrotu proantociānīdu saturu ekstraktos (Naczk and Shahidi, 2006). Spektrofotometriskā antociānu kvantificēšanas metode balstās uz antociānu unikālo spēju mainīt krāsu dažādā vides pH (Lapornik et al., 2005). Spektrofotometriskās metodes spēj sniegt ļoti vērtīgu kvalitatīvu un kvantitatīvu informāciju, šīs metodes tiek plaši izmantotas vairāku polifenolu grupu raksturošanai, tās ir viegli veicamas un lētas.

Spektrofotometriskās metodes dod iespēju kvantificēt ekstraktos esošās vielu grupas, bet izmantojot šīs metodes nav iespējams identificēt un kvantificēt atsevišķus savienojumus. Individuālai savienojumu identificēšanai tiek izmantotas hromatogrāfiskās metodes – šķidrums hromatogrāfija ar dažāda veida detektoriem. Antociānu identificēšanai ir iespējams izmantot fotodiožu detektoru redzamajā gaismas spektrā, citiem polifenoliem ir nepieciešams izmantot UV vai fluorescentās gaismas detektorus (Naczk and Shahidi, 2006). Šo detektoru izmantošana ļauj identificēt savienojumus pēc to izdalīšanās laika, kā noskaidrošanai ir nepieciešams izmantot analītiski tīras standartvielas. Nezināmu savienojumu identifikācijai tiek izmantoti masas spektrometrijas (MS) detektori, kas ļauj iegūt katra savienojuma masas fragmentācijas spektru vai precīzu savienojuma masu (Fulcrand et al., 2008; Bureau et al., 2009). MS instrumentu jutības un pieejamības straujā attīstība ļauj veiksmīgi izmantot jaunas metodes nezināmu savienojumu identificēšanai un kvantificēšanai. Orbitrap-MS ir augstas izšķirtspējas masas spektrometrs (HRMS), kas savienots ar šķidrums hromatogrāfu spēj efektīvi izšķirt dažādus savienojumus un tos detektēt pat pikogramu robežās. Izmantojot Orbitrap-MS īpaši augsto izšķirtspēju un jutību ir veiksmīgi noteikts polifenolu un citu antioksidantu saturs vairākos produktos–valriekstos (Regueiro et al., 2014), aveņu un kazeņu lapu ekstraktos (Pavlović et al., 2016), vīnogās (López-Gutiérrez et al., 2016), vīnā (Vallverdú -Queralt et al., 2015), zaļajā tējā (López-Gutiérrez et al., 2015).

Sagatavoto ekstraktu saturā bieži vien ir arī nevēlamas molekulas, kas var traucēt analīzei. Lai atbrīvotos no šiem savienojumiem tiek izmantota cietfāzes ekstrakcija. Polifenolu ekstraktu attīrīšanai izmanto daudz un dažādus sorbentus, populārākie no tiem ir XAD-7, XAD-16, EXA-90, EXA-118, XAD-2, LH-20 (Silva et al., 2007). Šādu sorbentu izmantošana ļauj attīrīt un koncentrēt iegūto ekstraktu.

1.3.3. Bioloģiskās aktivitātes raksturošanas metodes

Iegūto, polifenolus saturošo, ekstraktu bioloģiskās aktivitātes izpēti ir veikta izmantojot dažādus mikroorganismus, kā arī dažādas cilvēka šūnu līnijas un dzīvniekus. Mikrobioloģiskās aktivitātes raksturošanai tiek izmantota agara difūzijas metode. Gram–negatīvo un gram–pozitīvo baktēriju augšanas spējas ir novērtētas dažāda veida ogu ekstraktu un tīru vielu klātbūtnē. Šādi testi ir veikti gan ar patogēnām (*Salmonella*) gan nepatogēnām (*Lactobacillus*) baktērijām. Precīzākai mikroorganismu augšanas

novērtēšanai interesējošās baktērijas tiek audzētas šķidrā barotnē ar dažādu ekstraktu koncentrāciju (Puupponen-Pimiä et al., 2001). Līdzīgi arī cilvēka šūnas tiek audzētas šķidrā barotnē ekstrakta klātbūtnē, tiek novērtēta šūnu augšanas vai izdzīvošanas spēja atkarībā no ekstrakta koncentrācijas (Zafra-Stone et al., 2007). Izmantojot kazeņu, melno aveņu, krūmmelleņu, dzērveņu, parasto aveņu un zemeņu ekstraktus ir parādīta vēža šūnu augšanas inhibīcija un apoptozes stimulēšana dažādās cilvēka vēža šūnu līnijās (Seeram et al., 2006). Ogu polifenolu ekstraktiem tiek piedēvēta augsta bioloģiskā un antiradikālā aktivitāte, šī aktivitāte ir daudz apskatīta dažādos pētījumos, (Seeram et al., 2006) izmantojot antiradikālās aktivitātes noteikšanas metodes (ORAC, DPPH, ABTS, FRAP), savukārt *in vivo* brīvo radikāļu saistīšanas spējas apskatītas nav.

2. Materiāli un metodes

2.1. Izmantotā aparatūra

Analītiskās dzirnavas *IKA M20* (ES)

Analītiskie svāri *Sartorius* (Vācija)

Ekstraktors, ekstrakcijai ar CO₂ superkritiskā stāvoklī *Separex* (Francija)

Kratītājs *Biosan* (Latvija)

Liofilizators *Labconco FreeZone* (ASV)

Mikroviļņu ekstrakcijas iekārta *Milestone Ethos One* (Austrija)

Ultraskaņas vanna *Cole-Parmer* (ASV)

Soksleta ekstraktors *Labor-technik Behr ET2 Soxhlet* (Vācija)

UV-Vis spektrofotometrs *Shimadzu UV-1800* (Japāna)

UV-Vis spektrofotometrs *Ultrospec 3100 pro* (Lielbritānija)

Ultra augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfs ar fotodiožu detektoru *Waters ACQUITY* (ASV, Īrija, Singapūra)

Ultra augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfs *Thermo Accela* ar *Orbitrap Q-Exactive* masas spektrometru *Thermo Fisher Scientific* (ASV), ZPI "Bior"

Ūdens attīrīšanas iekārta *Millipore Elix* (Francija)

Dzīvo šūnu monitoringa sistēma *IncuCyte® Zoom* (ASV)

Plūsmas citometrs *BD FACSCalibur* (Beļģija)

2.2. Ogu un to spiedpalieku iegūšana un sagatavošana izpētei

Savvaļas un kultivētās ogas tika ievāktas Latvijā, 2016. gada vasarā/rudenī. Lielogu dzērvenes (*Vaccinium macrocarpon* L.) un krūmmellenes (*Vaccinium corymbosum* L.) tika ievāktas Z/S "Strēlnieki", kas atrodas Babītes pagastā. Meža mellenes (*Vaccinium myrtillus* L.) un brūklenes (*Vaccinium vitis-idaea* L.) tika ievāktas Saulkrastu novada mežos. Purva dzērvenes (*Vaccinium oxycoccos* L.) tika ievāktas Slampes pagastā esošajā Ķemeru nacionālajā parkā. Visas pētījumā izmantotās ogas tika ievāktas ar rokām. Ogas tika sasaldētas pie -20°C, aptuveni 4-6 stundas pēc to ievākšanas. Mēneša laikā pēc ogu sasaldēšanas ogas tika lēnām atlaidinātas 5°C temperatūrā un sagatavotas sulas spiešanai. Atlaidinātās ogas tika saspīestas izmantojot porcelāna piestu un izmantojot mehānisko sulas spiedi (BIOWIN) ogu masa tika atbrīvota no sulas, tādējādi iegūstot ogu miziņu un sēkliņu masu (ogu izspiednes jeb spiedpaliekas) ar aptuveni 10% mitruma. Iegūtās ogu spiedpaliekas nekavējoties tika sasaldētas pie -20°C tādējādi tās sagatavojot liofilizēšanai. Sasaldētās ogu spiedpaliekas tika liofilizētas aptuveni 3 dienas pie -45°C (Labconco FreeZone liofilizators). Izžāvētās ogu spiedpaliekas tika smalki samaltas

izmantojot analītiskās dzirnavas (IKA M20) iegūstot viendabīgu ogu spiedpalieku pulveri. No 1 kg ogu tika iegūti no 150 g līdz 250 g ogu spiedpalieku atkarībā no izmantotajām ogām. Veselās, eksperimentos izmantotās ogas pēc to ievākšanas un sasaldēšanas tika liofilizētas.

2.3. Ogu polifenolu ekstrakcija

Ogās esošo polifenolu ekstrakcijas optimizācija tika veikta pārbaudot dažādas ekstrakcijas metodes: a) apstrāde ar mikroviļņiem; b) apstrāde ar ultraskaņu un sekojoša paraugu kratīšana; c) Soksleta ekstrakcija un d) ekstrakcija ar superkritisko CO₂. Optimizēti tika arī šajās metodēs izmantotie šķīdinātāji, piedevas tiem, bet ekstrakcijas efektivitāte tika novērtēta nosakot ekstraktvielu daudzumu un tās raksturojošos summāros parametrus. Ekstrakcijas optimizācijai tika izmantots lielogu dzērveņu spiedpalieku pulveris.

Visi iegūtie ekstrakti, pēc ekstrakcijas procedūras beigšanas tika filtrēti izmantojot 0,45 μm poru diametra filtru. Sagatavotie ekstrakti tika uzglabāti pie 4°C tumsā, summāro lielumu analīzes tika veiktas 48h laikā.

2.3.1. Ekstrakcijas optimizēšana

Soksleta ekstrakcija

Soksleta ekstrakcija tika veikta izmantojot 100 mL 96% etanola kopā ar 0,5% trifluoretiķskābes (TFA) (v/v %). 1 g ogu spiedpalieku pulvera tika iesvērts celulozes kapsulā, kas tika noslēgta ar stikla šķiedras vati un ievietota Soksleta ekstrakcijas kapsulā veicot ekstrakciju 12 stundas pie 80°C zem attecēs dzesinātāja (ekstrakcijas gaitā tika veikti 25 cikli). Soksleta ekstrakcija tika veikta paralēli 5 paraugiem ekstrakcijas iekārtā (Labor-technik Behr ET2 Soxhlet).

Mikroviļņu ekstrakcija

Mikroviļņu ekstrakcija tika veikta izmantojot mikroviļņu ekstrakcijas iekārtu (Milestone Ethos One). 0,5 g ogu spiedpalieku pulvera tika iesvērti mikroviļņu ekstrakcijas kapsulās un aplieti ar 50 mL izmantotā šķīdinātāja (96 %, 70 %, 50 %, 25 % etanols, 0,5 % TFA, v/v %; 80 %, 50 % etanols, v/v %). Ekstrakcijai tika izmantota ekstrakcijas programma, kas ietvēra 10 minūšu uzsilšanas laiku, pievadot 600W jaudas, līdz temperatūra sasniedza 80°C, pēc kuras sasniegšanas temperatūra tika uzturēta konstanta 20 minūtes.

Ultraskaņas ekstrakcija

Ultraskaņas ekstrakcijas optimizēšanai tika iesvērts 0,5 g ogu spiedpalieku pulvera un apliets ar 50 mL sagatavotā šķīdinātāja. Ekstrakcijas metožu izvēlei tika pētīta ultraskaņas jaudas ietekme uz ekstrakcijas efektivitāti (100 W un 360W) izmantojot ultraskaņas vannu (Cole-Parmer), kurā tika nodrošināta konstanta temperatūra, kas nepārsniedza 30°C. Pēc

parauga apstrādes ar ultraskaņu tie tika atstāti kratīties (120 rpm) uz 24 stundām, izmantojot kratītāju (Biosan).

Ekstrakcija ar CO₂ superkritiskā stāvoklī

Ekstrakcija ar CO₂ superkritiskā stāvoklī veikta izmantojot ekstraktoru *Separex* (Francija). Ekstraktora kolonnā tika iepildītas 20,00 g sausas lielogu dzērveņu spiedpaliekas un no virsas noblīvētas ar stikla lodītēm. Ekstrakcija veikta pie spiediena 350 bar, kolonnas temperatūras 45 °C, CO₂ plūsmas ātrumu iestādot 25 g/min. Pēc 2 stundu ekstrakcijas iekārta tika apturēta un ogu izspiednes izņemtas. Iekārtas skalošanai tā tika palaista bez parauga pie iepriekš minētā spiediena un CO₂ plūsmas ātruma, pieslēdzot 96 % etanola plūsmu ar ātrumu 2 mL/min. Sistēma tika skalota ar 5 x 20 mL etanola. Pēc ekstrakcijas atgūtā ogu spiedpalieku masa bija 18,50 g. Pēc etanola iztvaicēšanas tika iegūti 1,24 g ekstraktvielu.

Ekstrakcijas apstākļu optimizācija izmantojot atbildes (reakcijas) virsmas metodi (RSM)

Polifenolu un antociānu ekstrakcijas efektivitāte par ekstrahentiem izmantojot etanola vai metanola ūdens maisījumus skābes klātbūtnē (skudrskābe un trifluoretiķskābe TFA) tika pētīta ar atbildes virsmas metodi (no angļu val. *Response Surface Methodology*, RSM). Lai noskaidrotu optimālos ekstrakcijas apstākļus, tika testēti divi faktori trīs līmeņos (2.1. tabula). Eksperimentālā dizaina piemērs ir redzams 2.2. tabulā un šādā pašā veidā tika veikti eksperimenti ar etanolu/skudrskābi; metanolu/skudrskābi; etanolu/TFA; metanolu/TFA. Eksperimenti tika veikti randomizētā kārtībā, lai izvairītos no neizskaidrojamas variēšanas. Katram mainītajam parametram tika piešķirts kods, lai izveidotu eksperimenta (2.2. tabula) plānu. Katrā eksperimentā tika mērīti divi mainīgie – kopējais antociānu saturs (mg/100 g spiedpalieku) un kopējais polifenolu saturs (g/100 g spiedpalieku). Balstoties uz izveidoto eksperimentālo dizainu (2.2 tabula) sagatavotie modeļi tika piemēroti kvadrātiskam polinomiālam modelim.

2.1. tabula. Ekstrakcijas apstākļu optimizācijā izmantotie neatkarīgie mainīgie, to īstās un kodētās vērtības izmantotajā atbildes virsmas metodes modeli.

	Simbols	Līmeņu kodi		
Neatkarīgie mainīgie		-1	0	+1
Etanols/Metanols, v/v %	X_1	96% / 100%	70	40
Skudrskābe/TFA, v/v %	X_2	10% / 1%	5% / 0,5%	1% / 0,1%

Ekstrakcija tika veikta iesverot 0,50 g dzērveņu spiedpalieku un aplejot tās ar 50 mL konkrētajā ekstrakcijā izmantotā solventa. Ekstrakts tika ievietots ultraskaņas vannā uz 25 minūtēm, nofiltrēts un uzglabāts 4°C tumsā, līdz parauga analīzei.

2.2. tabula. Ekstrakcijas apstākļu optimizācijas eksperimenta divu faktoru un trīs līmeņu centrālā kompozītu dizaina plāns ar 3 centra punktiem saskaņā ar atbildes virsmas modeli.

Standarta secība	Eksperimentu secība	Faktors 1 (X_1)	Faktors 1 (X_2)	Eksperimenta kods
		Etanols, tilp. % (kods)	TFA, tilp. % (kods)	
1	4	40 (+1)	0,1 (+1)	+1 +1
2	9	40 (+1)	0,5 (0)	+1 0
3	6	40 (+1)	1,0 (-1)	+1 -1
4	1	70 (0)	0,1 (+1)	0 +1
5	8	70 (0)	0,5 (0)	0 0
6	11	70 (0)	0,5 (0)	0 0
7	10	70 (0)	0,5 (0)	0 0
8	7	70 (0)	1,0 (-1)	0 -1
9	3	96 (-1)	0,1 (+1)	-1 +1
10	5	96 (-1)	0,5 (0)	-1 0
11	2	96 (-1)	1,0 (-1)	-1 -1

2.3.2. Ekstraktvielu attīršana

Izvērtējot optimizācijā iegūtos optimālos ekstrakcijas apstākļus, tika sagatavots ekstrakts izmantojot 50 g ogu spiedpalieku. Ogu spiedpaliekas tika aplietas ar 500 mL ekstrakcijas maisījuma, kas sastāvēja no metanola (Purchem) un TFA (97:0,3 v/v %) (Sigma Aldrich). Ekstrakts tika ievietots ultraskaņas vannā (Cole-Parmer) uz 40 minūtēm, nomainot ūdeni ultraskaņas vannā ik pēc 20 minūtēm, lai novērstu uzkaršanu. Iegūtais ekstrakts tika filtrēts caur 0,45 µm filtru. Lietotais filtrs kopā ar uz tā esošajām smalkajām ogu daļiņām tika ievietots atpakaļ ekstrakcijas traukā. Ogu spiedpaliekas šādā veidā tika ekstrahētas 3-5 reizes, atkarībā no parauga (mellenes 5 reizes, dzērvenes, brūklenes 3 reizes). Iegūtās ekstrakta porcijas tika apvienotas apaļkolbā un ietvaicētas pazeminātā spiedienā 40°C temperatūrā līdz aptuveni 200 mL tilpumam (Heidolph RotaVap). Ietvaicētais ekstrakts tika kvantitatīvi pārnests daļpiltuvē, tika pievienoti 200 mL heksāna, šādā veidā ietvaicētais ekstrakts tika reekstrahēts 3 reizes. Pēc heksāna atdalīšanas daļpiltuvē, ūdens fāze tika pārnesta uz apaļkolbu un ietvaicēta pazeminātā spiedienā, lai atbrīvotos no ekstraktā palikušā heksāna. Iegūtais ekstrakta koncentrāts šajā stadijā tika sagatavots sorbcijas hromatogrāfijai. Sorbcijas hromatogrāfijai tika izmantots 100 g Amberlite XAD7-HP sorbents (Sigma Aldrich) (Denev et al., 2010; Chandrasekhar et al., 2012; Bräunlich et

al., 2013), kas tika iepildīts stikla kolonnā, kas tika noslēgta ar stikla vati. Kolonna tika kondicionēta izmantojot demineralizētu ūdeni 24 stundas. Sagatavotajā kolonnā uz sorbenta slāņa tika uznesti 100 mL ekstrakta koncentrāta. Pēc parauga sorbcijas uz kolonnas tā tika skalota ar lielu demineralizēta ūdens daudzumu. Polifenolu desorbcija tika veikta izmantojot 250 mL 96% etanolu (Enola), kam pievienota 5% skudrskābe (v/v %) (Sigma Aldrich). Lai kolonnu varētu izmantot atkārtoti, tā tika skalota ar 1 L 96% etanolu un pēc tam kondicionēta ar demineralizētu ūdeni. Savāktā 250 mL frakcija, kas satur paraugu, tika ietvaicēta pazeminātā spiedienā līdz sausam ar rotācijas ietvaicētāju, tad izšķīdināta 50 mL demineralizētā ūdenī un sasaldēta. Sasaldētais produkts tika ievietots līdz -45°C atdzesētā liofilizatorā un pazeminātā spiedienā žāvēts 2 dienas. Pēc žāvēšanas, gatavais produkts, sauss ogu polifenolu ekstrakts, tika savākts un uzglabāts tumsā 4°C. Ekstrakcijas procesā visi izmantotie šķīdinātāji tika savākti un atkārtoti izmantoti ekstrakcijas procesam.

2.4. Ogu polifenolu sastāva izpētes metodes

2.4.1. Ogu ekstraktvielu summāro parametru analīzes metodes

Sausnes daudzuma noteikšana

Sausnes noteikšanai ekstraktos tika izmantotas 24 stundas pie 80°C žāvētas stikla pudelītes. Izžāvētās pudelītes tika atdzesētas līdz istabas temperatūrai un ievietotas eksikatorā uz vismaz 3 stundām pirms to lietošanas. Katra pudelīte tika nosvērta uz analītiskajiem svariem un pēc tās nosvēršanas pudelītēs, izmantojot pipeti, tika ievietots 1,0 mL ekstrakta. Pudelītes ar ekstraktu tika žāvētas 24 stundas pie 40°C. Pēc ekstraktu izžāvēšanas pudelītes tika ievietotas eksikatorā uz vismaz 3 stundām un tad nosvērtas uz analītiskajiem svariem. Katrs ekstrakts tika sagatavots 3 atkārtojumos un katra pudelīte tika svērta trīs reizes, rezultāti izteikti kā vidējais no 3 mērījumiem. Pudelītes svara un pudelītes un ekstrakta svara starpība tika izteikta kā sausne uz 100 g spiedpalieku.

Kopējā ogļhidrātu daudzuma noteikšana

Kopējais ogļhidrātu daudzums tika noteikts saskaņā ar fenola–sērskābes metodi, izmantojot glikozi kā standartu (DuBois et al., 1956). Pie 1 mL ogu ekstrakta vai 1 mL atšķaidīta ogu ekstrakta tika pievienots 1 mL 5% (w/v %) fenola šķīduma un iegūtais maisījums tika sajaukts. 5 mL koncentrēta sērskābe tika pievienota fenola šķīdumam un uzmanīgi sakratīta. Paraugi tika inkubēti 40 minūtes istabas temperatūrā un sorbcija nomērīta pie 488 nm. Kalibrācijas līkne tika konstruēta tādā pašā veidā parauga vietā izmantojot glikozes standartšķīdumus (0–200 mg/L). Visi mērījumi tika veikti stikla kivetēs (l=1cm) izmantojot spektrofotometru (Shimadzu UV-1800), pret kivetī, kurā paraugs tika aizstāts ar demineralizētu ūdeni.

Kopējā polifenolu daudzuma noteikšana

Kopējais polifenolu daudzums tika noteikts izmantojot Folīna-Šikoltē (*Folin-Ciocalteu*) spektrofotometrisko metodi (Folin and Ciocalteu, 1927; Siriwoharn et al., 2004). Standartlīknes sagatavošanai tika izmantota galluskābe koncentrācijas intervālā no 0,025 līdz 0,350 mg/mL. 1 mL standarta tika sajaukts ar 5 mL Folīna-Šikoltē reaģenta, atšķaidīta ar demineralizētu ūdeni (1:10) un pievienoti 4 mL 7,5% nātrija karbonāta šķīduma. Paraugi tika inkubēti 20–30 minūtes tumsā un nomērīti pie 765 nm pret destilētu ūdeni stikla kivetēs (Shimadzu UV-1800). Paraugu sagatavošana tika veikta tādā pašā veidā kā standartu sagatavošana, atšķaidot paraugu atkarībā no iespējamās polifenolu koncentrācijas, tā, lai iegūtais mērījums būtu standartlīknes lineārajā intervālā. Kopējais polifenolu daudzums tika izteikts kā galluskābes ekvivalenti uz 100 g ogu spiedpalieku.

Kopējā antociānu daudzuma noteikšana

Kopējā antociānu daudzuma noteikšanai sagatavotajos ekstraktos tika izmantotas paraugu sorbcijas atšķirības pie dažādiem pH (Lee et al., 2004). Šajā metodē tiek izmantota antociānu molekulu spēja mainīt krāsu atkarībā no pH. Tika sagatavoti divi buferu šķīdumi ar dažādiem pH, 0,025 M kālija hlorīda šķīdums pH 1,0 un 0,4 M nātrija acetāta šķīdums ar pH 4,5 (pH tika noregulēts ar koncentrētu HCl). Katrs paraugs tika atšķaidīts augstāk minētajos buferos tā, lai absorbcija pie 520 nm ir spektrofotometra sorbcijas lineārajā intervālā un parauga:bufera attiecība nepārsniedz 1:5. Atšķaidītie paraugi tika atstāti tumsā uz 20–30 minūtēm un mērījumi tika veikti ne ilgāk kā pēc 50 minūtēm. Paraugu sorbcija katram atšķaidījumam tika mērīta pie 520 nm un pie 700 nm pret demineralizētu ūdeni izmantojot spektrofotometru (Shimadzu UV-1800). Kopējais antociānu daudzums tika aprēķināts izmantojot sekojošu formulu:

$$\text{Kopējie antociāni (cianidīna-3-glikozīda ekv., mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}, \text{ kur}$$

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$$

$$MW = \text{cianidīna-3- glikozīda molmasa, } 449,2 \text{ g/mol}$$

$$DF = \text{atšķaidījums}$$

$$l = \text{kivetes izmērs}$$

$$\epsilon = 26900 \text{ molārās ekstinkcijas koeficients (} L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \text{) cianidīn-3-glikozīdam}$$

$$10^3 = \text{faktors pārejai no g uz mg}$$

Kopējā proantociānīnu daudzuma noteikšana

Kopējais proantociānīnu daudzums tika noteikts izmantojot to reakcijas produktu ar 4-dimetilaminokanēlaldehīdu (DMAC) spektrofotometrisku analīzi (Prior et al., 2010;

Horszwald et al., 2013; Krueger et al., 2013; Krueger et al., 2016). Tika sagatavots paskābināts etanola šķīdums (12,5 mL 36% HCl; 12,5 mL ūdens; 75 mL 91% etanols) un DMAC reaģents (0,05 g DMAC; 50 mL paskābinātā etanola). Standartlīkne tika sagatavota izmantojot epikatehīna standartšķīdumu (200 µg/mL). Epikatehīna standartšķīdums tika atšķaidīts (1; 2; 3; 4; 5; 8; 10 µg/mL koncentrācija) un mērīts tādā pašā veidā kā paraugi. 630 µL atšķaidīts paraugs vai standartšķīdums tika ievietots kivetē un tam pievienots 1890 µL DMAC reaģents. Parauga absorbcija tika mērīta 25–30 minūtes ar 30 sekunžu intervālu pie 640 nm izmantojot 630 µL etanola + 1890 µL DMAC reaģentu kā blanku (Shimadzu UV-1800). Paraugs tika atšķaidīts tā, lai mērījumu sorbcija atrastos standartlīknes lineārajā intervālā. Rezultāti tika izteikti kā g proantocianidīni/ 100 g ogu pulvera.

2.4.2. Ogu ekstraktvielu antiradikālās aktivitātes analīze

DPPH metode antiradikālās aktivitātes noteikšanai

2,2-difenil-2-pikrilhidrazilhidrāta (DPPH) antiradikālā aktivitāte tika spektrofotometriski noteikta izmantojot laboratorijai pielāgotu metodi (Brand-Williams et al., 1995). Šīs metodes pamatā ir DPPH spēja reducēties ūdeņraža donora klātbūtnē (antioksidants), veidojot DPPH-H rekombināto (ne-radikālo) formu (Bondet et al., 1997). 10 mg DPPH tika izšķīdināti 250 mL 80% metanolā, lai iegūtu DPPH šķīdumu, kura sorbcija ir no 0,95 līdz 1,10 pie 517 nm. DPPH šķīdums tika svaigi sagatavots pirms katras analīzes. 200 µL parauga vai parauga atšķaidījums tika pievienoti 3 mL DPPH šķīduma. Paraugs tika inhibēts vismaz 30 minūtes tumsā un sasniedzot stabilus sorbcijas rādījumus tika veikts mērījums. Standartlīkne (1–5 µM) tika sagatavota izmantojot 5,7,8-tetrametilhromān-2-karbonskābi (Trolox), kas tika izšķīdināta 96% etanolā. Visi mērījumi tika veikti izmantojot stikla kivetes un Shimadzu UV-1800 spektrofotometru.

