

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**BIOLOĢISKI AKTĪVO VIELU IZVĒRTĒJUMS UN
SALĪDZINĀJUMS *SPIRULĪNAS* SATUROŠOS
FARMACEITISKAJOS PRODUKTOS**

MAGISTRA DARBS

Darba autore: **Zita Freiberga**

Stud. Apl. Nr. zf10003

Darba vadītāja: docente, Dr. Chem. Ilva Nakurte

RĪGA

2018

KOPSAVILKUMS

Bioloģiski aktīvo vielu izvērtējums un salīdzinājums *spirulīnas* saturošos farmaceitiskajos produktos. Freiberga, Z., darba vadītāja: docente, Dr. Chem Ilva Nakurte. Maģistra darbs, 75 lappuses, 35 attēli, 20 tabulas, 129 literatūras avoti. Latviešu valodā.

Maģistra darbā tika apkopota informācija par spirulīnu, tās ķīmisko sastāvu, analīzes metodēm un farmakoloģisko iedarbību. Darbā izvērtēts spirulīnas ķīmiskais sastāvs Latvijā pieejamos uztura bagātinātājos un savstarpēji salīdzināta to antiradikālā aktivitāte, kopējais fenolo savienojumu un dzelzs jonu daudzums, kā arī aminoskābju, pigmentu un lipīdu saturs. Iegūtie rezultāti apstiprina maģistra darbā izvirzīto hipotēzi, ka spirulīnas saturošo, patērētājam pieejamo, uztura bagātinātāju sastāvs savā starpā atšķiras.

SPIRULĪNA, ĶĪMISKAIS SASTĀVS, FARMAKOĻĢISKĀ IEDARBĪBA,
AMINOSKĀBES, FENOLIE SAVIENOJUMI, DZELZS JONI, ANTIRADIKĀLĀ
AKTIVITĀTE, AEŠH/MS

ABSTRACT

Evaluation and comparison of biologically active substances in *spirulina*-containing pharmaceutical products. Freiberga, Z., assistant professor, Dr. chem. Ilva Nakurte. Master thesis, 75 pages, 35 figures, 20 tables, 129 literature references. In Latvian.

In the master thesis various sources of literature about spirulina, its chemical composition, analytical methods, and pharmacological effects were summarized. In the practical part of this thesis the chemical composition of spirulina, their antiradical activity, total amount of phenolic compounds, content of iron ions, amino acids, pigments and lipids in nutritional supplements available in Latvia were evaluated. The obtained results confirm the hypothesis of the master's thesis that the composition of spirulina containing dietary supplements varies among themselves.

SPIRULINA, CHEMICAL COMPOSITION, PHARMACOLOGICAL EFFECTS, AMINO ACIDS, PHENOLIC COMPOUNDS, IRON IONS, ANTIRADICAL ACTIVITY, HPLC/MS

SATURA RĀDĪTĀJS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	6
IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	9
1.1. Spirulīna	9
1.1.1. Morfoloģiskās īpašības	9
1.1.2. Attīstības vēsture	10
1.1.3. Izplatība dabā.....	11
1.2. Spirulīnas izmantošana.....	11
1.3. Spirulīnas ķīmiskais sastāvs	11
1.3.1. Lipīdi	12
1.3.2. Olbaltumvielas un aminoskābes	16
1.3.3. Ogļhidrāti.....	18
1.3.4. Citi ķīmiskie savienojumi.....	21
1.4. Spirulīnas farmakoloģiskie efekti un izmantošana.....	25
1.5. Spirulīnā esošo ķīmisko savienojumu analīžu metodes	28
1.5.1. Fenolo savienojumu noteikšana	28
1.5.2. Taukskābju noteikšana	30
1.5.3. Aminoskābju noteikšana.....	31
1.5.4. Ogļhidrātu noteikšana.....	33
1.5.5. Pigmentu noteikšana.....	34
1.5.6. Fikocianīnu noteikšana	35
1.5.7. Antiradikālā aktivitāte	39
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	41
2.1. Darbā analizēto paraugu raksturojums	41
2.2. Paraugu sagatavošana.....	42
2.3. Izmantotās laboratorijas iekārtas un piederumi	42
2.4. Izmantotie reaģenti	43
2.5. Spektrofotometriskā kopējo fenolo savienojumu noteikšana spirulīnas ekstraktos ...	45
2.6. Spirulīnas ekstraktu antiradikālās aktivitātes noteikšana	46
2.7. Fe (III) un (II) jonu noteikšana spirulīnas paraugos	48
2.8. Spirulīnas ekstraktu ķīmiskā sastāva noteikšana, izmantojot AEŠH/MS	50
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	52
3.1. Spektrofotometriskā kopējo fenolo savienojumu noteikšana spirulīnas ekstraktos ...	52