ABTS metode antiradikālās aktivitātes noteikšanai

Antiradikālās aktivitātes noteikšanai tika pielietota zaļgani zilā 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolīn-6-sulfonskābes (ABTS) radikāļa katjona spēja zaudēt krāsu tam rekombinējoties. Šī metode tiek pielietota, lai noteiktu gan lipofīlu, gan hidrofīlu antioksidantu spēju saistīt brīvos radikāļus (Re et al., 1999). Tika sagatavoti buferšķīdumi un standartšķīdumi. Fosfāta buferšķīdums tika sagatavots iesverot 0,27 g KH_2PO_4 , 1,42 g Na_2HPO_4 , 8,18 g NaCl un 0,15 g KCl un izšķīdinot 1 L ūdens. pH tika iestādīts ar 0,1 N NaOH līdz pH 7,4. ABTS izejas šķīdums (2mM) tika sagatavots iesverot 0,1029g ABTS un izšķīdinot to 100 mL fosfāta buferšķīdumā. Kālija persulfāta šķīdums (70 mM) tika sagatavots iesverot 0,9461 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 50 mL demineralizēta ūdens. Trolox standartšķīdums tika sagatavots nosverot 0,0250 g Trolox un izšķīdinot to 100 mL 96% etanola. Šīs metodes sagatavošana un izpilde ilgst divas dienas. Pirmajā dienā tiek sagatavots ABTS+ šķīdums:

50 mL ABTS izejas šķīduma tika sajaukts ar 200 µL kālija persulfāta šķīduma, novietots tumsā uz 12–16 stundām. Šajā laikā šķīdumā esošais ABTS tiek pārvērsts par ABTS+ radikāli. Otrajā dienā tika izšķīdināti paraugi izmantotajā solventā (etanolā). ABTS+ šķīdums tika atšķaidīts ar fosfāta buferšķīdumu neilgi pirms mērījumiem tā, lai gala šķīduma absorbcija būtu $0,800 \pm 0,030$ pie 734 nm. 5 mL atšķaidītā ABTS+ tika sajaukts ar 50 µL parauga un nomērīts pie 734 nm pēc 30 minūtēm. Fosfāta buferšķīdums vai etanols tika izmantots kā negatīvā kontrole. Standartlīkne tika sagatavota izmantojot Trolox standartšķīdumu koncentrāciju intervālā no 2 µM līdz 10 µM. Visi mērījumi tika veikti izmantojot spektrofotometru Shimadzu UV-1800.

FRAP metode antiradikālās aktivitātes noteikšanai

Antioksidantu spēju ietekmēt Fe(III) reducēšanos raksturo dzelzs reducēšanas kavēšanas potenciāls (FRAP), kas tika noteikts pēc Benzie and Strain, 1996 modificētas metodes (Biskup et al., 2013). Šajā metodē tiek mērīta Fe (III) reducēšana par Fe (II) antioksidanta klātbūtnē. Lai sagatavotu FRAP reaģentu ir nepieciešams acetāta buferis 300 mM, atšķaidīta HCl 40 mM, 2,3,6- tri [2-piridil]-s-triazīns (TPTZ) 10 mM, un dzelzs (III) hlorīda šķīdums 20 mM. Svaigi, pirms katras analīzes tika sagatavots FRAP reaģents, kas sastāv no 200 mL acetāta bufera, 20 mL TPTZ šķīduma, 20 mL dzelzs hlorīda šķīduma un 24 mL demineralizēta ūdens. Sajauktais FRAP reaģents tika turēts 37 °C ūdens vannā. 30 µL piemērots parauga atšķaidījums tika ievietots kivetē un strauji pievienots 1 mL FRAP reaģenta. Paraugi tika mērīti stikla kivetēs pret demineralizētu ūdeni pie 593 nm pēc 15 minūšu inkubācijas perioda izmantojot Shimadzu UV-1800 spektrofotometru. Kalibrācijas līkne tika konstruēta izmantojot 1000 µM Trolox standartšķīdumu intervālā no 1 līdz 10 mM. Stipri iekrāsotiem paraugiem par blanku tika lietots demineralizēts ūdens kopā ar 30 µL parauga.

2.4.3. Ogu polifenolu hromatogrāfiskās analīzes metodes

Šķīduma hromatogrāfija (UPLC-PDA) antociānu noteikšanai un kvantificēšanai

Antociānu noteikšana un kvantificēšana tika veikta izmantojot ultra augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfiju (UPLC, Waters ACQUITY). UPLC sistēmā bija aprīkota ar šķīdinātāju moduli (QSM), paraugu ievadīšanas sistēmu – caurplūsmas adatu (atdzesēta līdz 4 °C) (SM–FTN), kolonnas sildītāju (CH–A) un fotodiožu (PDA) λ detektoru. PDA dati tika savākti izmantojot Waters Empower datu iegūšanas programmatūru.

Antociānu analīzes tika veiktas pēc modificētas metodes pie 35 °C izmantojot C18 kolonnu (Acquity UPLC BEH C18 2,1x50 mm i.d., 1,7 µm) kopā ar kolonnas priekšfiltru (Rui et al., 2011; Cretu and Morlock et al., 2014). Kustīgā fāze sastāvēja no (A) 5,0% skudrskābes un (B) no metanola/ūdens ar 1,0% skudrskābes (70:30 v/v%). Plūsmas ātrums tika iestādīts

0,250 mL/min. Analīzēm tika uzstādīta gradienta sistēma, kur solvents A tika lietots no 80% līdz 75% 15 minūšu laikā, no 75% līdz 60% 7 minūtēs un no 60% līdz 0% 18 minūtēs, tam sekoja 10 minūšu stabilizācija 80% solventā A. Kopējais analīzes ilgums bija 40 minūtes. Injekcijas tilpums bija 2,0 µL. Savienojumu identifikācija tika veikta salīdzinot izdalīšanās laikus ar references standartiem un literatūrā atrodamo informāciju. Antociānu kvantificēšana tika veikta izmantojot cianidīna-3-O-glikozīda (Sigma Aldrich) ārējo kalibrācijas grafiku intervālā no 3–100 mg/mL. Šķidrums hromatogrāfiskās analīzes tika veikta dr.ķīm. Jorena Kvieša vadībā.

*Hromatogrāfija – augstas izšķirtspējas masspektrometrija (Orbitrap-MS)
polifenolu identifikācijai un kvantificēšanai*

Ogu ekstraktvielu hromatogrāfiskā analīze tika veikta izmantojot Thermo Accela UHPLC sistēmu (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, ASV) ar Kinetex PFP (100 mm x 3,0 mm i.d., daļiņu izmērs 1,7 µm) kolonnu (Phenomenex, Torrance, CA, ASV). Kolonnas temperatūra tika uzstādīta 40°C, un plūsmas ātrums 250 µL/min. Kustīgā fāze sastāvēja no (A) 10mM ūdenī izšķīdināta amonija formiāta ar pievienotu skudrskābi (0,1 tilp. %) un (B) acetonitrila. Analīzēm tika uzstādīta optimizēta gradienta sistēma, kura sākās ar 98% A (0–1,0 min); 98–2% A (1,0–10,0 min); 2% A (10,0–14,0 min); atgriezās uz sākotnējo uzstādījumu (14,0–14,1 min); kolonnas līdzsvarošana (14,1–16,0 min). Injekcijas tilpums bija 5 µL.

UHPLC instruments tika savienots ar Orbitrap Q-Exactive masas spektrometru (Thermo Fisher Scientific), kas aprīkots ar sildītu elektro–izsmidzināšanas jonizācijas interfeisu (HESI-II). Negatīvais jonizācijas režīms tika izmantots, lai iegūtu masas spektrus kopā ar pilnu skenēšanas opciju masas/lādiņa (m/z) diapazonā no 100–1500 pie 150 000 izšķiršanas spējas. Tika izmantoti sekojoši procedūras apstākļi: avota spriegums -3 kV; skalošanas gāze 18 vienības; ieplūdes gāze 3 vienības; kapilāra temperatūra 300 °C; S-lēcas RF līmenis 50; pieplūdes gāzes sildītāja temperatūra 350°C. Automātiskā pastiprinātāja kontrole (AGC) tika uzstādīta līdz 3e⁶, maksimālais injekcijas laiks bija 200 ms. Izmantotie parametri priekš izvēlēto jonu monitoringa (t-SIM) skenēšanas režīmā bija tādi paši kā pilnas skenēšanas uzstādījumos. Mērķa masas tandēma masas spektrometrijas režīms tika izmantots pie izšķirtspējas 17 500 un AGC vērtība tik uzstādīta uz 100 000 (t-MS²). Prekursoru izolācijas solis SIM un MS² režīmos tika uzstādīts uz 2 m/z. Pieļaujamā masas kļūda tika uzstādīta uz 5 ppm. Analizēto savienojumu kolīzijas enerģijas tika noskaidrotas infūzijas eksperimentos. Orbitrap-MS sistēmai tika veikta ārēja masas kalibrācija intervālā no 50 līdz 2000 m/z pēc iekārtas ražotāju ieteikumiem. Savienojumu identifikēšanai un kvantificēšanai tika izmantotas standartvielas. Datu analīze tika veikta izmantojot Xcalibur 3.0 un Mass Frontier 7.0 programmatūru (Thermo Fisher Scientific).

Orbitrap-MS analīzes tika veiktas ZPI "Bior" sadarbībā ar pētnieku Jāni Ruško asociētā profesora Vadima Bartkeviča vadībā

2.5. *Vaccinium* ģints ogu polifenolu bioloģiskās aktivitātes raksturojums

2.5.1. Antimikrobiālās aktivitātes izpētes metodes

Agara difūzijas tests

Ekspērimētos izmantotie mikroorganismi tika iegūti no Latvijas Mikroorganismu Kultūru Kolekcijas (LMKK). Polifenolu ekstraktu iedarbība uz *Eschericia coli* ATC 25922 (LMKK 332), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (LMKK 331), *Micrococcus luteus* (LMKK 25), *Bacillus cereus* 8035 (LMK 330), *Enterococcus faecalis* 1875 (LMKK 302), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (LMKK 333), *Bacillus subtilis* 6633 (LMKK 329), *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (LMKK 620), *Staphylococcus aureus* 209-p (LMKK 334) tika novērtēta izmantojot agara difūzijas metodi. Tika sagatavotas Petri plates ar Millera-Hintona agaru (MH), kur barotnes biezums bija 4-6 mm. Minētās baktēriju sugas tika audzētas uz Petri platēm. Lai izveidotu baktēriju suspensiju tika izmantots aptuveni 3 mL sterils ūdens, kurā tika ievietotas attiecīgās baktērijas un suspensijas optiskais blīvums tika pielāgots no 0,08 Abs līdz 0,10 Abs pie 625 nm ar sterilu ūdeni izmantojot spektrofotometru (Ultrospec 3100 pro). 3 mL suspensijas tika ievietoti MH platē, nokļājot visu plates virsmu un, izmantojot pipeti, suspensija tika noņemta no plates un plate sterila gaisa plūsmā nožāvēta. Katrā platē vienmērīgā izvietojumā tika izveidotas četras bedrītes ar diametru 7 mm. Izmantojamie ekstrakti tika sagatavoti 50% etanola šķīduma koncentrācijā 15 mg/mL, izfiltrēti (0,25 μm sterils filtrs) un 70 μL ekstrakta tika ievietots izveidotajās agara bedrītēs. Pēc ekstrakta uzsūkšanās Petri platē izveidotajās bedrītēs, tās tika ievietotas pie +37 °C inkubatorā. Pēc 24h inkubācijas, izveidojušās inhibīcijas zonas tika izmērītas (± 1 mm).

Minimālās inhibējošās koncentrācijas noteikšana

Minimālās inhibējošās koncentrācijas noteikšanai tika izmantotas uz Petri plates svaigi sagatavotas baktēriju kultūras, kam tika identificētas inhibēšanas zonas agara difūzijas testos. 3 mL sterila ūdens tika ievietotas baktērijas un suspensijas optiskais blīvums tika pielāgots no 0,08 līdz 0,10 pie 625 nm izmantojot sterilu ūdeni. Iegūtā suspensija tika atšķaidīta 1:100 ar sterilu ūdeni īsi pirms lietošanas. Ekspērimēnts tika veikts izmantojot 96 lauciņu plati (Sarstedt), kur katrā lauciņā tika ievietoti 100 μL testējamā ekstrakta (tika veikts sērijveida atšķaidījums) vai kontroles paraugs (negatīvā kontrole– 100 μL ekstrakta, 100 μL barotne; pozitīvā kontrole – 100 μL barotne; 100 μL baktēriju suspensija). Katrā lauciņā pēc ekstrakta ievietošanas tika pievienoti 100 μL atšķaidītā baktēriju suspensija.

96 lauciņu plates tika inkubētas +37 °C 24h, pēc kurām, katra lauciņa optiskais blīvums tika mērīts pie 600 nm izmantojot plašu lasītāju (Tecan Infinite 200). No iegūtajiem rezultātiem tika iegūta minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC). Lai noteiktu minimālo baktericīdo koncentrāciju (MBI), 10 µL no lauciņa satura tika izsēti uz MH Petri platēm (lauciņi kuros, pēc vizuāla novērtējuma, netika novērots saduļļojums). Plates, kurās netika novērota mikroorganismu attīstība parādīja baktericīdu koncentrāciju. Plates, kur tika novērota mikroorganismu attīstība, uzrādīja minimālo inhibējošo koncentrāciju, kas ir zemākā antimikrobiālās vielas koncentrācija, kas inhibē mikroorganismu augšanu (par 80%) (Schwalbe et al., 2007). Viss darbs ar baktēriju kultūrām tika veikts laminārās plūsmas skapī ievērojot aseptiska darba pamatprincipus.

2.5.2. Ogu ekstraktvielu ietekmes uz epitēlijšūnu attīstību izpētes metodes

Šūnu kultivēšana un proliferācijas testi

Šūnu eksperimentos tika izmantotas cilvēka dermas fibroblastu līnijas, kas iegūtas no pēcooperāciju materiāla (saskaņā ar Biomedicīnas pētījumus reglamentējošajiem tiesību aktiem Latvijā par zinātnē izmantojama materiāla iegūšanu¹). Darbā tika izmantotas trīs līdz astoņu pārsējumu dermas šūnu līnijas.

Sasaldētas šūnas tika lēnām atkausētas ūdens termostatā un pārnestas uz tīru, sterilu centrifugēšanas mēģeni. Atkausētajām šūnām tika pievienota standarta S10 barotne (10% FBS; 100 µg/mL penicilīna/streptomicīna saturošu DMEM) un centrifugēta 15 minūtes 1200 apgr./min. Centrifugētās šūnas tika atbrīvotas no supernatanta un resuspendētas standarta S10 barotnē. Resuspendētās šūnas tika izsētas T-75 kultivēšanas flakonā un ievietotas inkubatorā (+37°C; 5% CO₂). Flakonā esošā barotne tika regulāri atjaunota līdz šūnas sasniedza 80–90% konfluenci.

Kultivētās šūnas tika atbrīvotas no S10 barotnes un noskalotas pievienojot sterilu 1x PBS. Noskalotās šūnas tika atbrīvotas no PBS un tās tika tripsinētas (0,25% tripsīns/EDTA) ievietojot flakonus inkubatorā uz 5 minūtēm. Šūnu tripsinēšana tika novērtēta izmantojot mikroskopu un, kad šūnas bija atrāvušās no flakona virsmas, tripsinēšanas reakcija tika apstādināta pievienojot 20% FBS, kas atšķaidīts PBS. Šūnas tika koncentrētas tās centrifugējot 5 minūtes 1200 apgr./min un tad resuspendētas S10 barotnē. Resuspendētās šūnas tika saskaitītas izmantojot hemocitometru (Neubauer). Dermas fibroblastu šūnas tika atšķaidītas izmantojot S10 līdz 3 x 10³ šūnu/100 µL un katrā 96–lauciņu plates lauciņā tika izsēti 100 µL no šūnu suspensijas. Izsētās plates tika inkubētas

¹ Biomedicīnas pētījumus reglamentējošie tiesību akti Latvijā.

http://www.biodrosiba.lu.lv/fileadmin/user_upload/lu_portal/projekti/antropologija/Petijumu_tiesibu_akti.pdf

2 dienas +37°C, 5% CO₂ atmosfērā. Pēc divām dienām tika sagatavoti ogu ekstraktu atšķaidījumi S10 barotnē 0,05%-3% (v/v%). Sākotnējā ekstraktu koncentrācija bija 20 mg/mL. 2 dienas inkubētajā platē katrs lauciņš tika saudzīgi atbrīvots no tajā esošās barotnes un tukšajos lauciņos tika pievienots 100 µL S10 barotnē atšķaidītais ekstrakts. Kontrolei tika izmantota S10 barotne bez pievienotiem ekstraktiem, S10 barotne, kurai tika pievienots nesējs (etanols) augstākajā izmantotajā koncentrācijā (0,5% etanols). Katram ekstrakta atšķaidījumam tika izmantoti 2–3 atkārtojumi. Pēc plašu sagatavošanas tās tika ievietotas IncuCyte® Zoom iekārtā, kur tika monitorēta šūnu konfluences līdz S10 kontroles lauciņi, bez pievienotā ekstrakta, sasniedza 100% konfluenci. IncuCyte® uzņēma šūnu konfluences datus reizi stundā, iegūtie rezultāti tika analizēti izmantojot iekārtas ražotāja piedāvāto programmatūru (Essen BioScience, ASV).

Brīvo radikāļu saistīšanas spējas in vitro

Dermas fibroblastu šūnu kultūrām tika pievienoti visi testētie ekstrakti (0,25% un 0,125% koncentrācijās) uz 24 stundām (+37°C; 5% CO₂). Šūnas tika savāktas (0,25% tripsīns/EDTA) un resuspendētas barotnē (10% FBS/DMEM), kur 1 stundu tika inducēts ROS. Kontroles paraugs tika inkubēts 1 stundu pirms šūnu ievākšanas kopā ar kontroles antioksidantu (C-vitamīns) un NAC (2000 µM). ROS inducēšanai tika lietots TBHP (200 µM) un inkubēts ar šūnām 1 stundu. Šūnas tika inkubētas 1 stundu tumsā ar CellROX™ Green (500 nM) krāsvielu un 15 minūtes ar SYTOX™ Red Dead Cell Stain (5 nM). Analīze tika veikta izmantojot BD FACSCalibur plūsmas citometru iegūstot 20000 skenējumus uz paraugu. Vidējā fluorescences intensitāte (MFI) tika izmantota, lai novērtētu antioksidatīvās īpašības analizētajos paraugos – zemākas MFI vērtības nozīmē labākas brīvo radikāļu saistīšanas spējas un aizsardzību pret ROS izraisītiem šūnu bojājumiem.

2.6. Datu apstrādes un statistiskās analīzes metodes

Datu apstrāde un aprēķini tika veikti izmantojot MS Office Excel programmatūru. Statistiskie testi ($\alpha=0,05$) – Students t-test, Paired t-test, ANOVA, Tukeys HSD tika veikti izmantojot GraphPad Prism un SAS JMP programmatūru. Eksperimentālais dizains un ekstrakcijas *Response surface* optimizācija (RSM), kā arī verifikācijas eksperimentu datu salīdzināšana tika veikta SAS JMP programmatūrā. Orbitrap-MS efektīvai datu apstrādei tika izmantota programma R (programmas izmantošanā palīdzību sniedza asociētais profesors Didzis Elferts), kā arī MS datu apstrādes programmas Xcalibur un MassHunter.

3. Rezultāti un to apspriešana

3.1. Ogu polifenolu ekstrakcijas iespēju izpēte

3.1.1. Ekstrakcijas metodes un apstākļu izpēte

Ekstrakcijā izmantotā solventa izvēle

Polifenoli un antociāni ir polāras molekulas, kuru ekstrakcijai tiek izmantoti dažādi polāri solventi – ūdens (Kim et al., 2009; Denev et al., 2010; d'Alessandro et al., 2012), etanols (Chen et al., 2007; d'Alessandro et al., 2012; Čujić et al., 2016), metanols (Lätti et al., 2007; Corrales et al., 2010; Sójka et al., 2013), acetons (Vatai et al., 2008; Kylli et al., 2010; Chen et al., 2016), acetonitrils (Lätti et al., 2007; Rui et al., 2011). Pareizā solventa izvēle ekstrakcijas procesam ir viens no nozīmīgākajiem faktoriem, lai iegūtu pēc iespējas lielākus ekstraktvielu iznākumus. Polifenolu molekulu dažādība ļauj, izmantojot dažādus solventus, iegūt ekstraktus ar atšķirīgu polifenolu koncentrāciju un kompozīciju.

3.1. tabula. Ekstrakcijā izmantoto solventu ietekmes uz kopējo polifenolu, antociānu, ogļhidrātu un sausnes saturu iegūtajos ekstraktos (izteikts kā g/100 g ogu spiedpalieku). (±) parāda mērījumu standartnovirzi. (a,b,c,d) atšķirīgi burti parāda statistiski būtiskas atšķirības starp parametriem katras grupas ietvaros, (ANOVA, Tukeys HSD test, n=3). Solventu koncentrācijas uzrādītas tilp. %.

Ekstrahenta sastāvs	Sausne	Ogļhidrāti	Antociāni	Polifenoli
Acetonitrils 49,5%, TFA 0,5%	37,24 ± 1,53 ^b	7,82 ± 0,27 ^c	0,228 ± 0,006 ^b	3,84 ± 0,12 ^b
Acetons 50%	34,29 ± 1,41 ^b	12,17 ± 0,43 ^b	0,151 ± 0,004 ^b	2,70 ± 0,08 ^c
Acetons 75%	36,01 ± 1,48 ^b	18,52 ± 0,65 ^a	0,156 ± 0,004 ^b	2,69 ± 0,08 ^c
Metanols 60%, acetons 30%	37,94 ± 1,56 ^b	16,86 ± 0,59 ^a	0,184 ± 0,005 ^b	2,34 ± 0,07 ^c
Metanols 99%, HCl 1%	48,38 ± 1,98 ^c	17,93 ± 0,63 ^a	0,451 ± 0,011 ^a	4,80 ± 0,14 ^a
Ūdens, HCl 1%	16,91 ± 0,69 ^a	14,82 ± 0,52 ^{ab}	0,098 ± 0,002 ^c	0,89 ± 0,03 ^d
Etanols 70%, HCl 1%	39,62 ± 1,59 ^b	16,85 ± 0,51 ^a	0,204 ± 0,005 ^b	3,43 ± 0,09 ^b
Metanols 99,9%, TFA 0,1%	41,12 ± 1,64 ^b	12,52 ± 0,37 ^b	0,223 ± 0,005 ^b	2,80 ± 0,07 ^c
Etanols 99,9%, TFA 0,1%	37,92 ± 1,51 ^b	12,07 ± 0,30 ^b	0,170 ± 0,004 ^b	1,61 ± 0,04 ^c
Metanols 95%, skudrskābe 5%	39,74 ± 1,58 ^b	13,05 ± 0,32 ^b	0,695 ± 0,017 ^a	4,84 ± 0,12 ^a
Metanols 99%, TFA 1%	38,82 ± 1,55 ^b	15,50 ± 0,38 ^{ab}	0,205 ± 0,005 ^b	3,61 ± 0,09 ^b

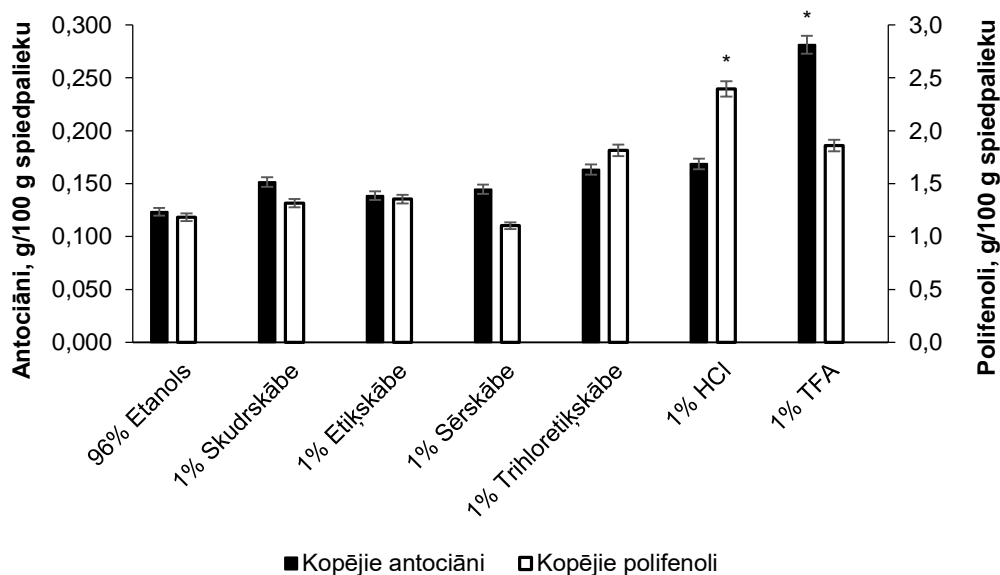
Šī pētījuma uzdevums bija pēc iespējas efektīvāka antociānu ekstrahēšana, tajā pašā laikā iegūstot arī maksimāli lielu kopējo polifenolu daudzumu. Apkopojot literatūru, tika izvēlēti citu autoru lietoti solventi un solventu kompozīcijas, kas tika izmantoti antociānu ekstrakcijā. Neskatoties uz lielo skaitu antociānu ekstrakcijām veltīto publikāciju, to ekstrakcijas apstākļi būtiski atšķiras. Pētījumu uzsākot, tika veikti vairāki eksperimenti, lai noskaidrotu optimālās solventu kompozīcijas turpmākai antociānu ekstrakcijai (3.1. tabula). Ekstrakcijā izmantotā solventa izvēles eksperimenti tika veikti izmantojot lielo ogu dzērveņu spiedpaliekas, pielietojot ultraskaņu ekstrakcijas efektivitātes paaugstināšanai.

Veiktie eksperimenti parāda, ka metanolu saturošas solventu kompozīcijas ir efektīvākās antociānu un polifenolu ekstrakcijai (3.1.tabula). Vislielākais antociānu saturs tika iegūts ekstrahējot lielogu dzērveņu spiedpaliekas ar metanolu 99%, 1% HCl (0,451 g/100 g spiedpalieku) un metanolu 95%, skudrskābi 5% (0,695 g/100 g spiedpalieku). Šie ekstrahenti nodrošina iespējas iegūt ekstraktus ar vislielāko kopējo polifenolu saturu, respektīvi, 4,80 g/100 g spiedpalieku un 4,84 g/100 g spiedpalieku. Ūdens un 1% HCl izmantošana par ekstrakcijas solventu dod zemu ekstraktvielu iznākumus (16,91 g sausnes/100 g spiedpalieku), bet samērā lielu kopējo ogļhidrātu saturu (14,81 g/100 g spiedpalieku) (3.1. tabula). Ūdens izmantošana polifenolus saturošu ekstraktu iegūšanai nav ieteicama, jo lielais ogļhidrātu saturs un mazais polifenolu/antociānu saturs (tikai 0,89/0,098 g/100 g spiedpalieku) padara šī solventa izmantošanu tālākai ekstrakta apstrādei par apgrūtinātu. Etanols, kā solvents, kuru ir iespējams izmantot pārtikas industrijā, nodrošina iespējas iegūt ekstraktus ar augstu polifenolu/antociānu saturu. Etanols 70%, HCl 1% kā ekstrakcijas solvents dod samērā augstu kopējo ekstrakcijas iznākumu (39,62 g sausne/100 g spiedpalieku), neskatoties uz augsto ogļhidrātu koncentrāciju (16,85 g/100 g spiedpalieku) un šis solvents ir izmantojams, lai iegūtu augstu kopējo polifenolu saturu (3,43 g/100 g spiedpalieku) (3.1. tabula).

Ņemot vērā polifenolu polaritāti, visbiežāk izmantotie ekstrakcijas solventi ir metanols, etanols un acetons. Veiktie eksperimenti parāda to, ka metanols ir visefektīvākais solvents, tam seko etanols, acetonitrils un acetons. Šo solventu izmantošana ekstrakcijā nodrošina arī citu polāru vielu klātbūtni iegūtajos ekstraktos, piemēram, dažādi cukuri, organiskās skābes un proteīni, kas var traucēt ekstraktu tālāku izmantošanu (gan analītiskajā darbā, gan pārtikā un biomedicīnā izmantojamu ekstraktu iegūšanai). Ekstrahējot antociānus no melnā sorgo ar metanolu un 0,1% HCl vai 70% acetonu, paskābināta metanola izmantošana nodrošināja divas reizes augstāku antociānu saturu, nekā ūdens–acetona maisījuma izmantošana (Lee et al., 2004; Awika et al., 2005). Arī maģistra darba pētījumā iegūtie rezultāti parāda to, ka acetons dod aptuveni 2–4 reizes mazāku antociānu saturu. Salīdzinot iegūtos rezultātus ar citu autoru darbiem, paskābināts etanols un metanols iezīmējas kā visbiežāk izmantotie solventi (Cacace and Mazza, 2003; Awika et al., 2005; Amr and Al-Tamimi, 2007). Tieši metanols ir minēts kā visefektīvākais solvents antociānu ekstrakcijai no vīnogām, tas ir par 20% efektīvāks kā etanols un 73% efektīvāks kā tīrs ūdens, neskatoties uz to, metanola toksiskuma dēļ, pārtikas industrijā priekšroka tiek dota etanolam (Metivier et al., 1980; Castaneda-Ovando et al., 2009). Salīdzinot antociānu saturu starp etanola un metanola ekstrakcijām, izmantojot metanolu var iegūt pat līdz 340% vairāk antociānu (etanols 70%, HCl 1% – 0,204 mg/100 g spiedpalieku un metanols 95%, skudrskābe 5%– 0,695 g/100 g spiedpalieku) (3.1. tabula).

Ekstrakcijas vides paskābināšanas ietekme uz ekstrakcijas efektivitāti

Kopējo ekstrakcijas iznākumu ietekmē daudzi faktori un viens no tiem ir vides paskābināšanas ietekme. Skābes pievienošana antociānu ekstrakcijas procesā stabilizē antociānu molekulas un paaugstina ekstrakcijas iznākumus. Apkopojot literatūrā atrasto informāciju par ekstrakcijā izmantotajām skābēm, tika izvēlētas visbiežāk izmantotās skābes - trifluoretiķskābe (Rui et al., 2011), hlorūdeņražskābe (Burdulis et al., 2007; Chen et al., 2007), skudrskābe (Lätti et al., 2007; Sójka et al., 2013), etiķskābe (Chen et al., 2016), trihloretiķskābe un sērskābe (3.1. attēls). Lai salīdzinātu katras testētās skābes izmantošanas efektivitāti, tika veiktas vairākas ekstrakcijas, salīdzinot kopējo polifenolu un antociānu saturu iegūtajos ekstraktos. Ekstrakcijas tika veiktas izmantojot ultraskaņas ekstrakcijas metodi, lielloģu dzērveņu spiedpaliekas, 50 mL 96% etanola kā ekstrahentu un 1% katras pētītās skābes (tilp.%).



3.1. attēls. Ekstrakcijas vides (96 % etanola) paskābināšanas ietekme uz polifenolu un antociānu daudzumu (g/100 g ogu spiedpalieku) ogu (lielloģu dzērvenes) spiedpalieku ekstraktos. Kļūdas intervāls atspoguļo mērījumu standartnovirzi. (*) parāda statistiski būtiskas atšķirības (t-test, $p < 0,05$, $n=3$), salīdzinot ar 96 % etanolu.

Ekstrakcijas vides paskābināšana, izmantojot dažādas skābes, parādīja būtiskas atšķirības ekstrakcijā iegūto kopējo polifenolu un antociānu daudzumā (3.1. attēls). Kaut gan atšķirības nebija statistiski būtiskas, skudrskābe, etiķskābe, sērskābe un trihloretiķskābe dotajās ekstrakcijās uzrādīja nedaudz lielākus polifenolu un antociānu iznākumus kā etanols, kam netika pievienota skābe. Ekstrakcijā izmantojot hlorūdeņražskābi (HCl), izdevās iegūt būtiski vairāk polifenolu (2,4 g/100 g spiedpalieku), nekā izmantojot citu skābju piedevas, bet iegūtais antociānu daudzums bija līdzīgs (0,169 g/100 g spiedpalieku). Trifluoretiķskābe (TFA) uzrādīja ievērojami lielāku antociānu daudzumu

(0,281 g/100 g spiedpalieku) nekā citas testētās skābes, bet līdzīgus daudzumus polifenolu (1,9 g/100 g spiedpalieku) iegūtajos ekstraktos.

Antociānu ekstrakcijai izmantojot paskābinātus solventus, ir jāņem vērā antociānu stabilitāte. Ekstrakcijā nav ieteicams izmantot stipras skābes, kas var hidrolizēt ekstraktā esošos acilētos antociānus (antociānu glikozīdu saites) (Kapasakalidis et al., 2006). Lai izvairītos no antociānu hidrolīzes, ir ieteicams izmantot vājākas skābes, piemēram, etiķskābe, skudrskābe, nevis stipras skābes, kā sērskābe un sālsskābe (Denev et al., 2010). Trifluoretiķskābe tiek izmantota ekstrakcijā pētniecībā, kā arī analītiskajā darbā, un arī maģistra darba pētījumā šīs skābes piedeva nodrošināja vislielākos antociānu iznākumus, kas ir skaidrojams ar šīs skābes augsto elektronegativitāti pateicoties molekulā esošās trifluormetilgrupas ietekmei uz protona atšķelšanos no karboksilgrupas (Key et al., 1997). Hlorūdeņražskābes piedevas ekstrahentam nenodrošināja lielākus antociānu iznākumus, tajā pašā laikā uzrādot augstākas polifenolu koncentrācijas nekā citas pētītās skābes, kas ļauj secināt, ka HCl ir izmantojama citu polifenolu ekstrakcijai. Šo skābju izmantošanas gadījumā noteikti ir jāņem vērā to ietekme uz tālāk izmantojamajām analītiskajām metodēm, jo zems pH un stipras skābes var ietekmēt analītiskos mērījumus, kā arī bojāt aparātūru. Tāpat ir jāņem vērā ekstrakta tālākas izmantošanas mērķis. Izstrādājot produktu (sausu polifenolu koncentrātu), skābes klātbūtne nav vēlama, no tās ir jāspēj atbrīvoties pēc iespējas vieglāk, tādējādi nesadārdzinot ražošanas procesu.

Ņemot vērā visus faktoros, ekstrakcijas vides paskābināšanai ir ieteicams izmantot organiskās skābes, piemēram, skudrskābi – no tās ir viegli atbrīvoties pēc ekstrakcijas (ietvaicēt pazeminātā spiedienā) un tā nedegradē ekstraktā esošos savienojumus. Vienlaikus, pētniecībai iespējams izmantot ekstrakcijas vides paskābināšanai trifluoretiķskābi.

Ekstrakcijas metodes izvēle

Liela daļa bioloģiski aktīvo vielu, tajā skaitā polifenoli, ir atrodamas ogu miziņās un sēkliņās. Pareiza ekstrakcijas metodes izvēle ļauj iegūt maksimāli lielu polifenolu un antociānu saturu ekstraktos. Lai noskaidrotu visefektīvāk izmantojamo ogu spiedpalieku ekstrakcijas metodi, tika veikti eksperimenti pielietojot dažādas ekstrakcijas metodes, ekstrahējot lielogu dzērveņu spiedpaliekas un 96% etanolu ar 0,5% trifluoretiķskābes piedevu (tilp. %) (3.2. tabula).

3.2. tabula. Lielogu dzērveņu spiedpalieku ekstrakcijā izmantoto metožu salīdzinājums. Rezultāti izteikti kā g/100 g spiedpalieku. (\pm) parāda mērījumu standartnovirzi. (^{a,b,c,d}) atšķirīgi burti parāda statistiski būtiskas atšķirības starp parametriem katras grupas ietvaros (ANOVA, Tukeys HSD test, n=3).

Ekstrakcijas metode	Sausne	Ogļhidrāti	Antociāni	Polifenoli
Mikroviļņu ekstrakcija	21,01 \pm 0,86 ^a	8,80 \pm 0,36 ^a	0,054 \pm 0,001 ^a	1,09 \pm 0,04 ^a
Soksleta ekstrakcija	23,88 \pm 1,80 ^a	8,33 \pm 0,34 ^a	0,065 \pm 0,002 ^a	1,21 \pm 0,05 ^a
100W ultraskaņas apstrāde	34,05 \pm 1,40 ^b	11,46 \pm 0,47 ^b	0,135 \pm 0,003 ^b	1,59 \pm 0,07 ^b
360W ultraskaņas apstrāde	34,53 \pm 1,42 ^b	12,15 \pm 0,50 ^b	0,147 \pm 0,004 ^b	1,68 \pm 0,07 ^b
Mehāniska kratīšana (24st.)	33,01 \pm 1,35 ^d	11,78 \pm 0,48 ^d	0,098 \pm 0,002 ^c	1,12 \pm 0,06 ^c
Ekstrakcija ar superkritisko CO ₂	3,41 \pm 0,19 ^c	0,05 \pm 0,01 ^c	ND	0,05 \pm 0,01 ^d

legūtie rezultāti parāda, ka izmantojot ekstrakciju ar superkritisko CO₂ tika iegūti zemi kopējie rezultāti (3,41 g sausnes/100 g spiedpalieku), arī polifenolu iznākums (0,05 g/100 g spiedpalieku), kopējais ogļhidrātu saturs (0,05 g/100 g spiedpalieku) šajā ekstraktā bija ļoti zems, bet antociāni netika detektēti (ND) (3.2. tabula). Mikroviļņu ekstrakcija un Soksleta ekstrakcija uzrādīja līdzīgus ekstrakcijas iznākumus (21,01; 23,88 g sausne/100 g spiedpalieku), kā arī līdzīgu polifenolu saturu (1,09; 1,21 g/100 g spiedpalieku) un antociānu saturu (0,054; 0,065 g/100 g spiedpalieku). Ekstrakcijai izmantojot ultraskaņu ar dažādām jaudām, tika iegūti visaugstākie sausnes iznākumi (34,05–34,53 g/100 g spiedpalieku), kas liecina par šīs ekstrakcijas metodes kopējo efektivitāti. Arī antociānu (0,135–0,147 g/100 g spiedpalieku) un polifenolu (1,59–1,68 g/100 g spiedpalieku) saturs izmantojot šo ekstrakcijas metodi bija visaugstākais (3.2. tabula).

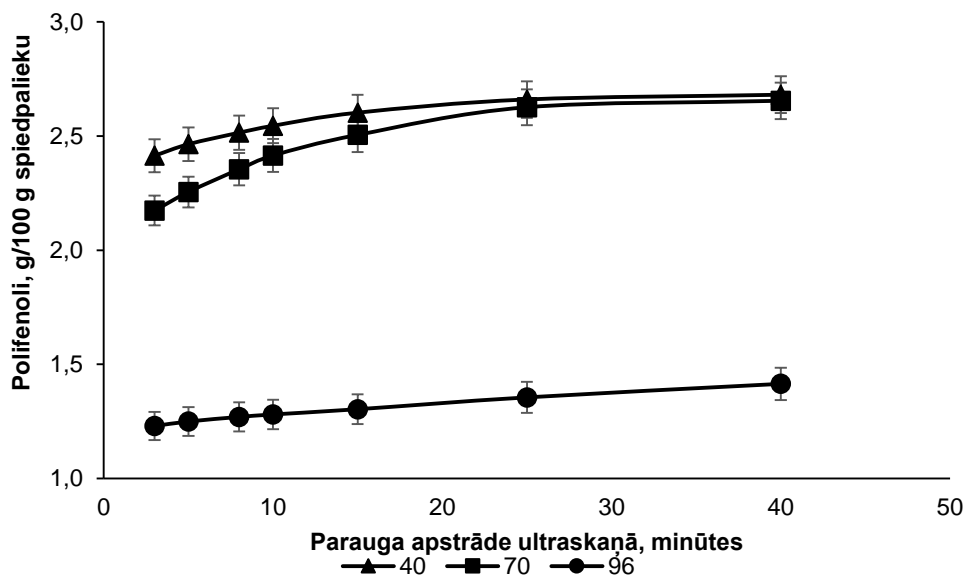
Ogu ekstraktu iegūšanai visbiežāk izmantotās ekstrakcijas metodes ir apstrāde ar ultraskaņu un mikroviļņu ekstrakcija (Chen et al., 2007; Lätti et al., 2007; Čujić et al., 2016), kā arī ekstrakcijas, kur ilgu laiku paraugs tiek kratīts kopā ar ekstrahentu (Pinelo et al., 2005; Makris et al., 2008; Denev et al., 2010). Superkritiskā CO₂ ekstrakcija deva viszemākos iznākumus, kas visticamāk skaidrojams ar šīs metodes selektivitāti attiecībā pret hidrofobiem savienojumiem. Superkritiskā CO₂ ekstrakcija nodrošina iespējas izdalīt savienojumu grupas, kas šķīst, piemēram, heksānā (nepolārs šķīdinātājs), kas izskaidro zemo polifenolu un antociānu saturu (3.2. tabula). Neskatoties uz superkritiskā CO₂ ekstrakcijas zemo iznākumu, šī metode ļauj sagatavot ekstraktus, kas bagāti ar lipīdiem (vaski, taukskābes, steroli). Papildus lipīdu ekstraktam, izmantojot subkritisko CO₂, kur izekstrahētais ogu materiāls tiek skalots ar etanolu, vai citu polāru šķīdinātāju, būtu iespējams iegūt polifenoliem bagātu ekstraktu (Paula et al., 2013). Mikroviļņu ekstrakcijā galvenais faktors, kas veicina ekstraktvielu šķīšanu solventā, ir temperatūra, bet ņemot vērā polifenolu lokāciju šūnā, šī ekstrakcijas metode nespēj atbrīvot maksimāli daudz

polifenolu. Soksleta metode pēc sava darbības principa ekstrakciju nodrošina izmantojot tīru solventu, kas spēj iztvaikot un tad kondensēties parauga kapsulā. Ņemot vērā etanola spēju veidot azeotropu ar ekstrakcijā izmantoto skābi (TFA), var secināt, ka ekstrakcijas gaitā tikai neliels daudzums skābes nonāca kontaktā ar pašu paraugu, ko parāda zemais antociānu saturs ekstraktā (3.2. tabula). Ultraskaņas ekstrakcija ar dažādām jaudām uzrādīja visaugstākos ekstrakcijas iznākumus. Paraugu apstrādājot ar ultraskaņu, šūnapvalki tiek sagrauti, kas nodrošina šūnā esošo vielu atbrīvošanu apkārtējā vidē, tajā skaitā arī polifenolu, ogu spiedpalieku ekstrakcijas gadījumā tas ir īpaši svarīgi, jo paraugā esošajām ogu miziņām ir biezi šūnapvalki (Ćujić et al., 2016). Ekstrakcijas metožu salīdzinājums ļauj secināt, ka ultraskaņas ekstrakcija ir vispiemērotākais ekstrakcijas veids tieši ogu spiedpaliekām, šī metode ir arī vienkārša un lēta, kas to ļautu izmantot ne tikai analītisko paraugu sagatavošanai, bet arī ražošanas procesā.

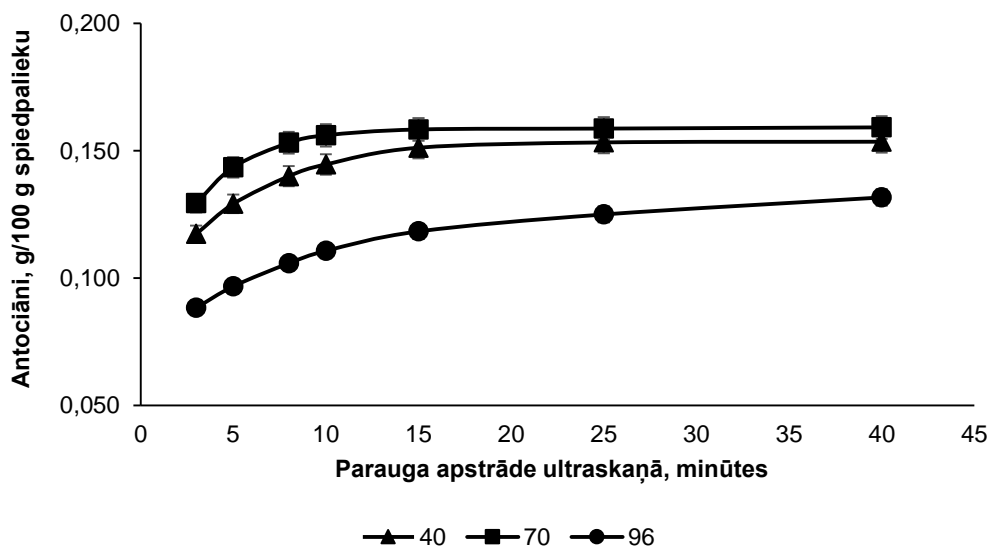
Ultraskaņas ekstrakcijas optimizācija

Veiktie eksperimenti optimālās ekstrakcijas metodes noskaidrošanai atklāja, ka ultraskaņas ekstrakcija ir vispiemērotākā ogu spiedpalieku ekstrakcijai (3.2. tabula). Kā viens no galvenajiem ultraskaņas ekstrakciju ietekmējošajiem faktoriem tika identificēts parauga apstrādes ilgums ultraskaņā. Lai noskaidrotu, kā parauga apstrādes ilgums ultraskaņā ietekmē antociānu un polifenolu saturu ekstraktos, tika veiktas 7 eksperimentu sērijas, kurās izmantoja 3 dažādu koncentrāciju etanola:ūdens maisījumu (96%, 70%, 40%) kopā ar 5% skudrskābes piedevas (tilp.%). Izmantojot augstāk minēto ekstrahentu sistēmu, tika veikta ekstrakcijas ar ultraskaņas apstrādi 3, 4, 7, 10, 15, 25 un 40 minūtes (3.2., 3.3. attēli).

Katrā laika punktā tika nomērīti divi parametri (polifenolu un antociānu saturs), tie tika grafiski attēloti atkarībā no parauga apstrādes ilguma ultraskaņā (3.2., 3.3. attēli). Tika noskaidrots, ka 40% un 70% etanols ir efektīvāks polifenolu un antociānu ekstrakcijas solvents nekā 96% etanols. Ar 40% un 70% etanolu izekstrahēto antociānu un polifenolu saturs bija statistiski būtiski augstāks nekā ar 96% etanolu ekstrahētais. d'Alessandro et al., (2012) izmantojot 95% etanolu aroniju polifenolu ekstrakcijā arī parāda šādas koncentrācijas etanolu kā mazāk efektīvu ekstrahentu. Ekstrakcijas kinētikas raksturs ļauj secināt, ka gan antociānu, gan polifenolu ekstrakcijas gadījumā nav būtiskas atšķirības starp 15, 25 un 40 minūšu ilgu ultraskaņas apstrādi. Pirmkārt, šie rezultāti parāda dažādu koncentrāciju etanola ekstrakcijas efektivitāti, kas būtiski palielinās paaugstinot etanola atšķaidījuma pakāpi. Otrkārt, optimālais ekstrakcijas ilgums ir 15–25 minūtes (3.2., 3.3. attēli).



3.2. attēls. Polifenolu ekstrakcijas kinētika no lieloģu dzēveņu spiedpaliekām ultraskaņas iedarbības rezultātā atkarībā no parauga apstrādes ilguma. Kļūdas intervāls atspoguļo mērījumu standartnovirzi, $n=3$. 40, 70, 96 apzīmē etanola koncentrāciju, %.



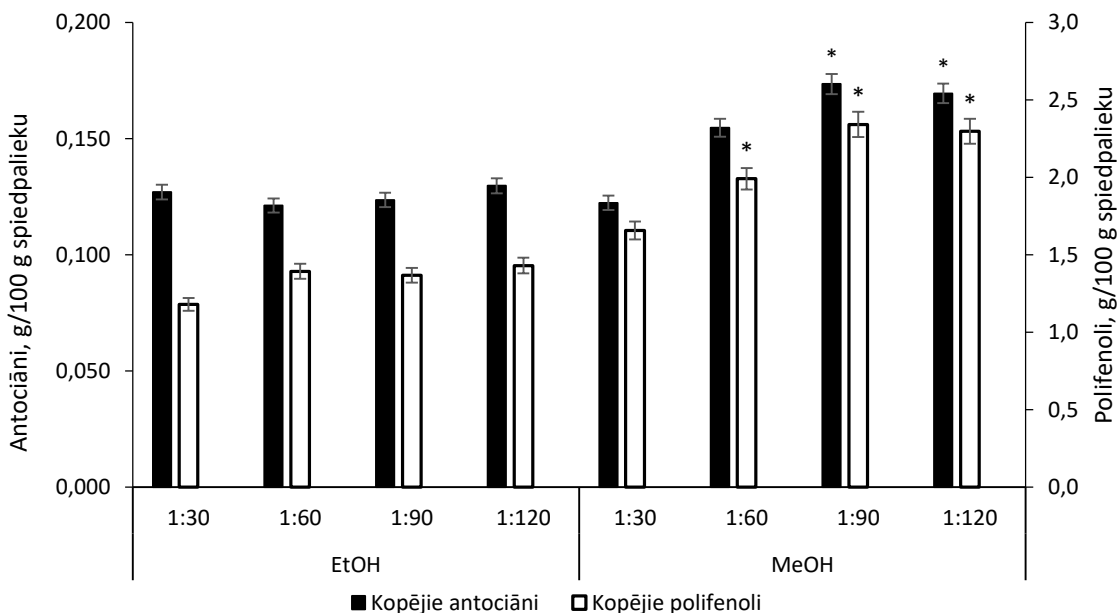
3.3. attēls. Antociānu ekstrakcijas kinētika no lieloģu dzēveņu spiedpaliekām ultraskaņas iedarbības rezultātā atkarībā no parauga apstrādes ilguma ultraskaņā. Kļūdas intervāls atspoguļo mērījumu standartnovirzi, $n=3$. 40, 70, 96 apzīmē etanola koncentrāciju, %.

Solventa:spiedpaliekū attiecības optimizācija

Ekstrakcijas iznākumu maksimizēšana ir nozīmīgs solis optimizācijā, tas ietaupa laiku un darbā ieguldītos materiālus, jo tāds pats ekstrakcijas iznākums var tikt sasniegts izmantojot mazāk solventa un parauga. Lai izpētītu etanola un metanola ekstrakcijas efektivitāti un ietekmi uz polifenolu un antociānu iznākumu, tika veikti 8 eksperimenti,

kuros tika mainīta solventa:ogu spiedpalieku attiecība. Tika pētītas 4 dažādas solventa:spiedpalieku attiecības, 1:30, 1:60, 1:90, 1:120. Visiem izmantotajiem solventiem tika pievienota 5% skudrskābe (tilp. %) un tika veikta ultraskaņas ekstrakcija.

Eksperimentos, kur tika izmantots etanols, netika novērota statistiski būtiska atšķirība starp testētajām solventa:spiedpalieku attiecībām. Ekstrakcijās, kur tika izmantots metanols, optimālā solventa:spiedpalieku attiecība tika novērota starp 1:90 un 1:120 un šie eksperimenti uzrādīja statistiski būtiskus augstākus rezultātus gan antociāniem (0,174 g un 0,169 g/100 g spiedpalieku), gan polifenoliem (2,34 g un 2,29 g/100 g spiedpalieku) (3.4. attēls).



3.4. attēls. Polifenolu un antociānu ekstrakcijas iznākums (g/100 g lieloģu dzērveņu spiedpalieku) metanolā (MeOH) un etanolā (EtOH) ar pievienotu skudrskābi (5%, tilp. %) atkarībā no solventa:ogu spiedpalieku masas attiecībām. Kļūdas intervāls atspoguļo mērījumu standartnovirzi. (*) parāda statistiski būtiskas atšķirības (t-test, $p < 0,05$, $n = 3$).

Iegūtie rezultāti parāda etanola un metanola ekstrakcijas efektivitāti: ekstraktvielu iznākums, izmantojot etanolu sasniedz piesātinājumu pie solventa:spiedpalieku attiecības 1:30, savukārt metanola ekstrakcijas kapacitāte ir augstāka un piesātinājumu sasniedz pie 1:90–1:120. Eksperimenta rezultāti ir salīdzināmi ar citu autoru iegūtajiem (d’Alessandro et al., 2012), kad veicot ultraskaņas ekstrakcijas optimizāciju ar etanolu no aronijām pielietotā solventa:ogu materiāla attiecību tika noteikta kā 1:20, kas liek domāt, ka etanola ekstrakcijas efektivitāte sasniedz piesātinājumu aptuveni pie solventa:spiedpalieku attiecības 1:20–1:30.

3.1.2. Ekstrakcijā izmantoto solventu kompozīcijas optimizācija

Tradicionālās ekstrakcijas optimizācijas metodes tiek parasti veiktas empīriskā veidā, kur vienlaicīgi tiek mainīts tikai viens ekstrakciju ietekmējošs faktors – šāda pieeja ir laikietilpīga un visticamāk “patiesais” optimums tā arī netiek sasniegts, jo iegūtie parametri ir tieša mainīto parametru funkcija, kas neņem vērā ekstrakcijā iesaistīto faktoru mijiedarbību. Matemātiska optimizācija ņem vērā dažādu faktoru mijiedarbību. Reakcijas virsmas metodoloģija (RSM), kuru izveidoja Bokss un Vilsons (Box and Wilson 1951), izmanto statistikas metodes, lai optimizētu procesus un identificētu visbūtiskākās mijiedarbības.

Polifenolu ekstrakcijas optimizācijas eksperimentu mērķis bija izvēlēties optimālos polifenolu un antociānu ekstrakcijas apstākļus, izmantojot RSM pieeju. Lai validētu izvēlētos, optimālos ekstrakcijas apstākļus (ekstrakcijā izmantojamo ekstrahentu), tika veiktas ekstrakcijas, izmantojot dažādus ogu paraugus – žāvētas, veselas ogas un ogu spiedpaliekas no 5 *Vaccinium* ģints sugu ogām. Veicot šādu salīdzinājumu, tika noskaidrots, kuru ogu un kāda veida paraugs ir ar vislielāko potenciālu interesējošo ekstraktvielu iegūšanai. Ekstrakcijas optimizācija tika veikta ar diviem ekstrahentiem, etanolu un metanolu, ņemot vērā iespējas iegūt augstākos ekstraktvielu daudzumus analītiskai izpētei (ko nodrošina metanola un trifluoretiķskābes izmantošana), gan arī izmantošanas iespējas metodes rūpnieciskai izmantošanai. Ekstrakcijas optimizācijai tika izmantotas lielogu dzērveņu spiedpaliekas, validācijas eksperimentiem krūmmelleņu, parasto melleņu, purva dzērveņu, lielogu dzērveņu un brūkleņu spiedpaliekas, kā arī veselas, žāvētas ogas. No pētītajām ogām iegūto optimālo ekstraktu antociānu sastāvs tika noteikts izmantojot UPLC.

Sadaļā materiāli un metodes 2.1. tabulā ir parādīti neatkarīgie mainīgie, kas tika pielietoti RSM modeļa izveidē. 2.2. tabula parāda eksperimentāla dizaina piemēru, kas tika izmantots RSM modeļa datu punktu iegūšanai. Izveidotie modeļi, kas balstīti uz eksperimentālo dizainu (2.2. tabula) atbilst kvadrātiskam polinomiālam modelim. Lai novērtētu modeļa atbilstības adekvātumu veikta atbilstības pārbaude. Dispersijas analīze parādīja, ka izraudzītais kvadrātiskais modelis adekvāti reprezentē eksperimentālos datus attiecībā uz kopējo polifenolu un kopējo antociānu saturu (visas p vērtības visiem modeļiem $< 0,05$). Adekvāta atbilstība nodrošina uzticamus un reproducējamus rezultātus, kas atbilstības adekvātumu novērtējumu padara būtisku. Daudzfaktoru determinācijas koeficients bija robežās no 0,8941 līdz 0,9875, izskaidrojot lielāko daļu atbilstošo regresentu variabilitātes un parādot labu modeļa atbilstību. 3.3. tabula parāda R^2 vērtības katram no piemērotajiem modeļiem. Visi neatkarīgie mainīgie bija būtiski ($p < 0,05$), izņemot modeļus, kas apraksta metanola un skudrskābes izmantošanu antociānu ekstrakcijai un metanola un trifluoretiķskābes izmantošanu polifenolu ekstrakcijai ($p > 0,05$) (3.3. tabula), tomēr mijiedarbība starp solventu/skābi uzrādīja būtisku mijiedarbības efektu ($p = 0,0329$ and $p = 0,0154$, respektīvi).