3.2. Spirulīnas ekstraktu antiradikālās aktivitātes noteikšana	54
3.3. Fe (III) un (II) jonu noteikšana spirulīnas paraugos	56
3.4. Pigmenta fikocianīna noteikšana spirulīnas ekstraktos	60
3.5. Spirulīnas ekstraktu ķīmiskā sastāva noteikšana, izmantojot AEŠH/MS	61
3.6. Pētījumā izmantoto produktu savstarpējs salīdzinājums	71
SECINĀJUMI	75
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	77

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

GLA – gamma – linolēnskābe

DGLA – dihomogammas linolēnskābe

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss

AIDS – iegūts imūndeficīta sindroms

PCB – fikocianobilīns

PHB – polihidroksisviestskābe

IL-1 β – interleikīns 1 beta

TNF- α – audzēja nekrozes faktors alfa

NF-K β – kodola faktors

IFN γ – interferons gamma

AEŠH – augsti efektīva šķidrums hromatogrāfija

UV – ultravioletie stari

APCI – atmosfēras spiediena ķīmiskā jonizācija

MS – masspektrometrija

ARA – antiradikālā aktivitāte

DFPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazils

ABTS - 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolīn-6-sulfonāta)

FRAP - *the ferric reducing ability of plasma*

GSE – gallusskābes ekvivalents

TE – troloksa ekvivalents

ESI+ - Elektronu izsmidzināšana pozitīvajā režīmā

BPC – *base peak chromatogram*

IEVADS

Rietumu cilvēku uzturs, arī Latvijā, lielākoties nesatur vienu no vērtīgākajām un uzturvielām bagātākajām komponentēm – jūras aļģēm - viensūnas mikroaļģes, kurām nepieciešams svaigs ūdens un saule. Ir vairāk nekā četrdesmit tūkstoši dažādu aļģu, bet ir viena, kas ļoti izceļas, kā īpaši bagāta ar vērtīgajām uzturvielām – tā ir *spirulīna*. Pēdējos desmit gadus *spirulīnas*, kā produkta, pārtikas piedevas vai izejvielas, popularitāte ir strauji pieaugusi. Pateicoties tehnoloģiju attīstībai, mediju pasaulei, pārtikas piedevu un uztura bagātinātāju ienākšanai tirgū, patērētāji to ievēro arvien vairāk.

Šī produkta ražošanā izmantotie apjomi un izmaksas nepārtraukti aug, to patērīnš pa pasaulē ik gadu pieaug gandrīz par 30%. Gan ANO Pārtikas un lauksaimniecības organizācija, gan Pasaules veselības organizācija ir atzinušas spirulīnu par augstvērtīgu produktu [1].

Mēdiju pasaulē *spirulīna* tiek atspoguļota kā 21.gadsimta superprodukts un to saturoši uztura bagātinātāji kā brīnumlīdzekļi. Zināms, ka dabiski audzēta *spirulīna* veselību ietekmē labvēlīgi, bet to nevar teikt un apgalvot par pilnīgi visu ražotāju izgatavotajiem uztura bagātinātājiem, kas satur šo aļģi, kuras izcelsme bieži vien nav skaidri nodefinēta. *Spirulīnas* galvenā sastāvdaļa ir ļoti kvalitatīvs olbaltums, taču tā koncentrēti satur arī daudzus citus svarīgus vitamīnus un minerālvielas. Tāpat tai piedēvē daudz farmakoloģisko un bioloģisko efektu. Tomēr nevar viennozīmīgi apgalvot, ka uztura bagātinātāji ar *spirulīnu* būtu kas īpaši uzteicams. Pasaulē ir iekārtots, ka ne viss, kas ir dabiski pieejams ar lielu potenciālu un bioloģisko aktivitāti, var dot tikpat lielu labumu izstrādāts kā uztura bagātinātājs vai zāles. Ja cilvēka uzturs ir daudzveidīgs un sabalansēts, uztura bagātinātāji, tajā skaitā arī *spirulīna*, papildus nemaz nebūtu jālieto. Kā zināms, šī aļģe neaug mūsu platuma grādos, tāpēc mēs to ikdienas uzturā neiekļaujam.