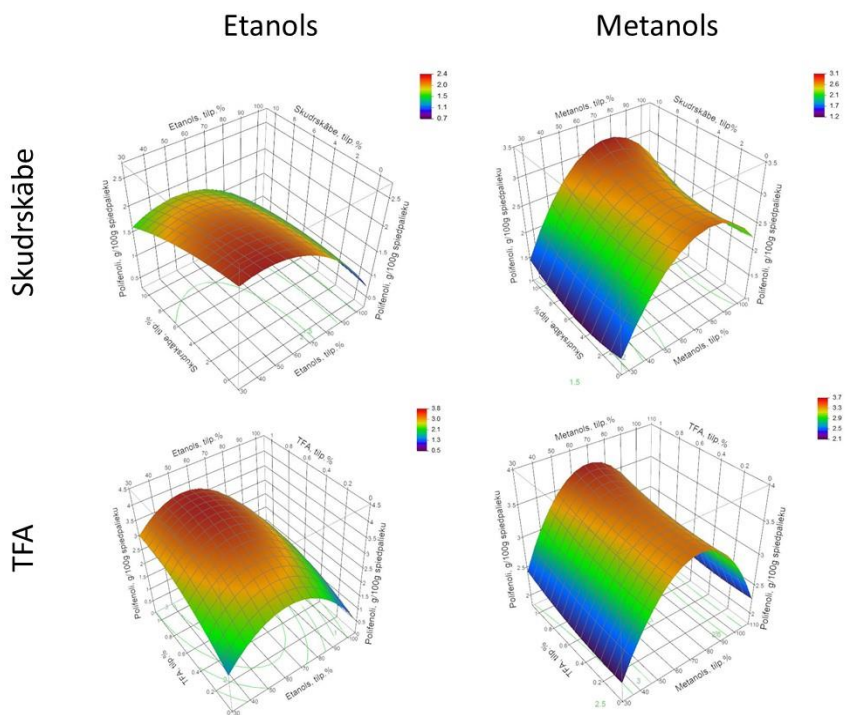
3.3. tabula. Daudzfaktoru determinācijas koeficienti un neatkarīgo mainīgo p-vērtības izstrādātajos polinomiālajos modeļos atkarībā no atbildes mainīgajiem (polifenoli, antociāni).

Ekstrakcijas solvents	Pievienotā skābe	Atbildes mainīgais	p vērtības ^a	R ²
Etanols	Skudrskābe	Antociāni	0,014*; 0,013*	0,9493
		Polifenoli	<0,0001*; <0,0001*	0,9654
	Trifluoretiķskābe	Antociāni	0,0005*; 0,0486*	0,9721
		Polifenoli	0,0024*; 0,0102*	0,9687
Metanols	Skudrskābe	Antociāni	0,0818; 0,2378	0,8941
		Polifenoli	0,0009*; 0,0126*	0,9875
	Trifluoretiķskābe	Antociāni	0,0012*; 0,0105*	0,9551
		Polifenoli	0,6516; 0,0837	0,9665

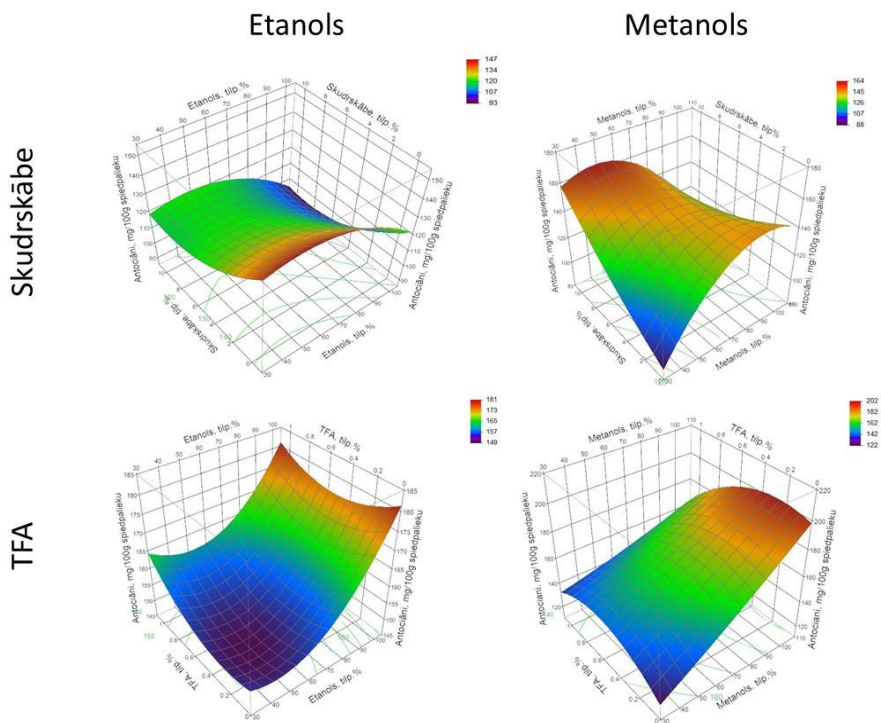
^a p-vērtības neatkarīgajiem mainīgajiem (solvents; skābe); * būtisks, 5%

iegūto reakcijas virsmu analīze

Neatkarīgo mainīgo ietekme uz ekstrakcijas procesu ir statistiski būtiska, kas nozīmē, ka mainot solventa un skābes koncentrāciju ekstrahētā, būtiski mainās ekstrahēto polifenolu (3.5. attēls) un antociānu (3.6. attēls) daudzums, kas skaidrojams ar lielo polifenolu molekulu dažādību. Tika sagaidīts, ka abas pētītās atbildes reakcijas (antociāni un polifenoli) parādīs korelāciju, neskatoties uz to, RSM pieeja atklāja, ka optimālie ekstrakcijas apstākļi antociāniem atšķiras no kopējo polifenolu ekstrakcijai vispiemērotākajiem apstākļiem. RSM modelī maksimizējot ekstrahēto antociānu daudzumu tas noveda pie polifenolu koncentrācijas samazināšanās un *vice versa*. Ņemot vērā šī eksperimenta mērķi maksimizēt polifenolu un antociānu ekstrakcijas iznākumus, tika izvēlēti optimālie ekstrakcijas apstākļi gan polifenolu, gan antociānu ekstrakcijai (3.5., 3.6. attēls).



3.5. attēls. Iegūtās kopējo polifenolu ekstrakcijas reakcijas virsmas atkarībā no izmantotā šķīdinātāja un skābes koncentrācijas.



3.6. attēls. Iegūtās kopējo antociānu ekstrakcijas reakcijas virsmas atkarībā no izmantotā šķīdinātāja un skābes koncentrācijas.

Izmantojot JMP® programmatūrā pieejamo kontūru profilu rīku (no angļu val. *contour profiler tool*), tika izvēlētas optimālās šķīdinātāju/skābju koncentrācijas polifenolu/antociānu ekstrakcijai. Abi testētie solventi (etanols, metanols) tika izvēlēti validācijas eksperimentiem. Šiem solventiem ir dažādi pielietojumi, etanols ir pielietojams arī pārtikas rūpniecībā, savukārt metanols ir izmantojams paraugu sastāva analītiskajai raksturošanai. Augstākās atbildes reakcijas, gan polifenoliem, gan antociāniem, kombinācijā ar abiem solventiem deva TFA dažādās koncentrācijās (3.4. tabula).

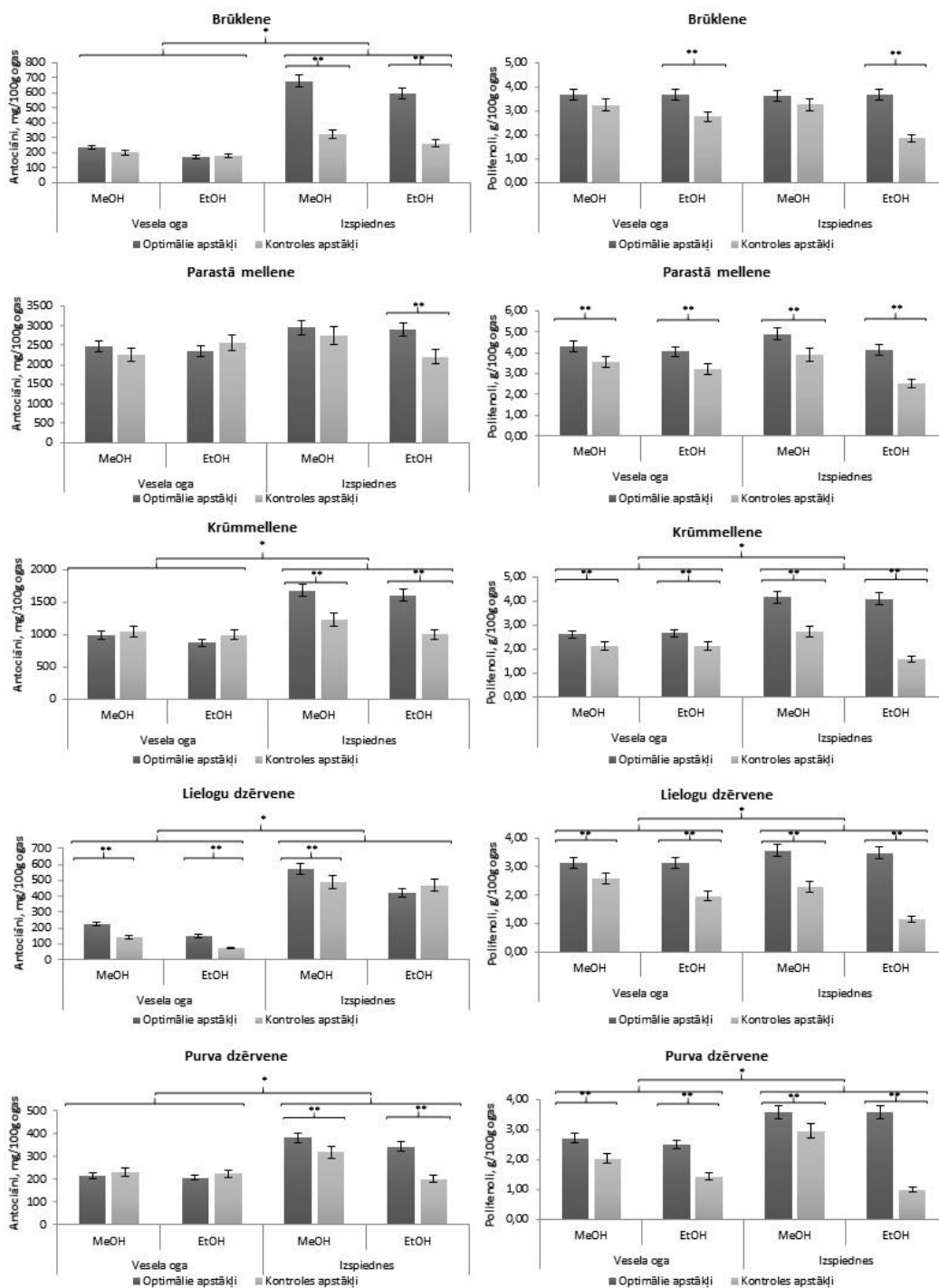
3.4. tabula. Optimizētie antociānu un polifenolu ekstrakcijā izmantojamie ekstrahenti. ^a Antociānu un polifenolu validācijas eksperimentos ekstrakcijā izmantoto solventu saīsinājumi.

Optimālie apstākļi		Solvents, tilp. %	Skābe, tilp. %	Validācija ^a
		Antociāni	Metanols, 97,3	TFA, 0,3
		Etanols, 40,0	TFA, 1,0	EtOH
Polifenoli		Metanols, 70,0	TFA, 1,0	MeOH
		Etanols, 57,0	TFA, 0,9	EtOH
Kontroles apstākļi	Antociāni/ polifenoli	Metanols, 40	Skudrskābe, 1	MeOH
		Etanols, 90	Skudrskābe, 10	EtOH

Optimālo ekstrakcijas apstākļu validācija

Reakcijas virsmas optimizācijas rezultātā iegūtie optimālie apstākļi ar abiem testētajiem šķīdinātājiem, etanolu un metanolu (3.4. tabula), tika validēti izmantojot 5 dažādas *Vaccinium* ģints ogu sugas. Viens no validācijas eksperimentu mērķiem bija salīdzināt veselu, žāvētu ogu polifenolu un antociānu saturu ar ogu spiedpalieku (izspiedņu) polifenolu un antociānu saturu. Validācijas eksperimenti tika veikti izmantojot liofilizētas veselas ogas un liofilizētas ogu izspiednes, kas pēc tam tika samaltas. 0,5 g ogu pulvera tika iesvērti un aplieti ar 50 mL atbilstošā šķīdinātāja un 20 minūtes apstrādāti ultraskaņā.

Ekstrakcijas optimizācijas validācijas eksperimentos iegūtie rezultāti parāda, ka antociānu saturs brūkleņu izspiednēs ir būtiski augstāks, nekā veselās ogās, bet kopējo polifenolu saturs abos paraugu veidos ir līdzīgs (3.7. attēls). Parastajās mellenēs antociānu un polifenolu saturs ir līdzīgs, gan ogu spiedpaliekās, gan veselās ogās. Pretēji parastajām mellenēm, krūmmelleņu izspiednēs ir būtiski augstāks polifenolu un antociānu saturs. Tas pats ir novērojams lielogu dzērvenēs un purva dzērvenēs, ir būtiskas atšķirības starp ogu spiedpaliekām un veselām ogām (3.7. attēls).



3.7. attēls. Reakcijas virsmas optimizācijā iegūto optimālo ekstrakcijas apstākļu validācijas eksperimenti. Salīdzinātas 5 *Vaccinium* ģints ogu sugas, 2 dažādi parauga veidi (izspiednes, veselas ogas) izmantojot optimālos apstākļus etanolam (EtOH) un metanolam (MeOH). ** apzīmē statistiski būtisku atšķirību starp kontroles un optimālajiem apstākļiem. * apzīmē statistiski būtisku atšķirību starp parauga veidiem (paired t-test, n=3). Kļūdas intervāls atspoguļo mērījumu standartnovirzi. Kontroles un optimālie apstākļi atrodami 3.4. tabulā.

Statistiski salīdzinot (t-tests) abus izmantotos solventus, neparādās būtiskas atšķirības, neskatoties uz to, ekstrakcijas, kur izmantots metanols, dod augstākus ekstrakcijas iznākumus. Salīdzinot dažādas ogas var secināt, ka parastajās mellenēs ir būtiski vairāk antociānu un polifenolu, nekā pārējās izmantotajās ogās. Izmantotie kontroles apstākļi uzrāda būtiski zemākus antociānu un polifenolu iznākumus, kas vēlreiz apstiprina izvēlēto optimālo apstākļu efektivitāti, ne tikai lielogu dzērveņu spiedpalieku ekstrakcijā, bet arī citu ogu un dažādu parauga veidu ekstrakcijā (3.7. attēls).

Balstoties uz iegūtajiem validācijas eksperimentu rezultātiem (3.7. attēls) var secināt, ka matemātiski iegūtie optimālie un kontroles ekstrakcijas apstākļi izmantojot RSM pieeju ir veiksmīgi pielietojami ogu spiedpalieku un žāvētu ogu pulveru ekstrakcijā. Kā tika novērots, visās pētītajās ogu spiedpaliekās, izņemot parastās mellenes, antociānu un polifenolu saturs ir augstāks, nekā veselās ogās. Veselās ogās lielu masas daļu sastāda ogļhidrāti, kuru saturs spiedpaliekās ir ievērojami mazāks, jo sulas spiešanas procesā lielākā daļa ogās esošo cukuru tiek pārnesti sulā. Tādām ogām kā lielogu dzērvenēm, krūmmellenēm un brūklenēm, ogas mīkstums ir bezkrāsains (nesatur antociānus), kas izskaidro veselo ogu zemo antociānu saturu, salīdzinājumā ar ogu izspiednēm, kas satur ogu miziņas. Turpretī parastā mellene, kas ir intensīvi krāsota gan miziņā, gan mīkstumā, satur vienādi daudz antociānu spiedpaliekās un veselās ogās. Iegūtie rezultāti sakrīt ar jau iepriekš novēroto – polifenoli tiek saistīti pie šūnapvalka, tādējādi polifenolu saturs spiedpaliekās ir lielāks (Schuster and Herrmann, 1985; Strack, 1997). 3.4. tabulā minētie optimālie ekstrakcijas apstākļi ir veiksmīgi izmantojami ogu spiedpalieku un veselu ogu polifenolu un antociānu ekstrakcijai. Izvēlētais pētījuma un optimizācijas objekts, ogu spiedpaliekas, veiktajos validācijas eksperimentos, balstoties uz kopējo polifenolu un antociānu mērījumiem, ir ekstrakcijā veiksmīgi izmantojams materiāls, kas satur paaugstinātas ekstraktvielu koncentrācijas. No praktiskā viedokļa šie rezultāti parāda, ka ogu spiedpaliekas satur nozīmīgas ekstraktvielas ar plašu to izmantošanas potenciālu. Pašlaik ogu spiedpaliekas tiek uzskatītas par atkritumproduktu, tiek nelietderīgi utilizētas.

Antociānu saturs ekstraktos izmantojot optimālos ekstrakcijas apstākļus

Izmantojot hromatogrāfiskās metodes ir iespējams noskaidrot katras interesējošās vielas koncentrāciju un izsekot paraugā esošo savienojumu mainībai parauga apstrādes procesā (parauga pakļaušana sulas spiešanai, žāvēšanai, ekstrakcijai). Tika pētīti ogu spiedpalieku metanola ekstrakti, kas iegūti optimālajos apstākļos, lai noskaidrotu kā mainās antociānu sastāvs atkarībā no pētītās ogas, veselās ogās un ogu spiedpaliekās (3.4. tabula, 3.7. attēls).

Optimālajos ekstrakcijas apstākļos iegūtajos antociānu ekstraktos tika atrasti 15 dažādi antociāni, kas tika identificēti izmantojot UPLC-PDA (3.8. attēls). Savienojumu identifikācija tika veikta balstoties uz references standartu izdalīšanās laiku (RT) un literatūrā aprakstīto antociānu izdalīšanās secību, lietojot līdzīgus hromatogrāfijas apstākļus. Sarkani krāsotās ogas satur 4 (brūklenes) līdz 6 dažādus antociānus (lielogu un

purva dzērvenes). Tumši krāsotās ogas (parastās un krūmmellenes) satur 15 identificētos antociānus (3.5. tabula). Parastajās mellenēs lielāko antociānu daļu veido delfinidīna-3-O-galaktozīds un delfinidīna-3-O-glikozīds (≈14%), savukārt krūmmellenēs papildus minētajiem savienojumiem augstās koncentrācijās ir atrodami arī peonidīna-3-O-arabinozīds (līdz 32% ogu spiedpaliekās), malvidīna-3-O-glikozīds (22,39% veselās ogās) un malvidīna-3-O-arabinozīds (23,59% ogu spiedpaliekās). Purva dzērvenēs visvairāk tika atrasts cianidīna galaktozīds (līdz 23,93% ogu spiedpaliekās) un peonidīna galaktozīds (33,45% ogu spiedpaliekās) (3.6. tabula). Arī lielogu dzērvenēs viens no galvenajiem antociāniem ir peonidīna galaktozīds (30,51% veselās ogās), bet šajās ogās augstākās koncentrācijās, nekā purva dzērvenēs, ir atrodams cianidīna arabinozīds (34,70% ogu spiedpaliekās). Brūklenēs, no tajās atrodamajiem 4 antociāniem, visvairāk ir atrodams cianidīna galaktozīds (83,02% veselās ogās) (3.5.,3.6. tabula).

3.5. tabula. Optimizētos ekstrakcijas apstākļos iegūtos ogu spiedpalieku/veselu ogu ekstraktos atrastie antociāni un to daudzums. Delfinidīna-3-O-galaktozīds (D-gal), delfinidīna-3-O-glikozīds (D-glc), cianidīna-3-O-galaktozīds (Cy-gal), delfinidīna-3-O-arabinozīds (D-ara), cianidīna-3-O-glikozīds (Cy-glc), petunidīna-3-O-galaktozīds (Pt-gal), cianidīna-3-O-arabinozīds (Cy-ara), petunidīna-3-O-glikozīds (Pt-glc), peonidīna-3-O-galaktozīds (Pe-gal), petunidīna-3-O-arabinozīds (Pt-ara), peonidīna-3-O-glikozīds (Pe-glc), malvidīna-3-O-galaktozīds (Mv-gal), peonidīna-3-O-arabinozīds (Pe-ara), malvidīna-3-O-glikozīds (Mv-glc), un malvidīna-3-O-arabinozīds (Mv-ara). Koncentrācija mg/100 g ogu spiedpalieku/veselu ogu. ± Parāda mērījumu standartnovirzi (n=5). “—” apzīmē savienojumus, kuru koncentrācija bija zem detektēšanas sliekšņa. B- ogu spiedpalieku metanola ekstrakts; C-veselu ogu metanola ekstrakts.

	Savien.	D-gal	D-glc	Cy-gal	D-ara	Cy-glc	Pt-gal	Cy-ara	Pt-glc	Pe-gal	Pt-ara	Pe-glc	Mv-gal	Pe-ara	Mv-glc	Mv-ara	Kopā (mg/g)
	Pīķis*:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Parastā mellene	B	295,63 ± 6,22	363,14 ± 3,76	259,01 ± 2,97	244,76 ± 8,01	440,88 ± 8,91		242,60 ± 0,44	87,23 ± 7,81	24,22 ± 2,67	66,55 ± 0,81	175,96 ± 5,37		99,88 ± 8,37	223,32 ± 0,64	56,81 ± 5,17	25,80 ± 0,61
	C	358,97 ± 12,85	331,34 ± 8,51	339,61 ± 10,98	292,02 ± 9,31	331,27 ± 7,10		252,96 ± 5,87	85,97 ± 0,19	20,84 ± 4,67	56,58 ± 6,95	110,70 ± 0,30		68,41 ± 2,82	160,36 ± 3,85	25,54 ± 3,49	24,35 ± 0,77
Krūmmellene	B	92,30 ± 1,65	12,00 ± 0,02	20,80 ± 0,97	80,05 ± 2,99	8,38 ± 3,17		13,00 ± 1,28	80,07 ± 4,01	8,89 ± 1,69	58,23 ± 1,04	3,34 ± 0,98		300,35 ± 1,15	38,46 ± 3,55	220,95 ± 1,05	9,37 ± 0,24
	C	41,17 ± 1,32	53,92 ± 1,96	15,32 ± 0,32	34,06 ± 0,23	25,63 ± 0,42		10,42 ± 0,43	21,33 ± 3,39	3,31 ± 0,09	10,57 ± 0,64	17,04 ± 0,17		62,06 ± 0,64	95,58 ± 2,89	36,57 ± 2,89	4,27 ± 0,15
Purva dzērvene	B	—	—	84,35 ± 1,73	—	5,78 ± 0,10	—	65,82 ± 2,54	—	117,90 ± 2,66	—	16,87 ± 1,34	—	61,71 ± 1,34	—	—	3,52 ± 0,10
	C	—	—	40,75 ± 0,92	—	5,62 ± 0,14	—	33,21 ± 1,00	—	55,55 ± 1,54	—	19,26 ± 0,75	—	31,88 ± 0,31	—	—	1,86 ± 0,05
Lielogu dzērvene	B	—	—	13,94 ± 0,63	—	1,26 ± 0,07	—	38,80 ± 1,51	—	25,21 ± 1,54	—	2,77 ± 0,28	—	29,83 ± 0,62	—	—	1,12 ± 0,05
	C	—	—	137,56 ± 2,05	—	—	—	97,27 ± 1,79	—	134,95 ± 2,06	—	4,14 ± 0,29	—	68,43 ± 1,14	—	—	4,42 ± 0,07
Brūkle	B	—	—	308,25 ± 0,39	—	29,00 ± 0,10	—	72,67 ± 0,89	—	—	—	4,51 ± 0,11	—	—	—	—	4,14 ± 0,02
	C	—	—	142,68 ± 0,21	—	26,91 ± 0,73	—	1,53 ± 0,15	—	—	—	0,74 ± 0,05	—	—	—	—	1,72 ± 0,01

*- skatīt nodaļā 3.4.1.

3.6. tabula. Optimālajos apstākļos iegūtajos ogu/to spiedpalieku metanola ekstraktos atrodamo antociānu procentuālais sadalījums (savienojuma nosaukumu apzīmējumi sniegti 3.5. tabulā). Zaļi iekrāsotās šūnas apzīmē katrā ekstraktā visaugstākajās koncentrācijās atrastos antociānus. “—” apzīmē savienojumus, kuri netika atrasti. B- ogu spiedpalieku metanola ekstrakts; C-veselu ogu metanola ekstrakts.

Savien.:	Pīķis:	Parastā melle		Krūmmelle		Purva dzērvene		Lielogu dzērvene		Brūkle	
		B	C	B	C	B	C	B	C	B	C
D-gal	1	11,46	14,74	9,85	9,64	—	—	—	—	—	—
D-glc	2	14,08	13,61	1,28	12,63	—	—	—	—	—	—
Cy-gal	3	10,04	13,95	2,22	3,59	23,93	21,88	12,47	31,10	74,38	83,02
D-ara	4	9,49	11,99	8,54	7,98	—	—	—	—	—	—
Cy-glc	5	17,09	13,61	0,89	6,00	1,64	3,02	1,13	—	7,00	15,66
Pt-gal	6					—	—	—	—	—	—
Cy-ara	7	9,40	10,39	1,39	2,44	18,68	17,83	34,70	21,99	17,53	0,89
Pt-glc	8	3,38	3,53	8,55	5,00	—	—	—	—	—	—
Pe-gal	9	0,94	0,86	0,95	0,78	33,45	29,82	22,55	30,51	—	—
Pt-ara	10	2,58	2,32	6,22	2,48	—	—	—	—	—	—
Pe-glc	11	6,82	4,55	0,36	3,99	4,79	10,34	2,48	0,94	1,09	0,43
Mv-gal	12					—	—	—	—	—	—
Pe-ara	13	3,87	2,81	32,06	14,53	17,51	17,11	26,68	15,47	—	—
Mv-glc	14	8,66	6,59	4,11	22,39	—	—	—	—	—	—
Mv-ara	15	2,20	1,05	23,59	8,56	—	—	—	—	—	—

legūto optimālo antociānu ekstraktu UPLC-PDA datu analīze tika veiksmīgi pielietota, lai noskaidrotu ekstraktos esošo antociānu sastāvu dažādās *Vaccinium* ģints ogās. Salīdzinot ogu paraugu veidus, var secināt, ka atkarībā no ekstrakcijā izmantotā parauga veida antociānu sastāvs būtiski nemainās. Dažādu antociānu procentuālais sadalījums veselās ogās un spiedpaliekās ir praktiski vienāds, ar dažiem izņēmumiem, piemēram, krūmmellenē malvidīna glikozīds veselās ogās (22,39%) un spiedpaliekās (4,11%) un cianidīna arabinozīds brūkleņu spiedpaliekās (17,53%) un veselās ogās (0,89%) (3.6. tabula). Parastajās mellenēs atrastie antociāni, cianidīna galaktozīds, cianidīna glikozīds parādās kā galvenie antociāni citu autoru darbos, bet šajā pētījumā atrastie galvenie antociāni, delfinidīna glikozīds un galaktozīds aizņem mazāku daļu no atrastajiem antociāniem (Chandra et al., 2001). Savukārt citu autoru (Ştefănuţ et al., 2011) darbā tāpat kā šajā pētījumā galvenie parasto melleņu antociāni tika identificēti kā delfinidīna glikozīds un cianidīna glikozīds (3.6. tabula). Wu un Prior, (2005) analizētajos krūmmelleņu paraugos atrastais peonidīna arabinozīds atrasts daudz zemākās koncentrācijās, kā šajā pētījumā, bet delfinidīna galaktozīds un glikozīds iezīmējas kā galvenie antociāni. Wu un Prior, (2005) pētījumā tika analizēti antociāni arī dzērveņu paraugos, kur, tāpat kā šajā pētījumā, cianidīna galaktozīds un peonidīna galaktozīds ir galvenie dzērvenēs atrodami antociāni. Šādas koncentrāciju izmaiņas var veidoties atkarībā no izmantotā ogu parauga– konkrētā parauga ievākšanas laiks, vieta, auga

apēnojums, ogu nogatavošanās pakāpe, kā arī ogu kultivārs. Iegūtie antociānu koncentrācijas UPLC dati, tāpat kā optimālo apstākļu validācijas dati parāda, ka ogu spiedpaliekās (purva dzērvenes, krūmmellenes, brūklenes) ir vairāk antociānu salīdzinot ar veselām ogām (3.5. tabula).

3.2. Ogu polifenolu ekstraktu attīršana

Veiktā ekstrakcijas optimizācija ļauj iegūt maksimāli lielus ekstraktvielu iznākumus, ar īpašu uzsvāri uz interesējošajām vielu grupām. Iegūtie *Vaccinium* ģints ogu ekstrakti galvenokārt satur antociānus un citus polifenolus, kas ir vielas ar augstu bioloģisko aktivitāti. Papildus vērtīgajām ekstraktvielām iegūtajos spiedpalieku ekstraktos ir atrodamas arī nevēlamas vielas, kas var apgrūtināt ekstraktu tālāku pārstrādi, izmantošanu, to uzglabāšanu un var ietekmēt fizikālo stāvokli. Ekstraktos esošie cukuri un organiskās skābes apgrūtina pulverveida ekstrakta iegūšanu, to padarot par biezu, viskozu masu, kuras tālāka izmantošana, piemēram, kā funkcionālās pārtikas vai uztura bagātinātāju sastāvdaļu kļūst problemātiska. Lai atbrīvotos no ekstraktā nevēlamām vielu grupām tika izmantota sorbcijas hromatogrāfija, pielietojot Amberlite XAD7-HP sorbentu, kas pateicoties viegli hidrofobai iedarbībai spēj sorbēt polifenolu un antociānu molekulas, tajā pat laikā nesaistot nevēlamās cukuru un organisko skābju molekulas (Chen et al., 2016).

Iegūtie optimālie antociānu ekstrakcijas apstākļi tika izvērtēti praktiskam pielietojumam lielāku ekstrakta tilpumu iegūšanai. Neskatoties uz metanola un TFA augstāko efektivitāti antociānu ekstrakcijā, preparatīvi izmantojamu paraugu iegūšanai tika nolemts izmantot metanolu un skudrskābi (95:5 tilp.%), jo no skudrskābes ir vieglāk atbrīvoties pēc ekstrakcijas, tā ir lētāka un darba drošības ziņā šī skābe ir vienkāršāk izmantojama un tā nenodara kaitējumu izmantotajai aparatūrai. Papildus tika nolemts esošo ogu materiālu (50 g) atkārtoti ekstrahēt ar jaunu ekstrahenta porciju trīs reizes sarkanajām ogām (brūklenes, dzērvenes) un piecas reizes tumšajām ogām (mellenes), lai pilnībā spētu izdalīt ogu spiedpaliekās esošās ekstraktvielas.

Balstoties uz ekstrakcijas shēmu tika veikta ekstraktu attīršana izmantojot XAD7-HP sorbentu (1. pielikums), kura pielietošana ogu polifenolu izdalīšanai ieteikta iepriekš veiktos pētījumos (Silva et al., 2007; Chen et al., 2016). Sagatavotie ekstrakti tika ievadīti kolonnā, skalojot ar ūdeni attīrīti no ogļhidrātiem un eluēti ar paskābinātu etanolu. Eluētais polifenolu koncentrāts tika ietvaicēts vakuumā un tad liofilizēts iegūstot sausu, pulverveida polifenolu koncentrātu. Atkarībā no ogu sugas, iegūtā polifenolu koncentrāta daudzums atšķirās, parasto melleņu (3,21 g koncentrāta/100 g spiedpalieku) un krūmmelleņu (3,33 g koncentrāta/100 g spiedpalieku) ekstrakti dod augstāku koncentrāta iznākumus, nekā brūklenes (2,63 g koncentrāta/100 g spiedpalieku), lielogu dzērvenes (2,44 g koncentrāta/100 g spiedpalieku) un purva dzērvenes (3,05 g koncentrāta/100 g spiedpalieku) (3.7. tabula).

Ņemot vērā optimālo ekstrakcijas apstākļu validācijas rezultātus (3.7. attēls), kas parādīja, ka tumši krāsotajās ogās (mellenēs) ir vairāk antociānu, iegūtie polifenolu koncentrātu iznākumi nav pārsteidzoši, jo tieši antociāni ir galvenā polifenolu grupa šo ogu ekstraktos. Iegūtais purva dzērveņu polifenolu koncentrāts, lai gan mazākā daudzumā, deva samērā augstus iznākumus, visticamāk tas ir skaidrojams ar purva dzērvenēs esošajiem proantociānīdiem (Krueger et al., 2013), vai citām tajās esošām vielām.

3.7. tabula. Iegūstamā polifenolu koncentrāta daudzums no 100 g ogu spiedpalieku izmantojot Amberlite XAD7-HP sorbentu. ± Parāda mērījumu standartnovirzi (n=3).

	Polifenolu koncentrāts, g/100 g spiedpalieku
Lielogu dzērvenes	2,44 ± 0,14
Krūmmellenes	3,33 ± 0,18
Purva dzērvenes	3,05 ± 0,17
Parastās mellenes	3,21 ± 0,18
Brūklenes	2,63 ± 0,15

Izmantojot sorbcijas hromatogrāfiju ir svarīgi noskaidrot izmantotā sorbenta kapacitāti un interesējošo vielu atgūstamību pēc hromatogrāfijas procedūras. Iegūto ekstraktu kopējais polifenolu saturs tika nomērīts pirms hromatogrāfijas un iegūto polifenolu daudzums tika nomērīts pēc hromatogrāfijas procedūras, atgūtais polifenolu daudzums tika izteikts procentuāli (3.8. tabula). Iegūtais rezultāts parāda, ka polifenolu atgūstamība pēc XAD7-HP hromatogrāfijas procedūras ir no 71,23% (krūmmellenes) līdz 78,41% (brūklenes) (3.8. tabula). Vidēji 25% no iegūtajiem polifenoliem izejas ekstraktā hromatogrāfijas procesā tiek zaudēti. Kopējo polifenolu daudzums tiek noteikts izmantojot Folina-Šikoltē metodi, kas pēc sava darbības principa spēj detektēt ne tikai polifenolus, bet arī citus antioksidantus, aminoskābes, vitamīnus, kas hromatogrāfijas procesā tiek aizskaloti, tādējādi samazinot iegūtos atgūstamības rādītājus. Neattīrīts ogu polifenolu ekstrakts satur daudz dažādu ekstraktvielu, tajā skaitā dažādus vitamīnus, organiskās skābes u.c. XAD7-HP sorbenta izmantošana parauga attīrīšanai un sasniegtie vielu atgūstamības rādītāji līdz ar to uzskatāmi par apmierinošiem un ir pamats apgalvot, ka pielietotās metodes paver iespējas iegūt *Vaccinium* ģints ogu polifenolus preparatīvos (> 1g) daudzumos. Minētie ekstrakti iegūstami cietā veidā un tālākā pētījumā tie apzīmēti kā “polifenolu koncentrāts”.

3.8. tabula. Polifenolu atgūstamība pēc XAD7-HP sorbcijas hromatogrāfijas. ± Parāda mērījumu standartnovirzi (n=3).

	Polifenolu atgūstamība,%
Lielogu dzērvenes	73,49 ± 4,05
Krūmmellenes	71,23 ± 3,91
Purva dzērvenes	77,55 ± 4,27
Brūklenes	78,41 ± 4,31
Parastās mellenes	75,21 ± 4,17

3.3. Ogu polifenolu ekstraktu vispārējs raksturojums

Polifenolu koncentrātos, kas tika iegūti no 5 dažādām *Vaccinium* ģints ogām, tika noteikti dažādi rādītāji šo ekstraktu vispārējam raksturojumam.

3.9. tabula. Dažādu ogu polifenolu koncentrātu vispārējie rādītāji. \pm Parāda mērījumu standartnovirzi (n=3).

	Polifenoli, g/100 g polifenolu koncentrāta	Proantocianidīni, g/100 g polifenolu koncentrāta	Antociāni, g/100 g polifenolu koncentrāta
Liellogu dzērvenes	47,85 \pm 2,15	0,43 \pm 0,02	3,13 \pm 0,14
Krūmmellenes	36,45 \pm 1,64	4,62 \pm 0,21	13,26 \pm 0,6
Purva dzērvenes	48,54 \pm 2,18	8,61 \pm 0,39	5,95 \pm 0,27
Parastās mellenes	55,98 \pm 2,52	1,91 \pm 0,09	34,75 \pm 1,56
Brūklenes	52,46 \pm 2,36	2,04 \pm 0,09	1,59 \pm 0,07

Kopējo rādītāju analīzes parāda, ka lielākā polifenolu koncentrācija ir parasto melleņu koncentrātos (55,98 g/100 g koncentrāta), kur 34,75 g/100 g koncentrāta ir antociāni. Purva dzērveņu koncentrātā ir 48,54 g polifenolu /100 g koncentrāta, no kuriem tikai 5,95 g/100 g koncentrāta ir antociāni, savukārt proantocianidīni ir atrodami visaugstākajā koncentrācijā no visiem sagatavotajiem koncentrātiem (8,61 g/100 g ogu) (3.9. tabula). Augstā proantocianidīnu un zemā antociānu koncentrācija izskaidro koncentrātu sagatavošanas iznākumu rezultātus (3.7. tabula). Liellogu dzērveņu koncentrātā tika atrasti maz antociāni (3,13 g/100 g koncentrāta), kā arī maz proantocianidīnu (0,43 g/100 g koncentrāta), kas liecina par citu, nezināmu, vielu klātbūtni (47,85 g polifenolu/100 g koncentrāta) (3.9. tabula). Vismazākais kopējais polifenolu daudzums tika noteikts krūmmellenēs (36,45 g/100 g koncentrāta), kurās, neskatoties uz to, tika atrasta augsta antociānu (13,26 g/100 g koncentrāta) koncentrācija un proantocianidīnu (4,62 g/100 g koncentrāta) koncentrācija (3.9. tabula).

Iegūtie ekstrakta koncentrāti satur augstas polifenolu (36,45–55,98 g/100 g koncentrāta) kā arī antociānu koncentrācijas (3.9. tabula). Polifenoli ir plaši pazīstami kā spēcīgi antioksidanti un ņemot vērā sagatavotu ekstraktu augsto polifenolu koncentrāciju, šo ekstraktu spēja inhibēt brīvos radikāļus tika noteikta izmantojot trīs dažādas antiradikālās aktivitātes noteikšanas metodes. Izmantotās antiradikālās aktivitātes noteikšanas metodes pēc sava darbības principa ir dažādas. ABTS un DPPH metodes balstās uz sintētiska radikāļa oksidēšanu, kur ABTS radikālis tiek veidots eksperimenta gaitā, savukārt DPPH ir stabils radikālis. FRAP no šīm metodēm atšķiras ar to, ka reakcijas gaitā tiek mērīta antioksidanta spēja reducēt Fe(III) par Fe(II). Katrā metodē iegūtie rezultāti tika izteikti kā mM reducētā Trolox/1g koncentrāta. Par cik ar dažādām metodēm iegūtos rezultātus nevar tieši salīdzināt, tika veikti eksperimenti izmantojot standarta antioksidantu, C vitamīnu. FRAP metode uzrāda, ka visos polifenolu koncentrātos

antioksidatīvās īpašības ir labākas, kā C vitamīna kontroles paraugā. Līdzīgi arī ABTS un DPPH metodes uzrāda augstāku antioksidatīvo aktivitāti polifenolu koncentrātos, kā kontroles paraugā (3.10. tabula). Krūmmelleņu koncentrāts, kurā tika atrasti vismazāk kopējo polifenolu (3.9. tabula), izmantojot ABTS un DPPH metodi tika atrasta zemāka antioksidatīvā aktivitāte kā kontroles paraugā (3.10. tabula). Salīdzinot dažādas antiradikālās aktivitātes noteikšanas metodes, ir novērojama korelācija ($r=0,8434-0,9301$). FRAP, DPPH un ABTS metodes uzrāda parasto melleņu, brūkleņu un purva dzērveņu koncentrātus kā visefektīvākos brīvo radikāļu inhibitorus (3.10. tabula). Šie rezultāti arī korelējas ar kopējo polifenolu daudzumu (piemēram, ABTS $r=0,9927$, $p=0,0003$), kas augstākajā koncentrācijā tika noteikts tieši augstāk minētajos ekstraktu koncentrātos (3.9. tabula).

*3.10. tabula. Ogu polifenolu koncentrātu antioksidatīvās aktivitātes noteikšana izmantojot FRAP, ABTS un DPPH metodes. ± Parāda mērījumu standartnovirzi (n=3). * apzīmē statistiski būtiskas atšķirības starp katras metodes kontroles parauga un polifenolu koncentrāta mērījumiem. Zaļa krāsa apzīmē visaugstāko vērtību, dzeltena 2. augstākā, oranža 3. augstākā.*

	FRAP	ABTS	DPPH
	mM Trolox eq/1 g polifenolu koncentrāta		
Liellogu dzērvenes	27,0* ± 1,2	51,2* ± 2,2	15,5* ± 0,8
Krūmmellenes	24,4 ± 1,1	35,6 ± 1,4	11,8 ± 0,6
Purva dzērvenes	28,8* ± 1,3	53,7* ± 2,1	16,8* ± 0,7
Parastās mellenes	43,7* ± 2,1	65,8* ± 2,6	19,2* ± 0,9
Brūklenes	31,1* ± 1,4	58,5* ± 2,3	21,5* ± 1,1
Kontrole: C vitamīns	20,2 ± 0,9	38,1 ± 1,5	13,9 ± 0,7

Apskatot iegūtos attīrītā ekstrakta kopējos rādītājus parastā melleņu iezīmējas kā visvērtīgākais ekstrakts– tam ir augsta antiradikālā aktivitāte, kā arī liels antociānu un polifenolu saturs. Krūmmellenes, kurās tika noteikts vismazākais kopējo polifenolu daudzums, uzrādīja arī viszemāko antiradikālo aktivitāti. Krūmmellenes un liellogu dzērvenes kopējo polifenolu un antiradikālās aktivitātes rādītājos ir saraksta apakšgalā (3.9., 3.10. tabula), kas iespējams skaidrojams ar šo ogu izcelsmi. Abas ogas ir kultivētas un selekcionētas, lai iegūtu pēc iespējas lielāku ražu, pēc iespējas mazākā laikā, kas samazina šo ogu bioloģisko vērtību. Polifenoli ir ogu sekundārie metabolīti, kas nodrošina ogu rezistenci pret kaitēkļiem, brīvā dabā augušām ogām šie savienojumi ir nozīmīgāki (Landi et al., 2015).

3.4. Ogu polifenolu ekstraktu sastāva izpēte

3.4.1. Antociānu sastāva izpēte

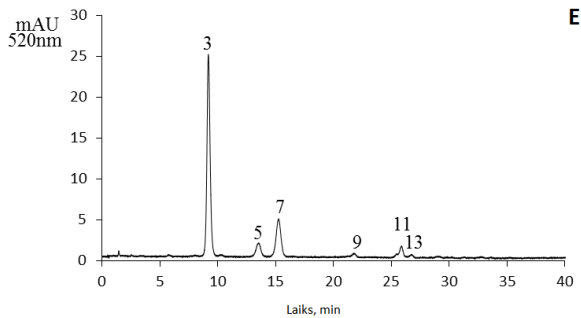
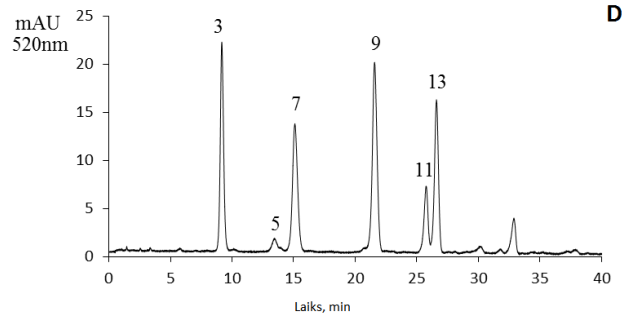
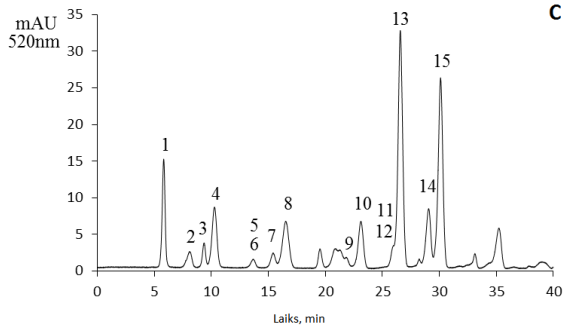
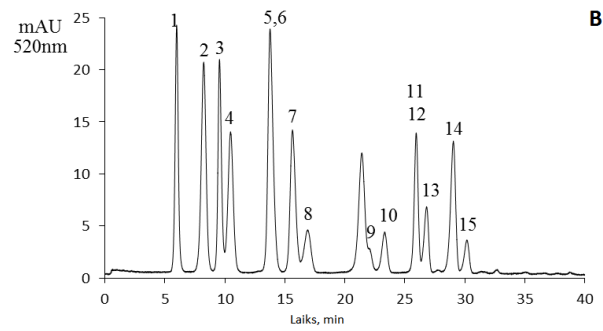
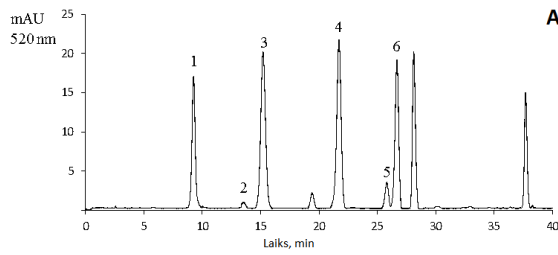
Iegūtie ogu polifenolu koncentrāti tika analizēt izmantojot UPLC-PDA, lai noskaidrotu kā mainās ogās esošo antociānu sastāvs pēc ekstraktu attīrīšanas procedūras.

Antociānu sastāvs ogu polifenolu koncentrātos ir līdzīgs kā optimizācijā iegūto ogu spiedpalieku optimālo ekstraktu sastāvs. Galvenie antociāni polifenolu koncentrātā ir delfinidīna galaktozīds, delfinidīna glikozīds un cianidīna glikozīds. Krümmellenēs galvenie antociāni ir delfinidīna galaktozīds, peonidīna arabinozīds, malvidīna arabinozīds. Sarkanajās ogās galvenie antociāni ir cianidīna arabinozīds, cianidīna galaktozīds un peonidīna galaktozīds (3.11. tabula).

Polifenolu koncentrātu antociānu analīzes parāda, ka antociānu sastāvs nemainās pēc ekstraktu attīrīšanas. Koncentrētajā ekstraktā parādās savienojumi, kas netika detektēti optimālajos apstākļos iegūtajos ekstraktos (3.5. tabula). Šo savienojumu sorbcija ir 520nm (3.11. tabulā apzīmēti ar "nezināms"), kas liek domāt, ka šie nezināmie savienojumi arī ir antociāni. Veicot literatūras analīzi netika atrasta informācija par šo savienojumu struktūru. Optimālajos apstākļos iegūtajos ekstraktos šie savienojumi neparādās, jo to koncentrācija ir zem detektēšanas sliekšņa, savukārt polifenolu koncentrātā, pēc hromatogrāfiskās attīrīšanas tie parādās detektējamā koncentrācijā. Ar UPLC identificēti savienojumi tika kvantificēti un salīdzinot kopējo kvantificēto antociānu saturu (3.11. tabula) ar spektrofotometriskās analīzes kvantificēšanas datiem (3.9. tabula), neuzrādījās statistiski būtiskas atšķirības, kas nozīme, ka abas izmantotās metodes dod līdzīgus rezultātus (p vērtība 0,1045). Izmantotā hromatogrāfijas metode spēj nodrošināt nepieciešamo vielu sadalījumu un simetrisku pīķu formu, lai varētu veikt vielu kvantificēšanu (3.8. attēls). UPLC-PDA izmantošana šāda veida ekstraktvielu analīzei ir ierobežota, jo ir nepieciešamas dārgas standartvielas. Antociānu molekulu ļoti tuvā līdzība apgrūtina šāda veida analīžu veikšanu. Redzamajā un UV gaismā esošie antociānu sorbcijas maksimumi ir ļoti līdzīgi, tādēļ nav iespējams noteikt specifiskus antociānu sorbcijas viļņa garumus to identifikācijai (3.11. tabula). Lai noteiktu nezināmos savienojumus ir nepieciešams preparatīvi izdalīt nezināmo vielu, iegūt tās masspektrus un kodolmagnētiskās rezonanses spektrus, vai arī hidrolizēt ekstraktvielu paraugu un veikt aglikonu kvantificēšanu (3.8. attēls, 3.11. tabula).

3.11. tabula. Ogu polifenolu koncentrātu antociānu sastāva noteikšana un kvantificēšana. Koncentrācija – mg/g polifenolu koncentrāta. ± Parāda mērījumu standartnovirzi (n=5).. “—” apzīmē savienojumus, kuri netika detektēti. RT, min apzīmē savienojuma hromatogrāfiskās izdalīšanās laiku. Zaļi iekrāsotās šūnas apzīmē katrā ekstraktā visaugstākajās koncentrācijās atrastos antociānus.

Piķa nr.	Savienojuma nosaukums	RT, min	λ_{\max} , nm	Daudzums (mg/g polifenolu koncentrāta) ^a				
				Parastā melle	Krūmmelle	Purva dzērvene	Lielogu dzērvene	Brūklene
1	Delfinidīn-3-O-galaktozīds	5,79	257,78; 345,69; 519,81	31,41 ± 3,06	7,62 ± 0,64	—	—	—
2	Delfinidīn-3-O-glikozīds	8,01	274,59; 345,69; 519,81	39,70 ± 3,22	1,83 ± 0,17	—	—	—
3	Cianidīn-3-O-galaktozīds	9,23	278,15; 328,23; 512,50	26,50 ± 2,28	1,56 ± 0,13	9,81 ± 0,96	1,73 ± 0,17	19,30 ± 1,89
4	Delfinidīn-3-O-arabinozīds	10,19	275,78; 345,69; 522,24	26,27 ± 2,55	6,47 ± 0,53	—	—	—
5	Cianidīn-3-O-glikozīds	13,37	278,20; 329,88; 513,70	49,18 ± 4,21	0,86 ± 0,81	0,71 ± 0,06	0,06 ± 0,01	1,65 ± 0,15
6	Petunidīn-3-O-galaktozīds	13,37	275,45; 345,65; 525,60			—	—	—
7	Cianidīn-3-O-arabinozīds	15,19	278,15; 513,72	28,70 ± 2,34	1,15 ± 0,09	9,14 ± 0,89	3,07 ± 0,31	5,44 ± 0,45
8	Petunidīn-3-O-glikozīds	16,55	275,78; 345,69; 519,81	8,95 ± 0,71	6,50 ± 0,60	—	—	—
	nezināms	19,52	272,21; 334,50; 527,01	—	1,42 ± 0,13	—	—	—
	nezināms	21,18	274,9; 345,69; 519,81	29,55 ± 2,63	0,24 ± 0,02	—	—	—
9	Peonidīn-3-O-galaktozīds	21,64	278,15; 512,50	2,73 ± 0,28	0,24 ± 0,02	12,41 ± 1,21	3,04 ± 0,21	0,33 ± 0,04
10	Petunidīn-3-O-arabinozīds	23,12	277,00; 348,00; 525,90	8,55 ± 0,76	5,54 ± 0,44	—	—	—
11	Peonidīn-3-O-glikozīds	25,81	278,15; 361,22; 514,93	20,44 ± 1,91	1,58 ± 0,29	3,28 ± 0,30	0,36 ± 0,04	0,86 ± 0,07
12	Malvidīn-3-O-galaktozīds	25,81	275,45; 345,68; 524,45			—	—	—
13	Peonidīn-3-O-arabinozīds	26,71	277,00; 348,00; 525,90	9,93 ± 0,86	25,82 ± 2,45	8,18 ± 0,70	2,31 ± 0,23	0,31 ± 0,03
14	Malvidīn-3-O-glikozīds	29,02	275,78; 345,68; 524,68	26,20 ± 2,38	5,34 ± 0,49	—	—	—
15	Malvidīn-3-O-arabinozīds	30,15	275,78; 345,69; 527,10	6,39 ± 0,62	19,61 ± 1,14	—	—	—
	nezināms	32,74	279,34; 522,24	1,90 ± 0,10	0,79 ± 0,06	2,19 ± 0,19	—	—
	nezināms	35,29		0,66 ± 0,08	4,24 ± 0,38	—	—	—
Kopā, g/100 g polifenolu koncentrāta				31,71	9,08	4,57	1,06	2,79



3.8. attēls. Ogu polifenolu koncentrāta hromatogrammas pie 520nm. Cipari virs pīkiem parāda identificētos antociānus (3.5., 3.6., 3.11. tabula). A- lielogu dzērvene, B- parastā mellene, C- krūmmellene, D- purva dzērvene, E- brūklene.

3.4.2. Ogu ekstraktvielās esošo polifenolu sastāva izpēte

Analizējot pētīto ogu ekstraktu sastāvu tika definēts, ka galvenā interesējošā polifenolu grupa ir antociāni, tomēr jāatzīmē, ka iegūtajos ekstraktos ir atrodama liela polifenolu daudzveidība. Izmantojot augstas izšķirtspējas masas spektrometriju (HRMS) tika veikta polifenolu koncentrātu analīze, lai noskaidrotu polifenolu sastāvu un ekstraktos esošo vielu koncentrācijas. Veicot Orbitrap-MS analīzi tika identificēti un kvantificēti 24 dažādi savienojumi (3.12. tabula). Kvantificēšanai tika izmantota ārējā kalibrācija.

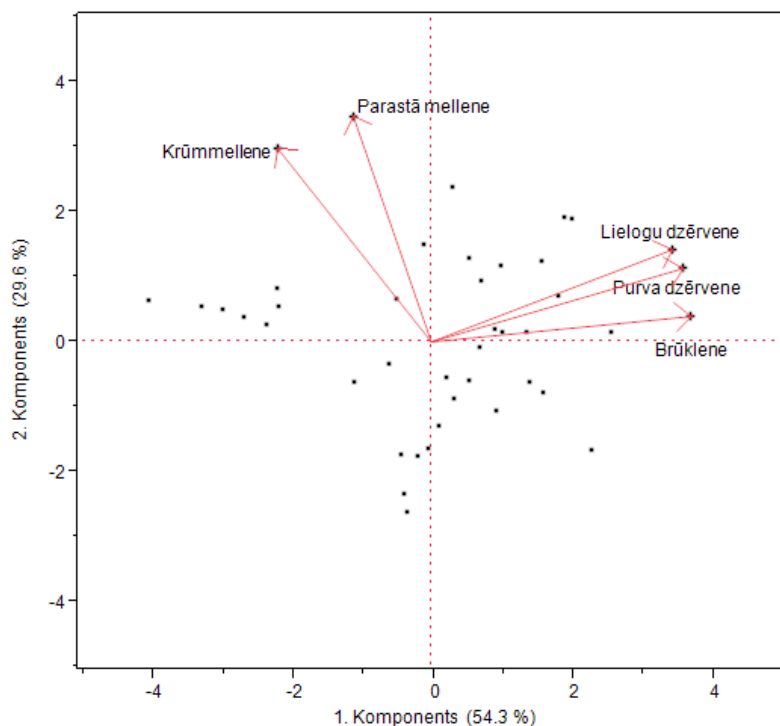
3.12. tabula. Polifenolu koncentrātos identificētie savienojumi un to daudzums ($\mu\text{g/g}$) polifenolu koncentrātā. Kvantificēšanas kļūdas intervāls līdz 5%. ND – vielas koncentrācija mazāka par detekcijas limitu ($5 \mu\text{g}$).