Latvijā drīkst izplatīt tikai Pārtikas un veterinārā dienestā reģistrētus uztura bagātinātājus. Bet to reģistrācijas kārtība nav sarežģīta un to regulē vien Ministru Kabineta noteikumi Nr. 685 un Nr. 725. To reģistrācijai neprasa nekāda satura un veida klīniskos pētījumus un ziņojumus par drošības jautājumiem. Nav arī zināms, vai uztura bagātinātāja ražošanā vienmēr izmanto dabiskos apstākļos augušu aļģi. Nav arī klīniski izpētīts, kā tā, esot uztura bagātinātāja sastāvā, iedarbojas uz mūsu veselību. Neviena no uzraugošajām institūcijām neprasa uztura bagātinātāja farmakokinētiskos vai farmakodinamiskos rādītājus, to kvalitatīvu un kvantitatīvu ķīmiskā sastāva izvērtējumu. Tādējādi, lietojot uztura bagātinātājus ar spirulīnu, kā papildus ikdienas uzturam, uzņemtās uzturvielas, iespējams, var ievērojami atšķirties [2][3].

Pamatojoties uz šo, tika izvirzīti **maģistra darba mērķi** - veikt *spirulīnas* ķīmiskā sastāva noteikšanu un novērtējumu, un savstarpēji salīdzināt dažādu ražotāju un dažādās formās ražotus, Latvijā pieejamus *spirulīnas* saturošus uztura bagātinātājus.

Mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi **uzdevumi**:

- izpētīt un apkopot literatūru par *spirulīnas* ķīmisko sastāvu, analīzes metodēm un farmakoloģisko iedarbību;
- veikt ķīmiskā sastāva analīzi un savstarpēji salīdzināt piecus Latvijā nopērkamus dažādu ražotāju *spirulīnas* saturošus uztura bagātinātājus;
- noteikt pētāmo *spirulīnas* paraugu kopējo fenolo savienojumu daudzumu, antiradikālo aktivitāti, dzelzs jonu daudzumu, aminoskābju daudzumu un identificēt citus bioloģiski aktīvos savienojumus.

Maģistra darbā iegūtie rezultāti tiks publiskoti vietējā medicīnas žurnālā *Materia Medica*.

Maģistra darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes Fizikālās ķīmijas katedrā, Hromatogrāfijas un Masspektrometrijas laboratorijā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. *Spirulīna*

Spirulīna – tā ir mikroskopiska zilgan-zaļa aļģe, barības ķēdes pamatdaļa. Pats vārds *spirulīna* galvenokārt attiecas uz ciānbaktērijas *Arthrospira platensis* sauso biomasu. Un to lieto, lai aprakstītu galvenokārt divas ciānbaktēriju sugas: *A. platensis* un *A. Maxima*. Šīs sugas *spirulīns* arī pārsvarā tiek lietots pārtikā un uztura bagātinātājos.

Zinātnieku domas stipri dalās par atšķirībām starp *spirulīnu* un *arthrospira* ģintīm un to savstarpēju iedalījumu. Geitler savā klasifikācijā 1932. gadā šīs un vēl citas *Arthrospira* sugas sakombinēja vienā ģintī – *spirulīna* – sugas, kas spēj veidot spirālveida pavedienus, neskatoties uz starpsienas esamību vai neesamību šūnā. Līdz tam dominēja cits sadalījums. 1892. gadā Gomonta klasifikācijā šīs sugas vēl sadalīja divās ģimenēs, pamatojoties uz šķērssieniņas veidošanos. *Spirulīna* sugas ir bez šīs sieniņas, bet *Arthrospira* – ar. Pētījumi par morfoloģiju, fizioloģiju un bioķīmiju skaidri parādīja, ka šīs sugas stipri atšķiras savā starpā. Mūsdienās ar *spirulīnu* mēs saprotam *Arthrospira* sugas baktērijas.