	Savienojums	Mol.form.	[M-H] ⁻ ; + ^a	Atrastā masa	Kļūda, ppm	Brūklenes	Purva dzērvenes	Lielogu dzērvenes	Meža mellenes	Krūmmellenes
16	4-hidroksibenzoskābe ^c	C ₇ H ₆ O ₃	137,0244	137,0239	3,7876	556	116	95	80	76
17	Protokatehīnskābe ^b	C ₇ H ₆ O ₄	153,0193	153,0189	2,8362	2287	1151	374	3376	2967
18	p-kumarīnskābe ^c	C ₉ H ₈ O ₃	163,0401	163,0403	-1,1715	1374	313	272	182	26
19	Galluskābe ^c	C ₇ H ₆ O ₅	169,0142	169,0143	-0,3017	23	33	105	585	770
20	Kafijskābe ^c	C ₉ H ₈ O ₄	179,0350	179,0347	1,5863	747	352	103	293	240
21	Ferulskābe ^c	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,0506	193,0508	-1,0671	2352	303	33	105	454
22	Ceriņskābe ^c	C ₉ H ₁₀ O ₅	197,0455	197,0448	3,8012	21	30	23	193	1534
23	Resveratrols ^c	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227,0714	227,0724	-4,5404	ND	31	73	38	50
24	Naringenīns ^b	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271,0612	271,0624	-4,4307	73	27	14	10	16
25	Kampferols ^b	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0405	285,0415	-3,6346	90	76	34	11	66
26	Cianidīns ^b	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁺	287,0550 ^a	287,0540	3,5409	ND	94	ND	ND	13
27	(+)-Katehīns ^c	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0718	289,0718	0,0484	14038	4368	123	53	ND
28	(-)-Epikatehīns ^c	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0718	289,0718	-0,0553	3980	1632	242	1092	ND
29	Elagīnskābe ^c	C ₁₄ H ₆ O ₈	300,9990	300,9985	1,6412	884	345	235	207	169
30	Kvercetīns ^c	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,0354	301,0353	0,1296	559	893	1208	184	977
31	Delfinidīns ^b	C ₁₅ H ₁₁ O ₇ ⁺	303,0499 ^a	303,0487	4,0634	1382	3408	170	1079	574
32	Taksifolīns ^b	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303,0510	303,0513	-0,8942	1758	2285	5608	6184	1500
33	Miricetīns ^c	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317,0303	317,0302	0,2965	2448	2641	815	3889	3388
34	Malvidīns ^b	C ₁₇ H ₁₅ O ₇ ⁺	331,0812 ^a	331,0803	2,8133	79	124	323	229	10186
35	Hlorogēnskābe ^c	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	351,1238	351,1242	-1,1420	902	10833	166	2269	145
36	Kvercetīna-3-glikozīds ^b	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	353,0878	353,0876	0,5919	1020	4382	216	913	528
37	Procianidīns A2 ^b	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	575,1195	575,1200	-0,8624	22414	1893	5474	301	101
38	Procianidīns B2 ^b	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577,1352	577,1352	-0,0797	5638	2898	48	3163	ND
39	Rutīns ^b	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461	609,1466	-0,7978	451	368	ND	ND	286

^a – savienojuma masa pozitīvajā jonu plūsmā. ^b – *Extrasynthese*; ^c – *Sigma Aldrich*.

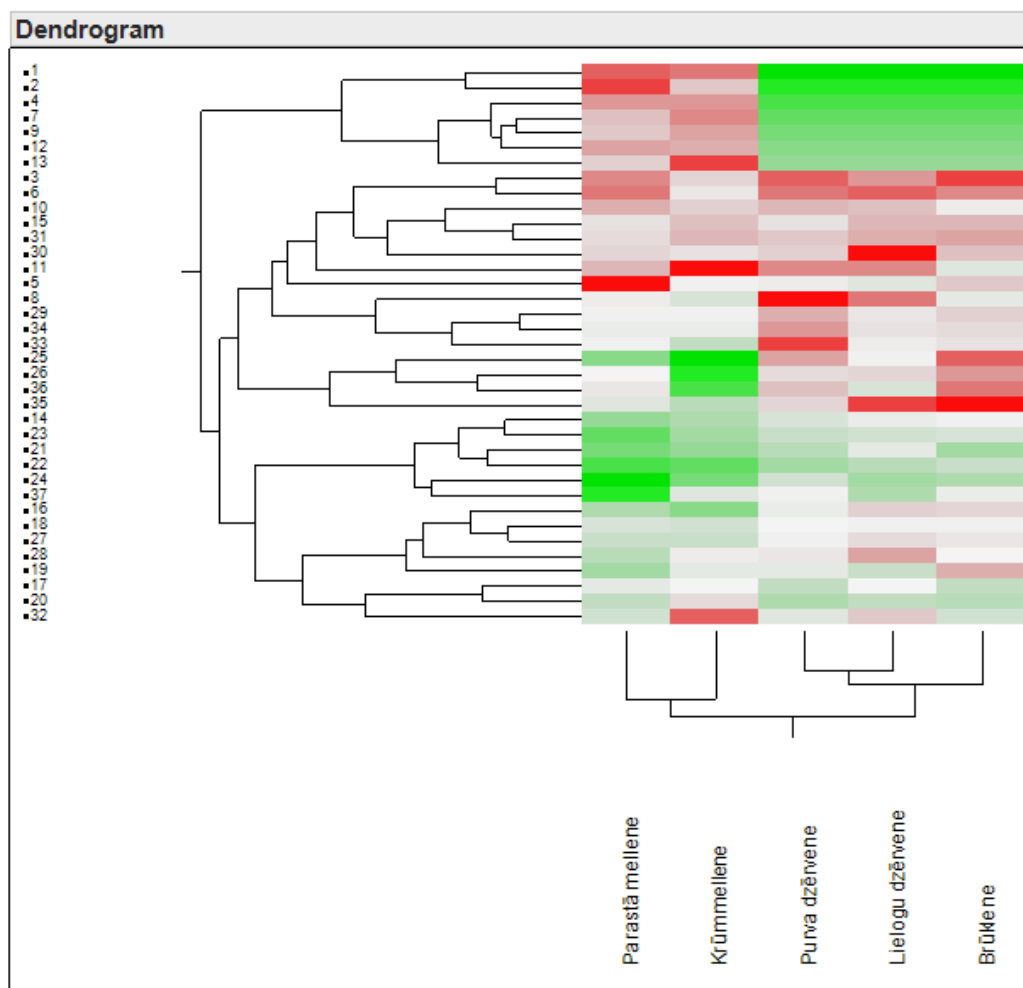
Identificētie savienojumi tika kvantificēti izmantojot standartvielas. Iegūtā savienojuma masa tika salīdzināta ar aprēķināto, kas ļauj pārliecināties par nekļūdīgu savienojuma identifikāciju (kļūda, ppm < 10) (3.12. tabula). Kvantifikācijas dati parāda lielu polifenolu daudzveidību, bet nosakāmo savienojumu skaitu iespējams palielināt, izmantojot citas standartvielas. Brūkleņu ekstraktā tika atrasta augsta procianidīna A2 koncentrācija, kā arī šī savienojuma prekursors– katehīns. Purva dzērvēnēs tika atrasta augsta hlorogēnskābes koncentrācija (3.12. tabula). Izmantojot Orbitrap-MS ir iespējams iegūt kvantificēšanas datus lielā koncentrācijas diapazonā ar augstu jutību, kas ir šīs metodes priekšrocība, bet kvantificēšanu var veikt tikai savienojumiem, kam pieejams standarts, kas padara jaunu ekstraktvielu identificēšanu apgrūtinātu.

Apvienojot normalizētus UPLC-PDA un Orbitrap-MS kvantificēšanas datus, tika veikta principiālo komponentu analīze (PCA) (3.9. attēls). Iegūtie PCA rezultāti parāda atšķirības starp pētītajiem ogu ekstraktiem: abi iegūtie komponenti spēj izskaidrot 83,9% no iegūto datu variabilitātes (3.9. attēls). Krūmmellenes un parastās mellenes pēc tajās atrodamajiem savienojumiem tika grupētas vienā kvadrantā, turpretim lielogu dzērvēnes, purva dzērvēnes un brūklenes grupējās blakus kvadrantā. Kā tika novērots arī citos eksperimentos, tumšās ogas (mellenes) un sarkanās ogas (dzērvēnes, brūklenes) savā starpā parāda būtiskas atšķirības. Šādu iedalījumu nodrošina ogās esošie antociāni, kā arī citi polifenoli.



3.9. attēls. Hromatogrāfiski kvantificēto ogu ekstraktvielu principiālo komponentu analīzes (PCA) rezultāti.

Papildinot PCA analīzi tika veikta hierarhiskā klāsteranalīze atbilstoši Varda metodei (*Ward's method*). Datu vizualizācijas nolūkos tika izveidots dubults klāsteris, kas parāda savienojumu (1 līdz 37) grupēšanos atkarībā no ogas (3.11., 3.12. tabula). Līdzīgi kā PCA analīzē var vizuāli novērot divu ogu grupu veidošanos, tumšās un sarkanās ogas (3.10. attēls). "Siltuma karte" (*heat map*) parāda savienojumus, kas ir augstākās koncentrācijās (sarkans) un savienojumus, kas ir zemās koncentrācijās (zaļš), kas līdz ar to ļauj secināt par katra konkrētā savienojuma ieguldījumu ogu sadalījuma izveidē. Interesanti ir novērot, ka klāsteri, kas veidojas no ogās esošajiem savienojumiem, sadalās vielu grupās– antociāni veido kopēju klasteri (savienojumi nr. 1, 2, 4, 7, 9, 12, 13, kas ir delfinidīnu, malvidīnu un petunidīnu saturoši antociāni), cianidīnu un peonidīnu saturoši antociāni (savienojumi nr. 3, 5, 6, 10, 11), proantociānīdi un to prekursori (savienojumi nr. 25, 26, 35, 36), fenolskābes (savienojumi nr. 16-20). Tādējādi var secināt, ka atšķirības starp dažādām ogām veido atšķirības vielu grupu sadalījumā, respektīvi to sekundāro metabolītu spektrs (3.10. attēls).



3.10. attēls. Klāsteranalīze grupējot kvantificētos savienojumus analizētajos ogu ekstraktos. Savienojumi 1 līdz 37 atrodami 3.11. un 3.12. tabulā.

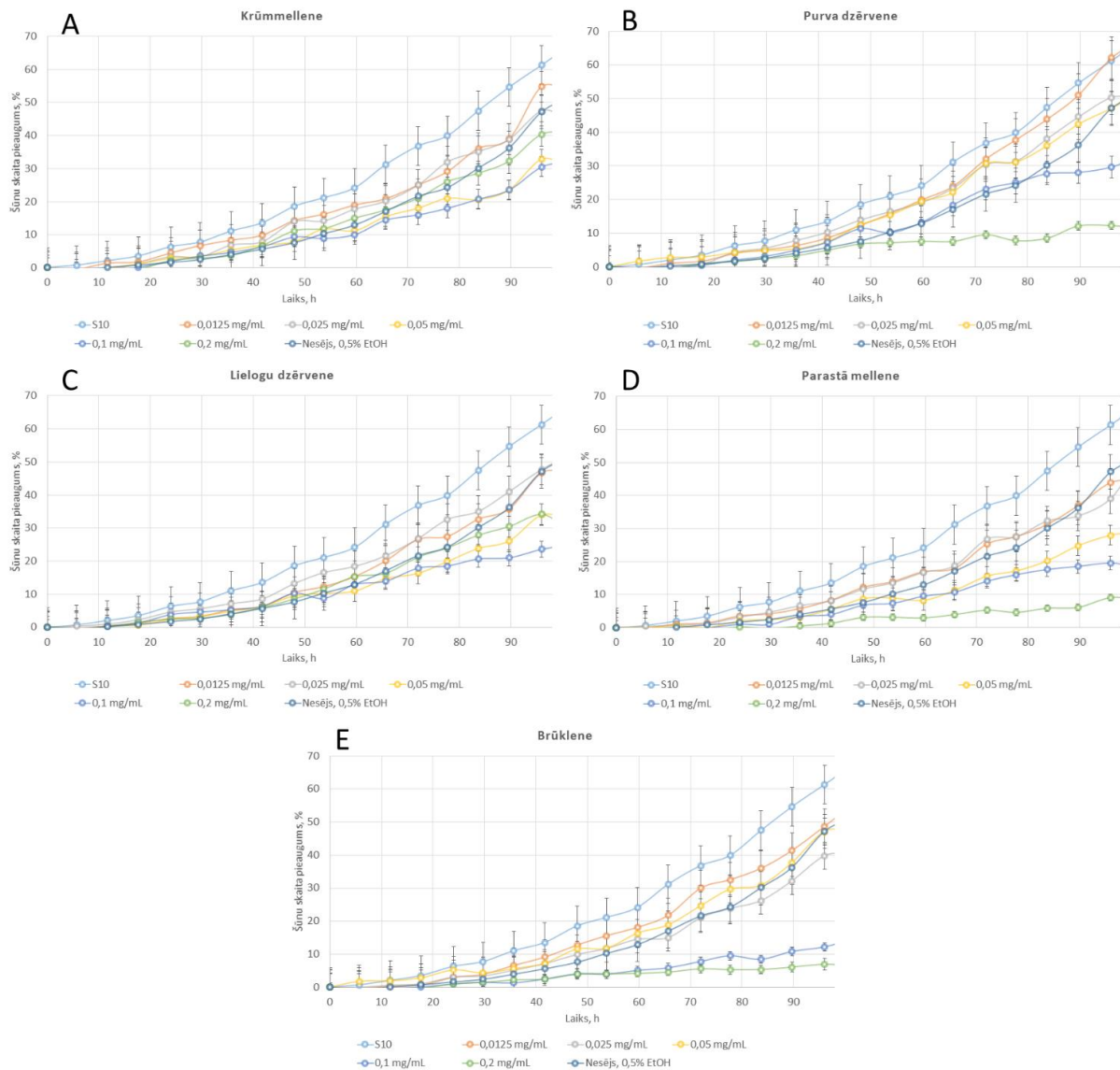
Lietotās metodes individuālu savienojumu identificēšanai un kvantificēšanai tika veiksmīgi pielāgotas ogu paraugu analīzei. Iegūtie rezultāti parāda atšķirības starp ogu sugām un tajās esošo polifenolu un antociānu sastāvu, kā arī koncentrāciju. Veiktā PCA un klāsteranalīze dod ieskatu iegūto datu iespējamai izmantošanai hemotaksonomijā. Izmantojot un paplašinot izveidotās metodes būtu iespējams veikt hemotaksonomisku analīzi dažādu vienas sugas kultivāru ogām, lai novērotu atšķirības starp konkrēto kultivāru metabolītiem, kā arī veikt ogu metabolisma izpēti.

3.5. Ogu polifenolu ekstraktu bioloģiskās aktivitātes izpēte

3.5.1. Ogu ekstraktu ietekme uz epitēlijšūnām

Polifenolu koncentrātu ietekme uz dermas fibroblastu šūnu proliferāciju

Attīrīto ogu polifenolu koncentrātu ietekme uz dermas fibroblastiem tika novērtēta mērot šūnu konfluenci ekstraktu klātbūtnē. 3.11. attēlā ir redzamas iegūtās šūnu proliferācijas līknes. Brūkleņu (3.11. attēls E), parasto melleņu (3.11. attēls D), krūmmelleņu (3.11. attēls A), lielogu dzērveņu (3.11. attēls C) un purva dzērveņu (3.11. attēls B) polifenolu koncentrāts, ja lietots augstākās koncentrācijās, kavē šūnu proliferāciju (sākot no koncentrāciju līmeņa 0,1 un 0,2 mg/mL) ļaujot sasniegt 10–30% šūnu skaita pieaugumu (3.11. attēls). Visos apskatītajos ekstraktos šūnu proliferācija tiek kavēta, salīdzinot ar S10 barotni, kam netika pievienots ekstrakts. Izmantotais parauga šķīdinātājs (0,5% etanols) negatīvi ietekmē šūnu proliferāciju, kas neļauj pilnībā novērtēt ekstraktu iedarbību uz šūnām zemākās ekstrakta koncentrācijās.



3.11. attēls. Ogu polifenolu koncentrātu iedarbība uz dermas fibroblastu šūnu proliferāciju. Kontrolei izmantota S10 barotne bez pievienota ekstrakta vai šķīdinātāja. Kļūdas intervāls atspoguļo mērījumu standartnovirzi.. Visi izmantotie ekstrakti tika sagatavoti koncentrācijā 20 mg/mL un atšķaidīti līdz nepieciešamajai koncentrācijai S10 barotnē.

iegūto ekstraktu spēja saistīt brīvos radikāļus *in vitro*

Lai novērtētu polifenolu koncentrātu antioksidatīvo aktivitāti, tika veikti *in vitro* šūnu citometrijas testi, kuros tika novērota ekstraktu spēja saistīt brīvos radikāļus dermas fibroblastos. C–vitamīns tika izmantots kā kontroles antioksidants (0,05 mg/mL), un 0,5% etanols tika izmantots kā kontroles paraugs, lai izslēgtu šķīdinātāja iedarbības efektu. Iegūtās ekstraktu vidējās fluorescences vērtības (MFI) tika salīdzinātas ar antioksidanta MFI vērtību (3.13. tabula). Polifenolu koncentrāti tika pievienoti šūnām, tā, lai gala koncentrācija S10 barotnē būtu 0,05 un 0,025 mg/mL. Ogu polifenolu koncentrātu

antioksidatīvās īpašības koncentrācijā 0,05 mg/mL tika novērtētas kā labas un ļoti labas, izmantojot “siltuma karti” (*heat map*) datu reprezentācijai (sarkans–dzeltens–zaļš) (3.13. tabula). Zemākajā koncentrācijā, 0,025 mg/mL, ļoti labas antioksidatīvās īpašības uzrādīja lielogu dzērveņu ekstrakts, labas antioksidatīvās īpašības uzrādīja krūmmelleņu ekstrakts, savukārt brūklenes un purva dzērvenes uzrādīja ar kontroles antioksidantu līdzīgas antioksidatīvās īpašības. Antioksidatīvo īpašību atšķirības starp dažādās koncentrācijās lietotajiem ekstraktiem parāda, ka ekstrakta iedarbība ir atkarīga no izmantotās koncentrācijas un tās izmaiņas var būtiski mainīt iedarbību uz šūnām (3.13. tabula).

3.13. tabula. Polifenolu koncentrātu *in vitro* antioksidatīvo īpašību noteikšana izmantojot šūnu citometriju. * parāda būtiski atšķirīgu rezultātu salīdzinot ar standarta antioksidantu – C-vitamīnu (*t*-test, $p < 0,05$).

Paraugs	Dispersijas koef.	Novērojumi ^a	MFI vērtība ^b	Antioksidatīvās īpašības ^c
Nesējs	66,74	4542	590,87*	sliktas
C-vitamīns (antioksidants)	52,84	7045	403,15	Antioksidanta līmenis
Krūmmellene 0,05 mg/mL	58,54	8384	207,21*	ļoti labas
Parastā melleņu 0,05 mg/mL	62,61	5466	203,51*	ļoti labas
Purva dzērvene 0,05 mg/mL	55,38	3376	283,87*	labas
Lielogu dzērvene 0,05 mg/mL	57,04	3010	159,63*	ļoti labas
Brūklenes 0,05 mg/mL	58,67	2871	296,93*	labas
Krūmmellene 0,025 mg/mL	58,6	5956	264,16*	labas
Parastā melleņu 0,025 mg/mL	59,47	5824	482,61*	sliktas
Purva dzērvene 0,025 mg/mL	54,55	4782	392,42	Antioksidanta līmenis
Lielogu dzērvene 0,025 mg/mL	56,69	5118	230,82*	ļoti labas
Brūklenes 0,025 mg/mL	54,12	1072	410,47	Antioksidanta līmenis

^a – eksperimentā novēroto šūnu skaits. ^b – vidējā fluorescences vērtība. ^c – noteikts izmantojot “siltuma karti”.

Daudzi neatkarīgi pētījumi ir parādījuši korelāciju starp svaigu augļu un dārzeņu patēriņu, lai novērstu, aizkavētu vai samazinātu hronisku, deģeneratīvu slimību attīstību, tai skaitā vēža attīstību (Bickford et al., 2000; Juranic and Zizak, 2005). Svaigi augļi ir bagātīgi barības vielu avoti, to saturā ir vitamīni, antioksidanti, mikro– un makroelementi, šķiedrvielas, kā arī spēcīgi hemoprotektanti– polifenoli. Šīm daudzveidīgajām augu izcelsmes molekulām piemīt spējas darboties kā antioksidantiem, antibakteriāliem un antivīrusu aģentiem. Pētījumos ir pierādīts melleņu, krūmmelleņu un dzērveņu ekstraktu spēcīgais antioksidatīvais potenciāls, kas, salīdzinot ar C, E vitamīniem un β-karotīnu, ir daudz augstāks (Bagchi et al., 2000). Ogās atrodamie antociāni atšķirībā no citiem antioksidantiem ir unikālas molekulas, ko nosaka to spējas savā struktūrā delokalizēt elektronus un veidot dažādas struktūras atkarībā no pH (Amouretti, 1972; Bettini et al., 1985).

Šajā pētījumā tika veikti eksperimenti izmantojot dermas fibroblastu šūnas un tika novērtēta iegūto ekstraktu ietekme uz šo šūnu proliferāciju un *in vitro* antioksidatīvās īpašības. Veiktā literatūras analīze parāda, ka izmantojot citu ogu/augļu polifenolu

ekstraktus ir iespējams novērtēt ietekmi uz cita veida šūnām un vēža šūnu līnijām. Endoteliālā disfunkcija ir svarīgs faktors vaskulāro slimību ierosināšanā, un ir pierādīts, ka antociāni uzlabo endoteliālo funkciju (Youdim et al., 2000a). Plūškoka ogu antociāni tika izmantoti, lai pētītu endotēlija šūnu reakciju uz šo ogu ekstraktiem un tika parādīta aizsargājoša iedarbība pret dažādiem oksidatīvā stresa izraisītājiem. Vaskulārās endotēlija šūnas spēj inkorporēt antociānus membrānā un citosolā, padarot tās izturīgākas pret oksidatīvo stresu un tādējādi samazinot vaskulāro slimību riskus (Youdim et al., 2000a). Melleņu polifenolu iekļaušana uzturā nodrošina būtisku aizsardzību pret brīvajiem radikāļiem un oksidatīvo stresu eritrocītos (*in vivo*) (Youdim et al., 2000b). VEGF, kas ir angiogēneses biomarkieris, spēlē būtisku lomu audzēju apasiņošanā (Nguyen, 1997). Pētījumos, izmantojot mellenes, krūmmellenes, dzērvenes u.c., tika aplūkota šo ekstraktu spēja inducēt VEGF HaCaT keratinocītos. Tika parādīta būtiska VEGF ekspresijas inhibīcija, ko inducē H₂O₂ un TNFα (Bagchi et al., 2004). Eksperimentos, kur kā modelis tika izmantoti grauzēji ir parādīta parasto melleņu spēja uzlabot atmiņu, redzi un citas maņas (Saija et al., 1990; Cignarella et al., 1996)

Krūmmelleņu, parasto melleņu, brūkleņu, dzērveņu un citu ogu ekstrakti uzrāda potenciālas hemopreventīvas īpašības (Bomser et al., 1996; Xue et al., 2001; Seeram et al., 2006; Chen et al., 2007). Antociāni un elagīnskābe, kas augstās koncentrācijās ir sastopami arī šajā pētījumā izgatavotajos ekstraktos (3.11., 3.12. tabula), ir identificēti kā savienojumi ar pretvēža aktivitātēm. Avenu ekstrakti uzrāda antiproliferatīvu efektu aknu vēža šūnās (Liu et al., 2002). Liofilizētas avenas tika izmantotas, lai novērtētu to iedarbību uz audzējiem grauzējos un tika atklāts, ka radušos audzēju daudzums un kopējais audzēju izmērs ir krietni mazāks žurkās, kas saņēmušas lielu devu liofilizēto avenu (Harris et al., 2001).

Apkopotā informācija par dažādu ogu polifenolu iedarbību uz šūnām *in vitro* un *in vivo* ļauj apgalvot, ka ogu ekstrakti ir vērtīgs produkts ar daudzām iespējamām bioloģiskām aktivitātēm un veselību uzlabojošām īpašībām. Iegūtie rezultāti izmantojot dermas fibroblastu šūnas demonstrē antiproliferatīvu aktivitāti, kas iezīmē šo ekstraktu iespējamo izmantošanu pretvēža medikamentos vai kā papildinājumu vēža terapijā (3.11. tabula). Šādu pieņēmumu atbalsta arī vairāki pētījumi, kur vairākas no šeit pētītajām ogām ir izmantotas, lai novērtētu šo ogu ekstraktu ietekmi uz dažādām vēža šūnu līnijām, piemēram, cilvēka mutes dobuma, krūts vēža, prostatas un resnās zarnas vēža šūnu līnijām (Seeram et al., 2006). Neskatoties uz to, ka daudzos pētījumos ir novērota ogu ekstrakti iedarbība un spējas inhibēt vēža šūnas, tiešs iedarbības mehānisms tiek apskatīts tikai dažos no pētījumiem, kas paver iespēju turpināt eksperimentus un veikt padziļinātu izpēti šajā jomā. Iegūtie šūnu citometrijas rezultāti parādīja augstu antioksidatīvo aktivitāti *in vitro*, kas apstiprina šo ekstraktu bioloģisko vērtību un spēju efektīvi samazināt oksidatīvo stresu šūnās (3.13. tabula). Citos pētījumos ne vienmēr tiek veikta padziļināta ķīmiskā analīze (bieži tikai kopējo rādītāju noteikšana), kas neļauj salīdzināt dažādu ogu ekstraktu sastāvu un tādējādi neļaujot secināt par konkrētām

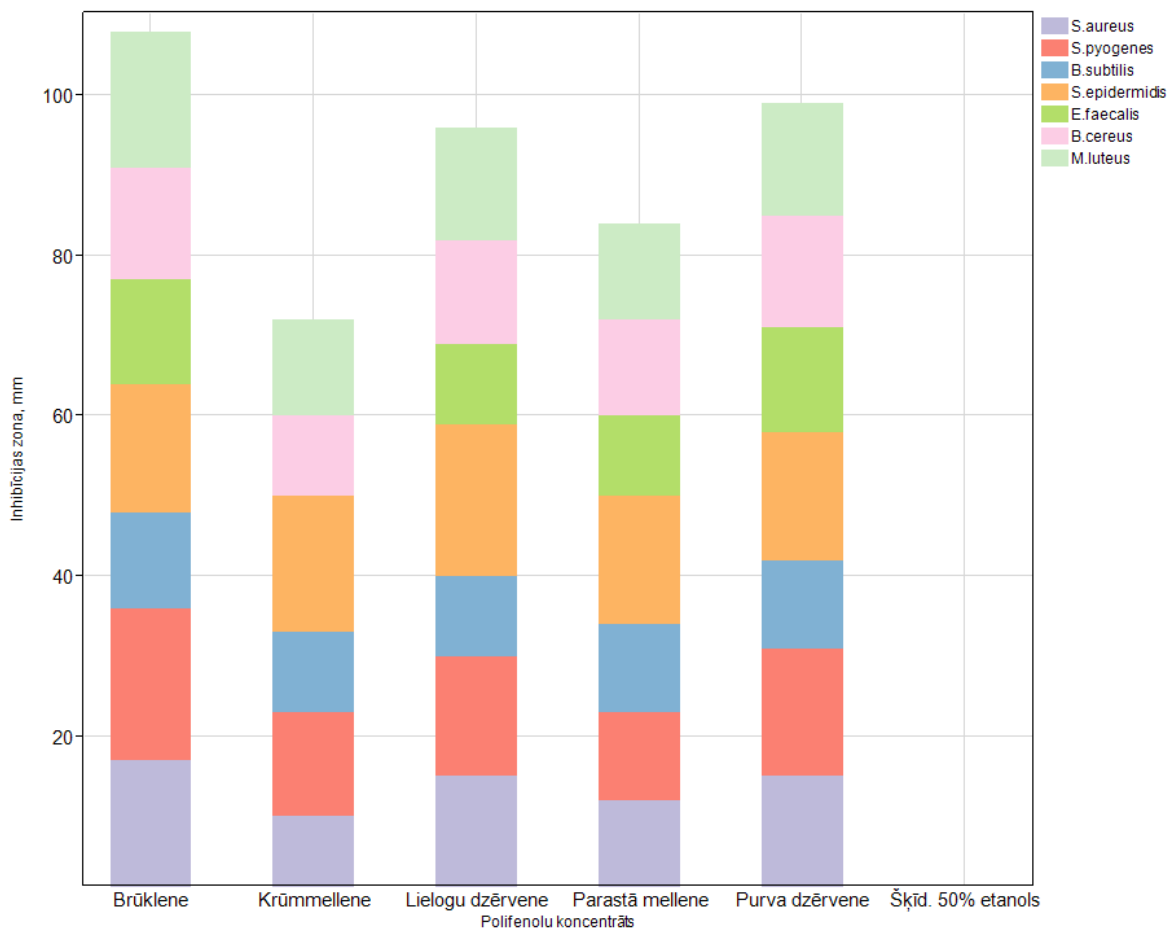
vielām, kas nodrošina paaugstinātu aktivitāti šūnu līmenī. Kā vielas ar augstu bioloģisko aktivitāti un pretvēža aktivitāti tiek minētas elagīnskābe un vielu grupa antociāni. Visas augstāk minētās veselību uzlabojošās īpašības, kas tiek piedēvētas ogu polifenoliem, padara polifenolu koncentrātu iegūšanu no ogu spiedpaliekām par praktiski izmantojamu rezultātu. Precīzai iegūto ekstraktvielu raksturošanai *in vitro* šūnu līnijās, ir nepieciešams veikt vairāk eksperimentu, izmantojot dažādas vēža šūnu līnijas, kā arī nepieciešams izprast konkrēto vielu iedarbības mehānismus, kas aptur šūnu proliferāciju.