Tās pieder pie skābekļa fotosintēzes baktērijām. Līdz 1962. gadam šīs baktērijas sauca par aļģēm. Un tikai pēc tam šīs aļģes klasificēja pie prokariotiem un pārdēvēja par ciānbaktērijām.

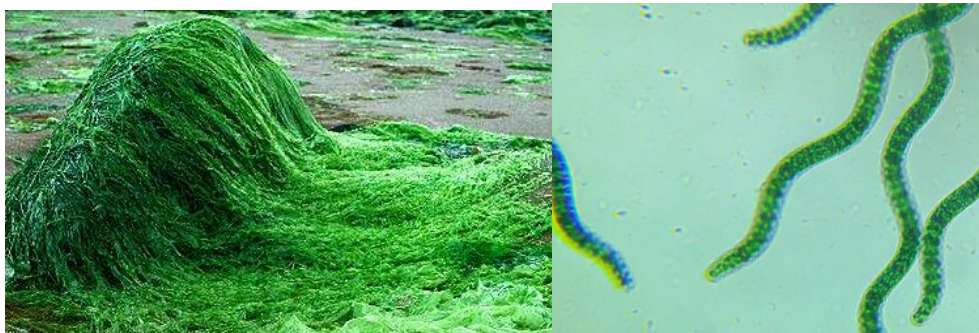
Jāuzsver, ka vārds *spirulīna* tiek plaši lietots kā tirdzniecības un mārketinga nosaukums. *Spirulīna* un *Arthrospira* savstarpēji tiek saistīti, un pieņemot, ka visas “komerciālās audzēšanas” formas, kas tiek pārdots kā *spirulīna*, faktiski pieder pie ģints *Arthrospira* [4].

1.1.1. Morfoloģiskās īpašības

Šīm sugām raksturīgi brīvi peldoši, dažāda veida pavedieni, kurus raksturo cilindriskas un daudzšūnainas, matiem līdzīgas struktūras (skatīt 1.1. attēlā).

Arthrospira sugas morfoloģijā izceļas ar lielu plastiskumu. Kas lielākoties ir tādu vides apstākļu, kā temperatūras, ķīmisko un fizikālo faktoru, un arī ģenētisko izmaiņu dēļ. Dabā un šūnu kultūrās šīs sugas veido spirālveida pavedienus. Dažāda izmēra trīskāršošanās, no cieši savītas līdz pat taisnai morfoloģijai. Šūnas ir drīzāk platas nekā garas. To platums var variēt no 3-12 μm. Lai gan var sasniegt arī 16 μm. Šūnu organizācija ir tipiska prokariotiem, bet bez membrānu saistītām organellām. Šīm sugām parādās šķērseniska sieniņa, ko var novērot zem

gaismas mikroskopa. Tās var būt stieņa vai diska formas. *Spirulīnas* pavedieni ir cilindriski, daudzslāņaini, pastāv atvērtā, kreisās puses helikoīdu formā [5].



1.1. att. *Spirulina plantensis* dabā un zem mikroskopa [6]

Spirulīna spēj augt ūdenī ar ļoti augstu pH, tā labi jūtas vidē, kuras pH ir ap 8,5, un pat vēl sāļākos ūdeņos, un temperatūrā ap 30⁰ C (86⁰ F). Tās ir unikālas ar to, ka ir neatkarīgas. Tās pašas spēj sagādāt sev barības vielas un nav atkarīgas no dzīvās enerģijas vai organiskā oglekļa klātbūtnes. *Spirulīnai* nav šūnu sienas, kodola membrānas un iekšējās organellas.

Tādi vides faktori kā temperatūra, gaismas intensitāte un nitrātu koncentrācija ietekmē aļģu morfoloģiju. Jo uzņēmīgāka aļģe ir pret vides radīto stresu, jo tās augšanas ātrums samazinās. Lai gan 35⁰ C temperatūrā sausas biomasas produkcija ir ar negatīvu virzību, proteīnu, lipīdu un fenolo savienojumu produkcija ir augstāka tieši šajā temperatūrā salīdzinot ar 30⁰ C [7]. Šūnu formu un proteīnu sastāvu šūnu sienās ietekmē apkārtējā vidē esošais skābeklis, oglekļa dioksīds, gaismas intensitāte un uzturvielu biopieejamība [8].

Spirulīna ir fotosintētisks, tāpēc autotrofisks organisms. Tā vairojas binārās sadalīšanas rezultātā un raksturojas ar to, ka spēj augt gan fotoautotrofi, gan heterotrofi, gan miksotrofi [9].

1.1.2. Attīstības vēsture

Tiek uzskatīts, ka zilaļģes ir attīstījušās pirms 3,5 miljardiem gadu. *Spirulīna* (*Arthrospira*) ir zilaļģes jeb šķiedru un pavedienu veida prokarioti - ciānbaktērijas. Tās savu nosaukumu ir iemantojušas, pateicoties to spējai veidot spirālveida pavedienus. *Spirulīnas* ģintī ir vismaz 38 sugas, un tās pieder pie *oscillatoriaceae*, *phylum cyanophyta* ģimenes [5].

Ciānbaktērijas bija pirmās baktērijas, kas spēja oglekļa dioksīdu pārvērst organiskā oglekļa savienojumos, kā elektronu donoru izmantojot ūdens molekulas, tādējādi izdalot brīvu skābekli. *Spirulīnas* lietošanai uzturā ir sena vēsture. Dažos ziņojumos minēts, ka to jau

pazina un lietoja Acteku civilizācijas laikā. Leģenda vēsta, ka sešpadsmitajā gadsimtā, kad spāņu iebrucēji uzvarēja Meksiku, viņi atklāja Acteku civilizāciju, kas apdzīvoja Meksikas ielejas galvaspilsētu Tenohtitlānu (Tenochtitlan). Viņi novēroja, ka zvejnieki ar ļoti smalkiem tīkliem no jūras ceļ ārā zilzaļu masu, no kuras pēc tam gatavoja ēdienu. Viņi to nosauca par “jauno ēdienu”. Cita leģenda vēsta, ka Acteku skrējēji ir uzņēmuši šo “jauno ēdienu”, lai vairotu enerģiju. Mūsdienās *Texcoco* ezers ir dzīvo aļģu populācijas vieta pašreizējā Čadas Republikā, Āfrikas centrālajā daļā. Senie ziņojumi vēsta, ka turienes iedzīvotāji, kā pārtikas produktu lietoja zilas aļģes [4].

1.1.3. Izplatība dabā

Spirulīnas aļģes dabiski ir sastopamas tropu un subtropu ezeru ūdeņos ar augstu pH līmeni, kā arī ar augstu karbonātu un bikarbonātu koncentrāciju. *Arthrospira* ģints sugas ir izolētas no sārmu iesāļajiem un sāļajiem ūdeņiem tropu un subtropu reģionos, un to pirmo reizi izolēja 1827. gadā [10]. Starp dažādajām sugām, kas iekļautas *Arthrospira* ģintī, *A. platensis* ir visplašāk izplatītā un galvenokārt atrodama Āfrikas un Āzijas ūdeņos, retāk arī Dienvidamerikā. Bet *Arthrospira maxima* atrodas Centrālamerikas, Kalifornijas un Meksikas ūdeņos [4].

1.2. *Spirulīnas* izmantošana

Arthrospira baktērijas audzē visā pasaulē, to lieto gan kā uztura bagātinātāju, gan kā pārtiku, un tas ir pieejams gan tablešu, pārsļu, gan pulvera formā. To izmanto arī kā barības piedevu akvakultūrās, akvārijā un mājputnu nozarē.

Šīs aļģes ir nozīmīgas cilvēka fizioloģijā, un jau gadiem tās tiek lietotas kā proteīnu un vitamīnu avots. Ap 1970. gadu sākās pirmie pētījumi par *spirulīnas* izmantošanu rūpnieciskiem un farmaceitiskiem mērķiem. Mūsdienu *spirulīnas* lielākie komerciālie ražotāji atrodas Amerikas Savienotajās Valstīs, Taizemē, Indijā, Taivānā, Ķīnā, Bangladešā, Pakistānā, Birmā (Mjanmā), Grieķijā un Čīlē [11][12].