3.5.2. Ogu ekstraktu antimikrobiālā aktivitāte

Ogu polifenolu koncentrātu antimikrobiālā aktivitāte

Antimikrobiālās aktivitātes skrīninga nolūkos tika veikti agara difūzijas testi ar dažādiem mikroorganismiem, izmantojot iegūtos ogu polifenolu koncentrātus. Polifenolu koncentrātu iespējamo izmantošanas iespēju izpētei tika veikti eksperimenti ar cilvēkam patogēniem mikroorganismiem (3.14. tabula), kas ir atbildīgi par ādas vai zarnu infekcijām, saindēšanos ar pārtiku vai urīnceļu iekaisumiem.

Iegūtie inhibīcijas zonu mērījumi, kas redzami 3.14. tabulā, parāda, ka *E.coli* un *P.aeruginosa* (gram–negatīvas baktērijas) netiek inhibētas. Testēto gram–pozitīvo baktēriju, *M.luteus*, *B.cereus*, *E.faecalis*, *S.epidermidis*, *B.subtilis*, *S.pyogenes*, *S.aureus* attīstība tiek inhibēta iegūto ogu polifenolu koncentrātu klātbūtnē. Vieslielākā ogu ekstraktu ietekme ir novērojama uz *S.epidermidis* (84 mm kopējā inhibīcija), *M.luteus* (69 mm kopējā inhibīcija) un *S.pyogenes* (74 mm kopējā inhibīcija) (3.14. tabula), kas parāda šo mikroorganismu augsto jutīgumu pret polifenolu iedarbību. Savukārt vismazākā ekstraktu ietekme tika novērota uz *B.subtilis* (54 mm kopējā inhibīcija), *B.cereus* (63 mm kopējā inhibīcija), *E.faecalis* (46 mm kopējā inhibīcija) (3.14. tabula), kas parāda vājāku polifenolu iedarbību uz minētajiem mikroorganismiem.



3.12. attēls. Agara difūzijas testu inhibīcijas zonu lielums atkarībā no lietotā ekstrakta (15 mg/mL 50 % etanola) un izmantotās baktēriju sugas.

Apkopojot un vizualizējot iegūtos agara difūzijas testu rezultātus ir iespējams noteikt, kuru ogu ekstraktam ir visizteiktākā iedarbība uz pētītajiem mikroorganismiem. 3.12. attēlā iekrāsotās zonas parāda mikroorganismu inhibīciju atkarībā no pielietotā polifenolu koncentrāta. Brūklenes (108 mm), lielogu dzērvenes (96 mm) un purva dzērvenes (99 mm) uzrāda līdzīgus kopējās inhibīcijas rādītājus, turpretim krūmmellenes (72 mm) un parastās mellenes (84 mm) uzrāda statistiski būtiski zemākus (t-test, $p=0.004$) rādītājus (3.12. attēls).

Krūmmelleņu ekstrakta zemā antimikrobiālā aktivitāte pret dažādiem mikroorganismiem ir skaidrojama ar zemo polifenolu saturu (3.9. tabula). Iegūtais parasto melleņu ekstrakts, kas uzrādīja būtiski zemāku antimikrobiālo aktivitāti, satur visaugstāko polifenolu daudzumu no visiem testētajiem ekstraktiem (55,98 g/100 g koncentrāta), no kuriem 34,75 % ir antociāni. Tas liek domāt, ka antociāni nav galvenā antimikrobiālo aktivitāti noteicošā, ekstraktos esošā vielu grupa. Šo hipotēzi apstiprina arī iegūtie dati no testiem ar brūklenēm un dzērvenēm, kur antociānu saturs ir tikai 1,59–5,95% no kopējā polifenolu satura, bet polifenolu saturs ekstraktā ir pat līdz 52% (brūklenes) (3.9. tabula).

Ogu polifenolu koncentrātu minimālā inhibējošā un baktericīdā koncentrācija

Mikroorganismiem, kas uzrādīja jutību agara difūzijas testos, tika noteikta minimālā inhibējošā ekstrakta koncentrācija (MIC) un minimālā baktericīdā koncentrācija (MBC). Noteiktās ekstraktu koncentrācijas, kas apkopotas 3.15. tabulā, parāda, ka vismazākās inhibējošās koncentrācijas ir nepieciešama *E.faecalis* (0,07–0,14 mg/mL), *S.epidermidis* (0,07–0,23 mg/mL) un *S.pyogenes* (0,07–0,23 mg/mL), parādot šo mikroorganismu paaugstināto jutību pret ogu polifenoliem. Visaugstāko rezistenci pret polifenolu koncentrātu inhibējošo aktivitāti uzrādīja *M.luteus* (0,23–0,47 mg/mL) un *B.cereus* (0,07–0,55 mg/mL) (3.15. tabula). Viszemākā nepieciešamā baktericīdā koncentrācija tika noteikta *E.faecalis* (0,27–1,1 mg/mL), *S.epidermidis* (0,47–0,55 mg/mL) un *S.aureus* (0,47 mg/mL). *B.subtilis* (0,55–1,1 mg/mL), *B.cereus* (0,55–1,1 mg/mL) un *M.luteus* (0,47–1,88 mg/mL) uzrādīja visaugstāko nepieciešamo koncentrāciju baktericīdai iedarbībai (3.14. tabula). Iegūtie MIC un MBC rezultāti (3.15. tabula) korelē ($r=0,9333$, $p=0,0205$) ar novērotajiem inhibīciju zonu mērījumiem (3.14. tabula). Tāpat kā agara difūzijas testos iegūtie rezultāti izceļ *S.epidermidis* un *S.pyogenes* kā visjutīgākos mikroorganismus, arī MIC un MBC eksperimentos šo organismu augšana tiek kavēta pie zemām polifenolu koncentrāta devām. *Bacillus* ģints mikroorganismi uzrādīja vismazākās inhibīcijas zonas, attiecīgi parādot visaugstāko nepieciešamo MIC un MBC (3.14., 3.15. tabula).

Līdzīgi kā agara difūzijas testā, no MIC un MBC iegūtajiem rezultātiem, var secināt, kurš ekstrakts ir ar vislielāko potenciālu dažādu mikroorganismu inhibīcijai. Pētītos mikroorganismus visefektīvāk spēj inhibēt sarkano ogu ekstrakti (brūkleņu, purva dzērveņu un lielogu dzērveņu), no kuriem viszemāko inhibējošo koncentrāciju uzrādīja lielogu dzērveņu polifenolu koncentrāts (0,07–0,23 mg/mL), pretēji, visaugstākā inhibējošā koncentrācija bija nepieciešama krūmmelleņu ekstraktam (0,14–0,55 mg/mL) (3.15. tabula). MBC parastajām mellenēm un krūmmellenēm ir ievērojami augstāka nekā purva dzērvenēm, lielogu dzērvenēm un brūklenēm (3.15. tabula). Tāpat kā iegūtie agara difūzijas testa rezultāti, arī MIC un MBC rezultātu apkopojums iezīmē divas ekstraktu grupas, tumšās ogas (mellenes) un sarkanās ogas (brūklenes un dzērvenes). Tumšo ogu ekstrakti ir nepieciešami ievērojami augstākās koncentrācijas, lai inhibētu un apturētu pētīto organismu augšanu.

3.14. tabula. Agara difūzijas inhibīcijas zonas atkarībā no izmantotā ogu polifenolu koncentrāta (15 mg/mL 50 % etanola), zonu diametrs izteikts mm*.

	<i>M.luteus</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Parastā mellene	12	-	12	10	16	11	11	12	-
Krūmmellene	12	-	10	-	17	10	13	10	-
Purva dzērvene	14	-	14	13	16	11	16	15	-
Lielogu dzērvene	14	-	13	10	19	10	15	15	-
Brūklene	17	-	14	13	16	12	19	17	-
50% etanols	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“-” – netika novērota inhibīcija.

* Agara bedrītes diametrs 7 mm.

3.15. tabula. Polifenolu koncentrātu minimālā inhibējošā (MIC) un minimālā baktericīdā koncentrācija (MBC), mg/mL.

	<i>M.luteus</i>		<i>B.cereus</i>		<i>E.faecalis</i>		<i>S.epidermidis</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>S. Pyogenes</i>		<i>S.aureus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Parastā mellene	0,47	0,94	0,28	>0,57	0,14	0,57	0,23	0,47	0,14	>1,15	0,14	0,57	0,23	0,47
Krūmmellene	0,47	1,88	0,55	>1,10	0,14	>1,10	0,14	>0,55	0,27	>1,10	0,14	>1,10	0,23	0,47
Purva dzērvene	0,23	0,47	0,07	0,55	0,07	0,27	0,07	>0,55	0,14	0,55	0,23	0,47	0,23	0,47
Lielogu dzērvene	0,23	0,94	0,07	>0,55	0,14	>0,55	0,07	>0,55	0,14	0,55	0,07	>0,55	0,23	0,47
Brūklene	0,23	0,47	0,08	>0,62	0,08	0,31	0,23	0,47	0,16	0,62	0,08	0,62	0,23	0,47

Visas izmantotās gram–pozitīvās baktērijas uzrādīja kavētu proliferāciju, kad tika pakļautas ogu polifenolu koncentrātiem. Ņemot vērā, ka polifenolu galvenais iedarbības mehānisms ir saistīts ar iedarbību uz citoplazmatisko membrānu, ārējais lipīdu slānis, kas apņem gram–negatīvās baktērijas, darbojas kā papildus aizsardzības mehānisms, tādējādi izskaidrojot ekstraktu zemo aktivitāti pret *E.coli* un *P.aeruginosa*. Pretēji šajā darbā novērotajam, Pereira et al., (2007) parāda olīvkoku lapu polifenolu ekstrakta iedarbību uz *P.aeruginosa*. Ņemot vērā izmantoto paraugu (olīvkoka lapas), ekstrakta iegūšanu (neattīrīts ekstrakts) nevar tieši salīdzināt iegūtos rezultātus. Šāda veida antimikrobiālo aktivitāti varēja izraisīt citi ekstraktos esošie savienojumi, piemēram, organiskās skābes, vai polifenoli saskaņā ar citiem, ar membrānu nesaistītiem mehānismiem, piemēram, mijiedarbība ar substrātu (Vattem et al., 2004; Wu et al., 2008). Krūmmelleņu ekstrakts, kā arī citi sagatavotie ekstrakti, neuzrādīja iedarbību pret *E.coli*, pretēju rezultātu ieguva Burdulis et al., (2009), kā sagatavotais krūmmelleņu metanola ekstrakts spēja inhibēt *E.coli*. Šo atšķirību var izskaidrot: (I) cita *E.coli* celma izmantošana, kas var parādīt celmam specifisku rezistenci, (II) ekstrakta sagatavošanas procedūra (ekstrakta attīrīšana) un solventa izvēle, (III) ogu materiāla izvēle– spiedpaliekas un svaigas ogas var saturēt dažādus savienojumus (Lohachoompol et al., 2004) (VI), nepareiza iegūto rezultātu interpretācija. Lielogu dzērveņu un purva dzērveņu ekstraktiem piemīt spējas novērst biofilmu veidošanos urīnceļos, ko izraisa uropatogēni *E.coli* (UPEC) celmi. Rodriguez-Pérez et al., (2016) iegūto lielogu dzērveņu ekstraktu sadalīja 13 frakcijās un katru no šīm frakcijām testēja uz UPEC. Tika novērots, ka miricetīnu un kvercetīnu saturošās frakcijas samazināja biofilmu blīvumu, bet frakcijas, kurās bija atrodami dihidroferulskābe, procianidīna A dimēri, kvercetīna glikozīdi un prodelfinidīns B samazināja virsmas hidrofobumu (Rodriguez-Pérez et al., 2016). Neskatoties uz minēto vielu klātbūtni šajā pētījumā iegūtajos polifenolu koncentrātos netika novērota *E.coli* inhibīcija, līdz ar to, lai iegūtu līdzīgus rezultātus būtu nepieciešams izvēlēties metodes, kas novērtē biofilmu veidošanos un baktēriju spēju piestiprināties pie virsmām. *Bacillus* ģints baktērijas tiek minētas kā visjutīgākās pret dažādu ogu polifenoliem (Heinonen, 2007), arī šajā pētījumā parādot ievērojamu inhibīciju sagatavoto ogu ekstraktu klātbūtnē. Laslo and Köbölkuti, (2017) pētīja brūkleņu (veselas brūklenes, nevis ekstrakts) iedarbību uz *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes S1* un *Listeria monocytogenes S2*. Pārsteidzoši, ka augstāk minētajā pētījumā iedarbība tika novērota tieši uz gram-negatīvām baktērijām (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*) (Laslo and Köbölkuti, 2017), kas ir pretēji šajā pētījumā novērotajam.

MIC un MBC šāda veida ekstraktiem nav iepriekš aprakstītas. Neattīrīti ekstrakti, kas apstrādāti ar pektināzi ir izmantoti, lai aprakstītu *Vaccinium corymbosum* ogu un lapu ekstraktu iedarbību uz *S.aureus*, *B.cereus*, *P.aeruginosa* (Silva et al., 2013). Silva et al., 2013 pētījumā ekstrakti tika iegūti izmantojot augu materiālu, kas ekstrahēts ar 100°C H₂O, un, lai iegūtu sausu ekstrakta koncentrātu, tas tika liofilizēts. Iegūtās MIC un MBC

bija attiecīgi 50 mg/mL un >50 mg/mL, kas ir ievērojami augstākas, nekā šajā pētījumā iegūtās MIC un MBC vērtības (Silva et al., 2013). Arī *Syzygium joabolanum* lapu polifenolu ekstrakta pret *S.aureus* uzrādītā MIC vērtība 300 mg/mL ir ievērojami augstāka nekā šajā pētījumā aprakstītās inhibējošās koncentrācijas (Nascimento et al., 2000). Savukārt, *Helicrysum italicum* ekstraktu MIC vērtības pret *S.aureus* (0,125–0,5 mg/mL) ir līdzīgas šajā pētījumā iegūtajām (Nostro et al., 2001), bet *Vaccinium corymbosum* ekstrakta *P.aeruginosa* MIC vērtības bija 50–70 mg/mL (Nascimento et al., 2000). Tekwu et al. (2012) testējot 12 dažādu Kamerūnas ārstniecības augu ekstraktus uz *P.aeruginosa* un *B.cereus* ieguva MIC 0,064–0,512 mg/mL un MBC 1,024–0,128 mg/mL respektīvi, kas atbilst šajā pētījumā iegūtajiem rezultātiem. Šādu rezultātu salīdzināšana ir kritiski jāanalizē. Ņemot vērā atšķirības parauga sagatavošanā, aktīvo vielu atšķirīgas koncentrācijas, ekstrakta tīrību un citus faktorus. Ņemot vērā šajā pētījumā sagatavoto ogu polifenolu koncentrātu attīrīšanas metodi un parauga sagatavošanas procedūru, kā arī iegūtās zemās MIC un MIB vērtības, var secināt, ka ekstrakta saturam un tīrībai ir būtiska nozīme antimikrobiālās aktivitātes noteikšanā.

Veiktā literatūras analīze, kopā ar iegūtajiem datiem, parāda lielu rezultātu daudzveidību un nenoteiktību. Vienas ģints dažādu ogu sugu ekstraktu vai veselu ogu iedarbības uz mikroorganismiem var būt dažāda. Polifenolu daudzveidība ekstraktos un dažādos pētījumos iegūto ekstraktu sastāvs ir atkarīgs no izmantotajiem ekstrakcijas šķīdinātājiem, ekstrakcijas procedūras, kas var mainīt iegūtā ekstrakta bioloģisko vērtību un aktivitāti. Tika novērotas atšķirības arī dažādu baktēriju celmu izmantošanā, izmantojot celmus ar dažādu ģenētisko materiālu var iegūt rezultātus, kas var būt pretēji celmiem bez šīm mutācijām. Pētījumos, kuros tiek raksturoti ogu ekstrakti ir nepieciešams konkrēti noteikt izmantojamās baktēriju sugas un celmus, kā arī ir nepieciešams veikt standartizētus testus, lai noskaidrotu katra polifenola/polifenolu grupas iedarbību uz konkrēto mikroorganismu (Puupponen-Pimiä et al., 2001). Katrā no šajā darbā apskatītajiem citu autoru pētījumiem ogu ekstrakcijas metodes, izmantotās mikrobioloģiskās metodes, izmantotie mikroorganismi ir savādāki, kas padara iegūto rezultātu salīdzināšanu apgrūtinātu un, līdz ar to, ļauj veikt tikai minējumus par ekstrakcijā izmantotā materiāla patieso iedarbību uz mikroorganismiem.

Secinājumi

1. Augu sekundāro metabolītu (polifenolu) sastāva izpētei svarīgi ir veikt ekstrakcijas apstākļu optimizāciju un ekstraktvielu analītisku raksturošanu. Optimālie ogu spiedpalieku ekstraktu iegūšanas apstākļi ir sekojoši: apstrāde ar ultraskaņu 25 minūtes, metanols, kas paskābināts ar trifluoretiķskābi (97,3 : 0,3 tilp. %) un šķīdinātāja/ogu spiedpalieku masas attiecību 1:90.
2. *Vaccinium* ģints ogu polifenolu (īpaši antociānu) ekstrakcijas apstākļu izpēte un optimizācija izmantojot virsmas reakcijas metodi, nodrošināja statistiski ticamus, būtiski augstākus ekstraktvielu iznākumus salīdzinot ar līdz šim izmantotajām ekstrakcijas metodēm.
3. Ogu sulas ražošanas atkritumprodukti, *Vaccinium* ģints ogu spiedpaliekas, ir vērtīgs polifenolu avots. Tika pierādīts, ka izdalot polifenolus un antociānus, saskaņā ar optimālajiem ekstrakcijas apstākļiem, ogu spiedpaliekas nodrošina augstākus bioloģiski aktīvu ekstraktvielu iznākumus nekā veselas ogas.
4. Izveidotā ekstraktu attīrīšanas procedūra ir izmantojama preparatīvu paraugu iegūšanai. Atkarībā no izmantotajām ogām tika iegūti 2,44– 3,33 g polifenolu koncentrāta no 100 g ogu spiedpalieku, kas satur 36%– 56% polifenolu, no kuriem līdz pat 33% (parastās mellenes) ir antociāni.
5. *Vaccinium* ģints ogu polifenolu koncentrātus raksturo augsta brīvo radikāļu saistīšanas spēja, kas tika noteikta izmantojot ABTS, FRAP un DPPH metodes. Visaugstākā antiradikālā aktivitāte piemīt parasto melleņu polifenolu koncentrātam, bet visi sagatavotie ekstrakti uzrādīja augstāku antiradikālo aktivitāti salīdzinot ar izmantoto standarta antioksidantu (C-vitamīns).
6. Pētīto ogu ekstraktu ķīmiskā sastāva analīze ļāva identificēt un kvantificēt 15 dažādas antociānus, kā arī 24 citus polifenolus. Parastās mellenes satur augstas cianidīna glikozīda koncentrācijas, savukārt brūklenes satur augstas procianidīnu koncentrācijas. Iegūtie kvantificēšanas dati ļāva veikt klāstera analīzi un principiālo komponentu analīzi, kas atklāja pētīto ogu hemotaksonomisko iedalījumu – purva dzērveņu un lielogu dzērveņu ķīmiskais sastāvs ir cieši saistīts ar brūkleņu ķīmisko sastāvu un parasto melleņu ķīmiskais sastāvs ir tuvu saistīts ar krūmmelleņu. Šādas atšķirības veido ogās esošas dažādās vielu grupas, piemēram, flavanoli, fenolskābes, antociāni.
7. Ogu polifenolu koncentrāti relatīvi zemās koncentrācijās (0,0125 mg ekstrakta/mL) spēj inhibēt dermas šūnu proliferāciju, iezīmējot iespējas pētīt to spējas kavēt vēža šūnu attīstību. Veiktie šūnu citometrijas testi uzrāda būtiski labākas ekstraktu antioksidatīvās īpašības un spēju inhibēt brīvos radikāļus kā lietotais standarta antioksidants (C-vitamīns 0,05 mg/mL).
8. Pētīta un pierādīta *Vaccinium* ģints ogu polifenolu spēja inhibēt vairāku mikroorganismu, tai skaitā patogēno baktēriju, augšanu. Ar ādas infekcijām saistīto mikroorganismu minimālā inhibējošā koncentrācija *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* un *Staphylococcus aureus*, kā arī citu slimību izraisītāju *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* bija robežās no 0,07 līdz 1,88 mg ekstrakta/mL.

Pateicības

Izsaku pateicību darba vadītājai Vizmai Nikolajevai par produktīvu zinātnisko diskusiju, kā arī par palīdzību mikrobioloģisko testu veikšanā un interpretācijā. Pateicos Mārtiņam Borodušķim, Elzai Kaktiņai un Ilzei Blāķei par palīdzību darbā bioanalītisko un biodozimetrisko metožu laboratorijā un Laurim Arbidanam par sniegto tehnisko atbalstu.

Izmantotā literatūra

- Amouretti, M. (1972) Therapeutic value of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides in an internal medicine department. *Therapeutique*, 48, 579–581.
- Amr, A., Al-Tamimi, E. (2007) Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 985–991.
- Andersen, Ø. M. (2007) Recent Advances in the Field of Anthocyanins. In *Polyphenols – Recent Advances in Research*, Lattanzio, V., Daayf, F., Eds., Blackwell: London; 325–328.
- Andersen, Ø. M., Jordheim, M. (2006) The Anthocyanins. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Andersen, Ø. M., Markham, K. R., Eds., CRC Press: Boca Raton; 471–553.
- Andreasen, M.F., Landbo, A., Christensen, L.P., Hansen, A., Meyer, A.S. (2001) Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4090-6.
- Awika, J. M., Rooney, L. W., Waniska, R. D. (2005) Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90(1–2), 293–301
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K. (2000) Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148, 187–197.
- Bagchi, D., Sen, C. K., Bagchi, M., Atalay, M. (2004) Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of novel anthocyanin-rich berry extract formula, *Biochemistry (Moscow)*, 69, 75–80.
- Baydar, N. G., Ozkan, G., Sagdic, O. (2004) Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Chemistry*, 15, 335–339.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Beattie, J., Crozier, A., Duthie, G. G. (2005) Potential health benefits of berries. *Current Nutrition and Food Science*, 1, 71–86.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bettini, V., Fiori, A., Martino, R., Mayellaro, F., Ton, P. (1985) Study of the mechanism whereby anthocyanosides potentiate the effect of catecholamines on coronary vessels. *Fitoterapia*, 56, 67–72.
- Bickford, P. C., Gould, T., Briederick, L., Chadman, K. (2000) Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Research*, 866, 211–217.
- Biskup, I., Golonka, I., Gamian, A., Sroka, Z. (2013) Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 67, 958-963.
- Bomser, J., Madhavi, D. L., Singletary, K., Smith, M. A. (1996) *In vitro* anticancer activity of fruit extracts from accinium species. *Planta Medica*, 62, 212–216.

- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W., Crozier, A. (2009) Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3901-3909.
- Box, J., Wilson, W. (1951) Central composites design. *JR Stat Soc*, 1, 1-35.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bräunlich, M., Sliemstad, R., Wangensteen, H., Brede, C., Malterud, K. E., Barsett, H. (2013) Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients*, 5(3), 663-678.
- Brouillard, R., Dangles, O. (1994) Flavonoids and Flower Colour. In *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, Harborne, J. B., Ed., Chapman & Hall: London, pp 565–588.
- Brouillard, R. (1988) Flavonoids and flower colour. In *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*, Harborne, J. B., Ed., Chapman & Hall: London, pp 525–538.
- Bucic´-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M., Velic, D. (2007) Study of solid– liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81, 236–242.
- Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutiene, I., Stackevicené, E., Nikolajevs, L., Janulis, V. (2008) Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 66(4), 399-408.
- Bureau, S., Renard, C. M. G. C., Reich, M., Ginies, C., Audergon, J. M. (2009) Change in anthocyanin concentrations in red apricot fruits during ripening. *Food Science and Technology*, 42, 372–377.
- Cacace, J. E., Mazza, G. (2003) Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379–389.
- Castaneda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernandez, M., Elena, M., Paez- Hernandez, J. A., Rodriguez Galan-Vidal, J. A., Galan-Vidal, C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871.
- Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A. (2005) Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research*, 591, 237–246.
- Chandra, A., Rana, J., Li, Y. (2001) Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC–MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3515-3521.
- Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M. C., Raghavarao, K. S. M. S. (2012) Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 615-623.
- Chen, Y., Zhang, W., Zhao, T., Li, F., Zhang, M., Li, J., Yang, L. (2016) Adsorption properties of macroporous adsorbent resins for separation of anthocyanins from mulberry. *Food Chemistry*, 194, 712-722.

- Chen, P. N., Chu, S. C., Chiou, H. L., Kuo, W. H. (2007) Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Letters*, 235, 248–259.
- Cignarella, A., Nastasi, M., Cavalli, E., Puglisi, L. (1996) Novel lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia: A comparison with ciprofibrate. *Thrombosis Research*, 84, 311–322.
- Clemetson, C.A.B., Andersen, L. (1966) Plant polyphenols as antioxidants for ascorbic acid. *Annals of NY Academy of Sciences*, 136, 339–78.
- Clifford, M. N., Brown, J. E. (2005) Dietary flavonoids and health—broadening the perspective. In *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications* (pp. 319-370). CRC Press.
- Close, D. C., Beadle, C. L. (2003) The ecophysiology of foliar anthocyanin. *Botany Reviews*, 69, 149–161.
- Cooke, D., Steward, W. P., Gescher, A. J.,; Marczylo, T. (2005) Anthocyanins from fruits and vegetables - Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *European Journal of Cancer*, 41,1931–1940.
- Cooper-Driver, G. A., Bhattacharya, M. (1998) Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry*, 49, 1165–1174.
- Corrales, M., Fernandez, A., Pinto, M. G. V., Butz, P., Franz, C. M., Schuele, E. Tauscher, B. (2010) Characterization of phenolic content, in vitro biological activity, and pesticide loads of extracts from white grape skins from organic and conventional cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3471-3476.
- Cretu, G. C., Morlock, G. E. (2014) Analysis of anthocyanins in powdered berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. *Food Chemistry*, 146, 104-112.
- Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G. Ibrić, S. (2016) Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*, 194, 135-142.
- d’Alessandro L.G., Dimitrov K., Vauchel P. Nikov I. (2014) Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 92, 1818-1826
- Denev, P., Ciz, M., Ambrozova, G., Lojek, A., Yanakieva, I., Kratchanova, M. (2010) Solid-phase extraction of berries’ anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry*, 123(4), 1055-1061.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Folin, O., Ciocalteu, V. (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627-650.
- Foo, L.Y., Lu, Y., Howell, A.B., Vorsa, N. (2000) A-type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic p-fimbriated *Escherichia coli*. *Journal of Natural Products*, 63, 1225-28.
- Fossen, T., Slimestad, R., Andersen, Ø. M. (2003) Anthocyanins with 4'-glucosidation from red onion, *Allium cepa*. *Phytochemistry*, 64, 1367–1374.