1.3. *Spirulīnas* ķīmiskais sastāvs

Spirulīna pati par sevi ir bagāta ar vērtīgām uzturvielām, piemēram, proteīniem, hlorofilu, karotenoīdiem, minerāliem, vitamīniem, garo ķēžu polinepiesātinātām taukskābēm. Kā, piemēram, omega 3 un omega 6 taukskābes, kuras farmakoloģiski ir ļoti nozīmīgas.

1.3.1. Lipīdi

Spirulina platensis un *spirulina maxima* baktēriju sugās lipīdu daudzums variē no 5,6 līdz 7%. Izmantojot praktiskākas un labākas ekstrakcijas metodes, to daudzums var pat palielināties. Apmēram 50% no kopējiem lipīdiem ir taukskābes (skatīt 1.1. tabulu). Taukskābju analīzes parāda augstu polinepiesātināto taukskābju daudzumu, kuru daudzums var sasniegt līdz pat 2% no kopējā sastāva [13]. Šīs aļģes ir bagātas ar palmitīnskābi, linolskābi un linolēnskābi [14].

1.1. tabula

Taukskābju saturs, %, *spirulīnas aļģēs*

Taukskābe	Spirulina plantesis bio-organiskā	Spirulina plantesis1	Spirulina plantesis2	Spirulina maxima	Spirulina spacifica, organiskā
Sviestskābe	0,12	-	-	0,57	1,01
Kapronskābe	0,28	-	-	0,65	0,95
Kaprīliskābe	3,73	3,72	3,65	4,00	3,81
Nodekānskābe	0,58	1,06	1,57	0,68	0,91
Nodekēnskābe	0,89	1,65	1,36	1,07	1,08
Laurīnskābe	0,49	0,84	1,70	0,52	-
Laurēnskābe	0,39	-	-	0,52	-
Tridekānskābe	0,86	0,72	-	0,95	0,92
Miristīnskābe	0,23	-	-	-	-
Pentadekānskābe	1,53	0,70	-	1,05	1,10
Pentadecēnskābe	3,16	1,26	1,46	3,15	2,90
Palmitīnskābe	46,07	42,30	43,65	35,82	35,34
Palmitooleīnskābe	1,26	1,00	1,50	0,85	1,20
Hekšadekāndiēnskābe	3,38	2,43	2,71	4,61	4,06
Hekšadekāntriēnskābe	0,14	-	-	-	-
Heptadekānskābe	0,27	0,45	-	-	-
Stearīnskābe	1,41	0,95	1,39	1,49	1,47
Oleīnskābe	5,23	1,97	2,05	5,03	4,51
Linolskābe	17,43	16,18	17,19	16,34	16,87

Gamma linolēnskābe (GLA)	8,87	20,06	21,73	18,16	17,49
Arahīnskābe	0,16	0,94	-	0,59	1,01
Dihomollinolēnskābe	-	-	-	0,66	1,39
Eikozānpentaēnskābe	0,19	-	-	-	-
Dokozaēnskābe	-	-	-	-	1,39
Tetrakozānskābe	0,15	0,90	-	0,58	-
Citas	2,91	2,97	0,04	2,09	2,59

Kopumā īsās ķēdes (4-18) piesātināto taukskābju saturs *Spirulina plantesis* – bio-organic ir 55,57 %, *Spirulina plantesis*¹ – 51,35 %, *Spirulina maxima* 45,73 %, *Spirulina pacifica* 45,51 %. Garās ķēdes piesātinātās taukskābes attiecīgi 0,15, 0,90, 0,58 %. *Spirulina pacifica* nesatur garo ķēžu piesātinātās taukskābes. Nepiesātināto taukskābju saturs kopumā attiecīgi ir 41,37, 46,70 51,60 un 51,90 % [15].

Galvenie lipīdi, kas atrasti šajās baktērijās, ir monogalaktozildiacylglicerols, sulfokvinovsildiacylglicerols, fosfatidilglicerols, kuru saturs veido aptuveni 20–25%. Digalaktosildiacylglicerols saturs variē no 7-9%, kamēr triglicerīdus saturs sastāda mazāko daļu, apmēram 1–2% [16][17].

Palmitīnskābe

Palmitīnskābe tiek uzskatīta par plašāk izplatīto un atrasto piesātināto taukskābi dzīvniekos, cilvēkos un mikroorganismos. Tā satur 16 oglekļa atomus virknē un dabiskā veidā ir sastopama sviestā, pienā, sierā, sojas pupās un gaļā, kā arī augu eļļās.

Pārmērīgu ogļhidrātu daudzumu organisms pārvērš palmitīnskābē un tā kalpo kā prekursors taukskābju sintēzē ar garāku ogļūdeņražu virkni. Cilvēka organisms satur līdz pat 30% palmitīnskābes. Mātes pienā ir sastopams vislielākais palmitīnskābes daudzums.

Palmitīnskābei pašai par sevi nav pozitīvu efektu uz organismu. Palmitīnskābei ir negatīva ietekme uz kardiovaskulāro sistēmu. Ziņojumos tiek minēts, ka tā paaugstina zema blīvuma holesterīna līmeni un tādējādi bojā asinsvadus. Kā arī tā ietekmē insulīna aktivitāti centrālās nervu sistēmas līmenī. Proti, hipotalamā tā nomāc insulīna aktivitāti caur proteīnkināžu ceļu MARCK, kas savukārt, regulē glikozes sintēzi aknās, ēdiena uzņemšanu

un ķermeņa svaru. Jeb, citiem vārdiem sakot, palmitīnskābe izraisa insulīna rezistenci [18][19].

Lai gan varētu domāt, ka palmitīnskābei piemīt nelabvēlīga ietekme uz organismu, tā tomēr ir vitāli svarīga taukskābe. Tā ir ļoti svarīga sastāvdaļa šūnu membrānās, transporta un sekretoriskiem lipīdiem, audu lipīdiem [20].

Gamma-linolēnskābe

Gamma-linolēnskābe (GLA) tiek saukta arī par omega 6 taukskābi. Medicīnas literatūrā visbiežāk tiek lietots tieši šis nosaukums. Tā ir karbonskābe ar 18 oglekļa atomu garu virkni, kas satur 3 cis-dubultsaites. Ķīmiskais nosaukums ir cis-6, cis-9, cis-12 oktadekatriēnskābe. Tas ir alfa linolēnskābes (omega 3) izomērs, kas atrodama rapšos, un tā eļļā, sojas pupās, valriekstos, linu sēklās (arī linsēklu eļļā), čijā un kaņepju sēklās.

Tā tiek ražota organismā kā starpprodukts linolskābes metabolismā ar fermenta delta-6-desaturāzes palīdzību. Pati reakcija kā tāda ir ļoti lēna un vēl papildus to ierobežo vitamīnu un minerālvielu, kā, piemēram, cinka un kobalta trūkums organismā. Arī iekaisuma slimības, kā piemēram, artrīts un psoriāze ietekmē šo reakciju. Hipertensijas, diabēta pacientiem ir šīs tauksābes trūkums organismā, jo fermenti nestrādā pareizi. Arī dzīvesveids, kā paaugstināts stress, alkohols un smēķēšana samazina fermenta aktivitāti.