- Fulcrand, H., Mane, C., Preys, S., Mazerolles, G., Bouchut, C., Mazauric, J.-P. (2008) Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry*, 69, 3131–3138.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. (2003) Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217-225.
- Goto, T., Kondo, T. (1991) Structure and molecular stacking of anthocyanins-flower color variation. *Angewandte Chemie. Englische Ed.*, 30, 17–33.
- Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007) The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105, 1126–1134.
- Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481–504.
- Harborne, J. B., Williams, C. A. (1995) Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Report*, 12, 639–657.
- Harris, G. K., Gupta, A., Nines, R. G., Kresty, L. A. (2001) Effects of lyophilized black raspberries on azoxymethane-induced colon cancer and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in the Fischer 344 rat. *Nutrition and Cancer*, 40, 125–133.
- He, J., Wallace, T.C., Keatley, K., Failla, M., Giusti, M.M. (2009) Stability of black raspberry anthocyanins in the digestive tract lumen and transport efficiency into gastric and small intestinal tissues in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8), 3141-48
- Heinonen, M. (2007) Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics—a Finnish perspective. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 684-691.
- Hellström, J. K., Törrönen, A. R., Mattila, P. H. (2009) Proanthocyanidins in common food products of plant origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7899-7906.
- Hollman, P.C.H., De Vries, J.H.M., Van Leeuwen, S.D.D., Mengelers, M.J.B., Datan, M.B. (1995) Absorption of dietary quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1276-82.
- Horszwald, A., Julien, H., Andlauer, W. (2013) Characterisation of Aronia powders obtained by different drying processes. *Food Chemistry*, 141(3), 2858-2863.
- Hukkanen, A. T., Pölönen, S. S., Kärenlampi, S. O., Kokko, H. I. (2006) Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(1), 112-119.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Jacquemart, A.L. (1996) *Vaccinium uliginosum* L. *Journal of Ecology*, 5, 771-785
- Jang, Y. P., Zhou, J., Nakanishi, K., Sparrow, J. R. (2005) Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *Photochemistry and Photobiology*, 81, 529–536.
- Juranic, Z., Zizak, Z. (2005) Biological activities of berries: From antioxidant capacity to anti-cancer effects. *Biofactors*, 23, 207–211.

- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Heinonen, M. (2001) Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4076-4082.
- Kalt, W. (2014) Anthocyanins and their role in berry health benefits. In *XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): II 1117* (pp. 191-200).
- Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Koide, T., Umeda, T., Yukawa, T., Terabe, K. (1995) Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Investigations*, 13, 590–594.
- Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., Gordon, M. H. (2006) Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4016–4021.
- Karlsen, A., Rettersto, L., Laake, P., Paur, I., Kjolsrud-Bohn, S., Sandvik, L., Blomhoff, R. (2008) Anthocyanins inhibit nuclear factor- B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *Journal of Nutrition*, 137(8), 1951-54.
- Key, B. D., Howell, R. D., Criddle, C. S. (1997) Fluorinated organics in the biosphere. *Environmental Science & Technology*, 31(9), 2445-2454.
- Khatab, R., Eskin, M., Aliani, M., Thiyam, U. (2010) Determination of sinapic acid derivatives in canola extracts using high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(2), 147-155.
- Kim, Y. H., Bang, C. Y., Won, E. K., Kim, J. P. Choung, S. Y. (2009) Antioxidant activities of *Vaccinium uliginosum* L. extract and its active components. *Journal of Medicinal Food*, 12(4), 885-892.
- Kylli, P., Nohynek, L., Puupponen-Pimiä, R., Westerlund-Wikström, B., McDougall, G., Stewart, D. Heinonen, M. (2010) Rowanberry phenolics: compositional analysis and bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11985-11992.
- Kondo, T., Yoshida, K., Nakagawa, A., Kawai, T., Tamura, H., Goto, T. (1992) Structural basis of blue colour development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature*, 358, 515–518.
- Kondo, T., Suzuki, K., Yoshida, K., Oki, K., Ueda, M., Isobe, M., Goto, T. (1991) Structure of cyanodelphin, a tetra-p-hydroxybenzoated anthocyanin from blue flower of *Delphinium hybridum*. *Tetrahedron Letters*, 32, 6375–6378.
- Krueger, C. G., Chesmore, N., Chen, X., Parker, J., Khoo, C., Marais, J. P., Reed, J. D. (2016) Critical reevaluation of the 4-(dimethylamino) cinnamaldehyde assay: cranberry proanthocyanidin standard is superior to procyanidin A2 dimer for accurate quantification of proanthocyanidins in cranberry products. *Journal of Functional Foods*, 22, 13-19.
- Krueger, C. G., Reed, J. D., Feliciano, R. P., Howell, A. B. (2013) Quantifying and characterizing proanthocyanidins in cranberries in relation to urinary tract health. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(13), 4385-4395.
- Kühnau, J. (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. In *World review of nutrition and dietetics* (pp. 117-191). Karger Publishers.

- Landi, M., Tattini, M., Gould, K. S. (2015) Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 119, 4-17.
- Laslo, É., Kobolkuti, Z. A. (2017) Total phenol content and antimicrobial activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) from several areas in the Eastern Carpathians. *Notulae Scientia Biologicae*, 9(1), 77-83.
- Lätti, A. K., Riihinen, K. R. Kainulainen, P. S. (2007). Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(1), 190-196.
- Lee, J., Finn, C. E., Wrolstad, R. E. (2004) Comparison of anthocyanin pigment and other phenolic Lapornik, B., Prosek, M., Golc, W. A. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214–222.
- Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y. (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2926–2930
- Lohachoopol, V., Srzednicki, G., Craske, J. (2004) The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 248-252.
- López-Gutiérrez, N., Romero-González, R., Vidal, J. L. M., Frenich, A. G. (2016) Determination of polyphenols in grape-based nutraceutical products using high resolution mass spectrometry. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 249-259.
- López-Gutiérrez, N., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Vidal, J. L. M., Frenich, A. G. (2015) Identification and quantification of phytochemicals in nutraceutical products from green tea by UHPLC–Orbitrap-MS. *Food Chemistry*, 173, 607-618.
- Luthria, D. L., Pastor-Corrales, M. A. (2006) Phenolic acids content of 15 dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205–211.
- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., Törrönen, A. R. (2004a) Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6178-6187.
- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., Mattila, P. H., González-Paramás, A. M., Törrönen, A. R. (2004b) Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4477-4486.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) *Fruit Phenolics*. Boca Raton: CRC Press.
- Makris, D. P., Boskou, G., Chiou, A. Andrikopoulos, N. K. (2008) An investigation on factors affecting recovery of antioxidant phenolics and anthocyanins from red grape (*Vitis vinifera* L.) pomace employing water/ethanol-based solutions. *American Journal of Food Technol*, 3(3), 164-173.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
- Markham, K., Andersen, O. (2006) *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. London: CRC Taylor & Francis Group.

- Mattila, P., Hellström, J., Törrönen, R. (2006) Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7193-7199
- Mauriņš, A., Zvirgzds A. (2006) *Dendroloģija*. LU: Jelgavas tipogrāfija
- Metivier, R. P., Francis, F. J., Clydesdale, F. M. (1980) Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, 45(4), 1099–1100.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., Wrolstad, R. E. (2002) Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519–525.
- Moskowitz, A. H., Hrazdina, G. (1981) Vacuolar contents of fruit subepidermal cells from *Vitis* species. *Plant Physiology*, 68(3), 686-692.
- Muller, E., Berger, R., Blass E., Sluyts, D., Pfennig, A. (2008) Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, Liquid–Liquid Extraction Equipment. (Online Version). Wiley-VCH Verlag.
- Naczk, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542.
- Nakaishi, H. Matsumoto, H. Tominaga, S. Hirayama, M. (2000) Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. *Alternative Medicine Review*, 5, 553–62.
- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., Silva, G. L. (2000) Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 247-256.
- Nerdal, W., Andersen, Ø. M. (1991) Evidence for self-association of the anthocyanin petanin in acidified, methanolic solution using two-dimensional nuclear overhauser enhancement NMR experiments and distance geometry calculations. *Phytochemical Analysis*, 2, 263–70.
- Nguyen, M. (1997) Angiogenic factors as tumor markers. *Investigational New Drugs*, 15, 29–37.
- Nile, S.H., Park, S.W. (2014) Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134-144
- Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Rascon-Chu, A., Marquez-Escalante, J., Guerrero, V., Salas-Muñoz, E. (2010) Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: Structure, sources and applications. *Phytochemistry Review*, 9:111-20.
- Nostro, A., Bisignano, G., Cannatelli, M. A., Crisafi, G., Germano, M. P., Alonzo, V. (2001) Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(6), 517-520.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.
- Paula, J. T., Paviani, L. C., Foglio, M. A., Sousa, I. M., Cabral, F. A. (2013) Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 81, 33-41.

- Pavlović, A. V., Papetti, A., Zagorac, D. Č. D., Gašić, U. M., Mišić, D. M., Tešić, Ž. L., Natić, M. M. (2016) Phenolics composition of leaf extracts of raspberry and blackberry cultivars grown in Serbia. *Industrial Crops and Products*, 87, 304-314.
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Pereira, J. A. (2007) Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153-1162.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Núñez, M. J. (2005) Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2111-2117.
- Price, K.R., Prosser, T., Richetin, A.M.F., Rhodes, M.J.C. (1999) A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chemistry*, 66, 489–494.
- Prior, R. L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M. J., Reed, J. (2010) Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1473-1478.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K. M. (2001) Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 494-507.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rechner, A. R., Kroner, C. (2005) Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis Research*, 116, 327–334.
- Regueiro, J., Sánchez-González, C., Vallverdú-Queralt, A., Simal-Gándara, J., Lamuela-Raventós, R., Izquierdo-Pulido, M. (2014) Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap–Orbitrap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 152, 340-348.
- Rice-Evans, C. A., Packer, L. (2003) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker: New York, 2nd ed.
- Ritchie, J.C. (1996) *Vaccinium myrtillus* L. *Journal of Ecology*, 84, 771-785
- Robert W., Mike K. (2006) Nutraceuticals and functional foods. In: Robert E. C. Wildman, Ed. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. 2nd Edition p. Boca Raton: CRC Press, 1-21.
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Uberos, J., Jiménez-Sánchez, C., Peña, A., Segura-Carretero, A. (2016) Antibacterial activity of isolated phenolic compounds from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) against *Escherichia coli*. *Food & Function*, 7(3), 1564-1573.
- Rubine H., Ozola S., Eniņa V. (1974) Ārstniecības augu sagatavošana un lietošana. "Zvaigzne": Rīga.
- Saija, A., Princi, P., D'Amico, N., De Pasquale, R., Costa, G. (1990) Effect of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins on triiodothyronine transport into brain in the rat. *Pharmacology Research*, 22, 59–60.

- Saito, N., Tatsuzawa, F., Miyoshi, K., Shigihara, A., Honda, T. (2003) The first isolation of C-glycosylanthocyanin from the flowers of *Tricyrtis formosana*. *Tetrahedron Letters*, 44, 6821–6823.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1094-1117.
- Schuster, B., Herrmann, K. (1985) Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry*, 24, 2761–2764.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A. C. (Eds.). (2007) *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Crc Press.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R. (2006) Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9329–9339.
- Shahidi, F., Chandrasekara, A. (2010) Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 147-170.
- Shahidi, F., Naczki, M. (2003) *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press: London.
- Silva, E. M., Pompeu, D. R., Larondelle, Y., Rogez, H. (2007) Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology. *Separation and Purification Technology*, 53, 274–280.
- Silva, S., Costa, E. M., Pereira, M. F., Costa, M. R., Pintado, M. E. (2013) Evaluation of the antimicrobial activity of aqueous extracts from dry *Vaccinium corymbosum* extracts upon food microorganism. *Food Control*, 34(2), 645-650.
- Simmonds, M. S. J. (2003) Flavonoid-insect interactions: Recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*, 64, 21–30.
- Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., Pereira, C. B. (2004) Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8021-8030.
- Sójka, M., Kołodziejczyk, K., Milala, J. (2013) Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Industrial Crops and Products*, 51, 77-86.
- Stafford, H. A. (1991) Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiology*, 96, 680–685.
- Ștefănuț, M. N., Căta, A., Pop, R., Moșoarcă, C., Zamfir, A. D. (2011) Anthocyanins Hplc-Dad and Ms characterization, total phenolics, and antioxidant activity of some berries extracts. *Analytical Letters*, 44(18), 2843-2855.
- Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., Wrolstad, R. E. (2002) Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6172–6181.
- Strack, D. (1997) *Phenolic metabolism*. In: Dey P.M., Harborne J.B., eds. *Plant Biochemistry*. London, UK: Academic Press, 387–416.
- Strack, D., Wray, V. (1994) *The Anthocyanins*. In *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, Harborne, J. B., Ed., Chapman and Hall: London, chap.1

- Taruscio, T., Barney, D., Exon, J. (2004) Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3169-3176.
- Tekwu, E. M., Pieme, A. C., Beng, V. P. (2012) Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(1), 265-273.
- Tuberoso, C., Rosa, A., Bifulco, E., Melis, M., Atzeri, A. (2010) Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chemistry*, 123(4), 1242-1251.
- Vallverdú-Queralt, A., Boix, N., Piqué, E., Gómez-Catalan, J., Medina-Reimon, A., Sasot, G., Lamuela-Raventos, R. M. (2015) Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *Food Chemistry*, 181, 146-151.
- Vatai, T., Škerget, M., Knez, Ž., Kareth, S., Wehowski, M., Weidner, E. (2008) Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. *The Journal of Supercritical Fluids*, 45(1), 32-36.
- Vattem, D. A., Lin, Y. T., Labbe, R. G., Shetty, K. (2004) Phenolic antioxidant mobilization in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using food grade fungus *Lentinus edodes* and effect on antimicrobial activity against select food borne pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(1), 81-91.
- Vuorela, S., Meyer, A. S., Heinonen, M. (2003) Quantitative analysis of the main phenolics in rapeseed meal and oils processed differently using enzymatic hydrolysis and HPLC. *European Food Research and Technology*, 217(6), 517-523.
- Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 300-312
- Williams, C. A., Grayer, R. J. (2004) Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Report*, 21, 539-573.
- Wrolstad, R.E. (2004) Anthocyanin pigments-bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science*, 69(5), 419-21.
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., Giusti, M. M., Rodriguez-Saona, L. E. (2002) Analysis of anthocyanins in nutraceuticals. *ACS Symposium Series*, 803, 42-62.
- Wu, V. C.-H., Qiu, X., Bushway, A., Harper, L. (2008) Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1834-1841.
- Wu, X., Prior, R. L. (2005) Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2589-2599.
- Xue, H., Aziz, R. M., Sun, N., Cassady, J.M. (2001) Inhibition of cellular transformation by berry extracts. *Carcinogenesis*, 22, 351-356.
- Youdim, K. A., Martin, A., Joseph, J. A. (2000a) Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 51-60.

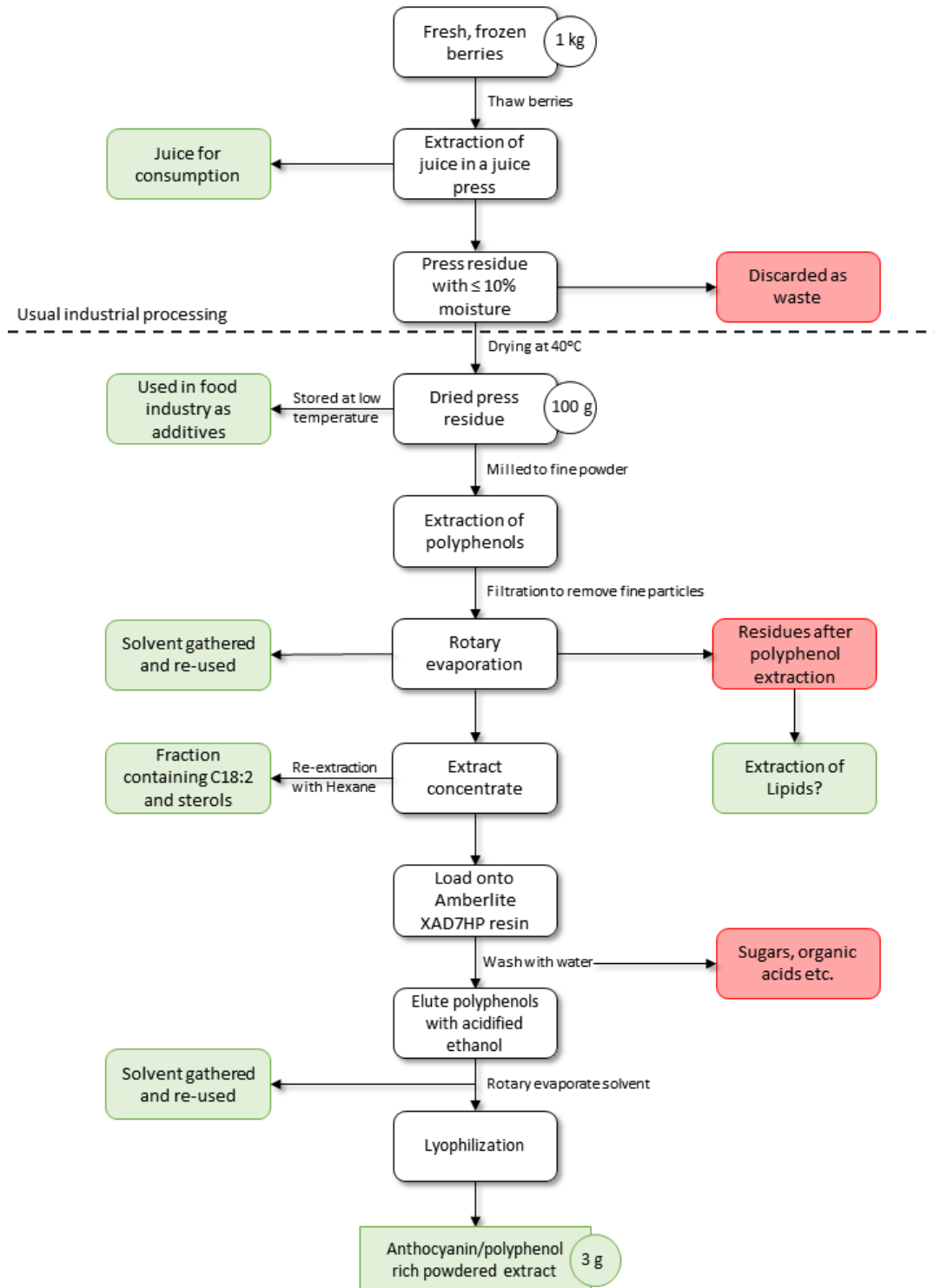
- Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., MacKinnon, S., Kalt, W., Joseph, J. A. (2000b) Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: *In vitro* and *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523, 117–122.
- Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., Singh, P. (2016) Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2223-2230.
- Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A., Bagchi, D. (2007) Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 675-83.

Interneta resursi

- U.S. Highbush Blueberry Council (2017) <http://www.blueberrycouncil.org/>. Skatīts 20.04.2017.
- US Cranberries (2017) <http://www.uscranberries.com/>. Skatīts 20.04.2017.
- NatureGate (2017) <http://www.luontoportti.com/>. Skatīts 20.04.2017.
- Aston Chemicals (2017) <http://www.aston-chemicals.com/>. Skatīts 20.04.2017.
- AgMRC (2017) <http://www.agmrc.org/>. Skatīts 20.04.2017.
- Wildflower center <https://www.wildflower.org/>. Skatīts 20.04.2017.

Pielikumi

1. Pielikums. Izveidotā polifenolu koncentrātu iegūšanas shēma no *Vaccinium ģints* ogu spiedpaliekām.



2. Pielikums. Tabulu un attēlu virsrakstu tulkojumi angļu valodā.

Table 1.1. Investigated berries of *Vaccinium* spp.

Figure 1.1. Classification of polyphenols and examples of substances belonging to flavonoids.

Figure 1.2. The most abundant anthocyanidins in nature, their B-ring substituting groups (containing R₁ and R₂) and their sorption maximum (Giusti and Wrostad, 2003).

Table 2.1. Independent variables used in the optimization of extraction, their real and coded levels according to the response surface methodology.

Table 2.2. An example of central composite design with 3 centre points using two factors at three levels.

Table 3.1. Solvents used for the extraction and their impact on the amount of total polyphenols, anthocyanins, carbohydrates and dry residue (expressed as g/100 g of berry press residues). (±) represents the standard deviation. (a,b,c,d) different letters represent statistically significant differences within the group (ANOVA, Tukey's HSD test, n=3). Concentrations of solvents expressed as v/v %.

Figure 3.1. Influence of extraction solvent (96 % ethanol) acidification on the amount of extracted total polyphenols and anthocyanins (g/100 g American cranberry press residues). Error bars represent standard deviation. (*) represent significantly difference between the results (t-test, p< 0.05, n=3) when compared with 96% ethanol.

Table 3.2. Comparison of the used methods for the extraction of American cranberry press residues. Results expressed as g/100 g berry press residues. (±) represents the standard deviation. (a,b,c,d) different letters represent statistically significant differences within the group (ANOVA, Tukey's HSD test, n=3).

Figure 3.2. Effect of sample treatment time using ultrasound assisted extraction from press residues of American cranberries on the amount of total polyphenols. Error bars represent standard deviation of the measurements, n=3. 40, 70, 96 represent the concentration of ethanol, %.

Figure 3.3. Effect of sample treatment time using ultrasound assisted extraction from press residues of American cranberries on the amount of total anthocyanins. Error bars represent standard deviation of the measurements, n=3. 40, 70, 96 represent the concentration of ethanol, %.

Figure 3.4. The amount of extracted total polyphenols and anthocyanins using ethanol (EtOH) and methanol (MeOH) together with formic acid (v/v, %) depending on the liquid: solid (press residues of American cranberries) ratio. Error bars represent standard deviation. (*) represent significantly difference between the results (t-test, p< 0.05, n=3).

Table 3.3. Coefficients of multiple determination and independent variable p-values of predicted polynomial models for the response of total anthocyanins and polyphenols.

2.1. Pielikums. Tabulu un attēlu virsrakstu tulkojumi angļu valodā.

Figure 3.5. Response surface plots for total polyphenolics as a function of solvent composition and acid concentration.

Figure 3.6. Response surface plots for total anthocyanins as a function of solvent composition and acid concentration.

Table 3.4. Optimized solvent compositions using the response surface plots approach. ^a abbreviation of solvents used in the validation experiments.

Figure 3.7. Validation experiments of the optimal and control extraction conditions identified by the response surface methodology. 2 different types of samples (whole, dried berries and berry press residues) from 5 species of berries were compared using ethanol and methanol as solvents. ** represents statistically significant differences between the optimal and control conditions. * represents significant difference between the types of samples (paired t-test, n=3). Error bars represent standard deviation. Control and optimal conditions can be found in Table 3.4.

Table 3.5. Identification and quantification of anthocyanins found in the optimal extracts of whole berries and berry press residues. delphinidin-3-O-galactoside (D-gal), delphinidin-3-O-glucoside (D-glc), cyanidin-3-O-galactoside (Cy-gal), delphinidin-3-O-arabinoside (D-ara), cyanidin-3-O-glucoside (Cy-glc), petunidin-3-O-galactoside (Pt-gal), cyanidin-3-O-arabinoside (Cy-ara), petunidin-3-O-glucoside (Pt-glc), peonidin-3-O-galactoside (Pe-gal), petunidin-3-O-arabinoside (Pt-ara), peonidin-3-O-glucoside (Pe-glc), malvidin-3-O-galactoside (Mv-gal), peonidin-3-O-arabinoside (Pe-ara), malvidin-3-O-glucoside (Mv-glc), and malvidin-3-O-arabinoside (Mv-ara). Concentration expressed as mg/100 g berry press residues/whole, dried berries. (±) represents the standard deviation of measurements (n=5). “—” represents compounds under the limit of detection. B- methanolic extract of berry press residues. C- methanolic extract of whole, dried berries.

Table 3.6. Composition of found anthocyanins in the optimal extracts expressed as percentage (name of the compounds can be found in the caption of Table 3.5.). Green cells represent the 3 anthocyanins found in the highest concentration in each extract. “—” represents compounds under the limit of detection. B- methanolic extract of berry press residues. C- methanolic extract of whole, dried berries.

Table 3.7. Amount of extract that can be produced from 100 g of berry press residues using Amberlite XAD7- HP sorbent. (±) represents the standard deviation of measurements (n=3).

Table 3.8. Recovery of polyphenols after the XAD7-HP sorption chromatography. (±) represents the standard deviation of measurements (n=3).

Table 3.9. Summary parameters of prepared polyphenolic concentrate. (±) represents the standard deviation of measurements (n=3).

2.1. Pielikums. Tabulu un attēlu virsrakstu tulkojumi angļu valodā.

Table 3.10. Radical scavenging properties of prepared polyphenolic concentrate determined using FRAP, ABTS and DPPH methods. (\pm) represents the standard deviation of measurements (n=3). * represents significant difference between the measurements and the control sample (Vitamin C). Green- highest radical scavenging activity, yellow- 2nd highest, orange- 3rd highest.

Table 3.11. Identification and quantification of anthocyanins found in the polyphenolic concentrates in mg/g of polyphenolic concentrate. (\pm) represents the standard deviation of measurements (n=5). “—” represents compounds under the limit of detection. RT- retention time. Green cells represent the 3 anthocyanins found in the highest concentration in each concentrate.

Figure 3.8. Chromatograms of berry polyphenolic concentrates measured at 520 nm. Peak numbers represent the identified anthocyanins (Tables 3.5., 3.6., 3.11.). A- American cranberry, B-bilberry, C- blueberry, D- bog cranberry, E- lingonberry.

Table 3.12. Identification and quantification ($\mu\text{g/g}$) of polyphenols found in the polyphenolic concentrates. The error of quantification was determined to be up to 5%. ND- concentration was lower than the limit of detection (5 μg).

Figure 3.9. Principal component analysis (PCA) of chromatographic quantification data.

Figure 3.10. Cluster analysis of quantified compounds grouped by the analysed extract. Compounds 1 through 37 can be found in Tables 3.11. and 3.12.

Figure 3.11. Berry polyphenolic concentrate effect on the proliferation of dermal fibroblasts. S10 medium used as a control without added extract or solvent. Error bars represent standard deviation. All used extracts were prepared in the concentration of 20 mg/mL and diluted in S10 medium.

Table 3.13. *in vitro* antiradical scavenging properties of polyphenolic concentrates determined by cell cytometry. * represents significantly different result when compared with standard antioxidant- Vitamin C (t-test, $p < 0.05$).

Figure 3.12. The measured diameter of the inhibition zones using Agar diffusion method depending on the used polyphenolic concentrate (15 mg/mL in 50% ethanol) and bacterial species.

Table 3.14. Measured Inhibition zones (mm) using agar diffusion method depending on the used extract (15 mg/mL in 50% ethanol) and bacterial species.

Table 3.15. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of polyphenolic concentrates, mg/mL.

Dokumentārā lapa

Maģistra darbs "Polifenoliem bagātu ekstraktu iegūšana no *Vaccinium* ģints ogu spiedpaliekām, to izpēte un bioloģiskās aktivitātes raksturošana".

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

Autors: Linards Kļaviņš

Paraksts

Datums

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai.

Vadītāja: Asoc. prof. Dr. biol. Vizma Nikolajeva

Paraksts

Datums

Recenzents: Prof., Dr. habil. biol. Indriķis Muižnieks

Paraksts

Datums

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē

Lietvede: Diāna Marcinkēviča

Paraksts

Datums

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijās sēdē:

_____ protokola nr. _____

Datums

Vērtējums

Komisijas sekretārs: _____

Paraksts

Datums