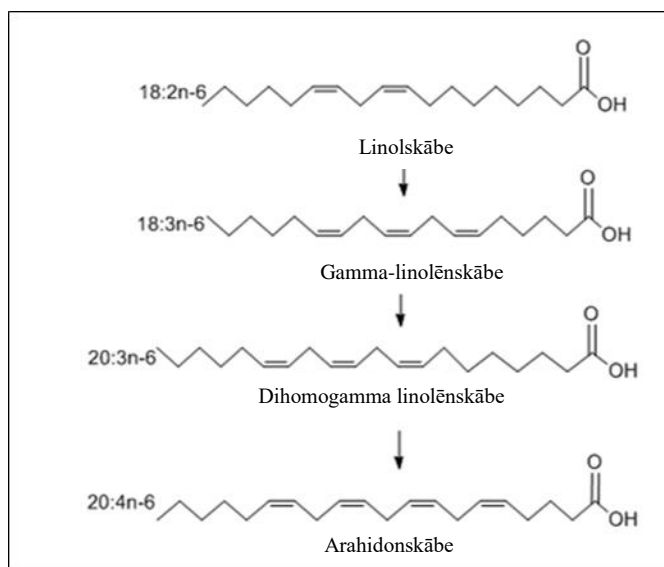
Pēc uzņemšanas GLA tiek strauji pārveidota par dihomogammas linolēnskābi (DGLA), kura ir taukskābes aktīvā forma un mediē lielāko daļu GLA fizioloģiskās aktivitātes. DGLA tūlīt tiek iekļauta šūnu membrānas fosfolipīdos pēc acilēšanas reakcijas. Pēc fosfolipāzes A iedarbības DGLA atbrīvojas un iedarbojas uz fermentiem ciklooksigenāzi un lipooksigenāzi, nomācot gan iekaisuma šūnas neitrofilu darbību, gan leukotriēna B4 iekaisuma aktivitāti. Caur ciklooksigenāžu ceļu nepiesātinātā taukskābe regulē pretiekaisuma aktivitāti [21][22]. Pateicoties tās pretiekaisuma aktivitātei, GLA uzlabo ādas struktūru un barjeras funkciju [23].

Plaši tiek runāts arī par pretaudzēja aktivitāti. Vairāki ziņojumi ziņo par GLA spēju nogalināt audzēja šūnas un tās izvadīt no organisma. Un pats svarīgākais, ka tā neietekmē normālas organisma šūnas. Pretaudzēja aktivitāte iespējama caur diviem ceļiem. Taukskābe uzlabo lipīdu peroksidāžu veidošanos un, caur ciklooksigenāžu ceļu, inhibē iekaisuma šūnas. Novērš ļaundabīgo šūnu augšanu, proliferāciju un iniciē apoptozi. Dažādo audzēju jutīgums mainās attiecīgi no tā izcelsmes un apkārtējiem audiem [24][25][26].

Apkopojot datus no randomizētiem klīniskiem pētījumiem, ir iegūta sakarība starp DGLA koncentrāciju un sirds slimībām. Cilvēkiem ar samazinātu tā koncentrāciju ir lielāks risks saslimt ar sirds un asinssvadu slimībām, īpaši ar sirds mazspēju [27].

Linolskābe

Linolskābe ir tā pati omega 6 taukskābe tikai ar divām cis dubultsaitēm, pie 9. un 12. oglekļa atoma. Tā pieder pie neizstājamām polinepiesātinātām taukskābēm, kuras organisms pats nespēj sintezēt, tāpēc tās ir jāņem ar uzturu. Linolskābe organismā tālāk tiek pārvērsta par GLA (skatīt 1.2. attēlā) [28].



1.2. att. Linolskābes pārvērtības organismā [28]

Sulfolipīdi

Sulfolipīdi, tāpat kā glikolipīdi un fosfolipīdi atrodas visās augu, aļģu un baktēriju membrānās. Tomēr to daudzums var sasniegt līdz pat 29% no visiem lipīdiem, tādēļ, tie tiek uzskatīti par dominējošo komponenti gan prokariotu, gan eikariotu organismos. Fizioloģiski sulfolipīdi nodrošina membrānas struktūru un funkcijas. To bioloģiskā darbība ietver: inhibējošu iedarbību uz DNS polimerāzi un atgriezeniskās vīrusu transkriptāzi, šūnu augšanu un attīstību, kā arī pretvēža un pretiekaisuma darbību. Pēdējo 20 gadu laikā sulfolipīdi uzrāda efektivitāti cīņā ar HIV vīrusu (EC₅₀ 0,1–1 μg/ml) un tie var būt arī klīniski noderīgi AIDS ārstēšanā. Tomēr līdz šim nav pilnīgi skaidrs anti-HIV aktivitātes mehānisms [29]. *Spirulīna*, tāpat kā citas aļģes, satur sulfolipīdus ar pretvīrusu darbību. Izvēloties pareizus ekstrakcijas šķīdinātājus, to ekstrakti var būt kā alternatīva pieeja HIV ārstēšanai. *Sulphoquinovosyl diacylglycerol*, sulfolipīda savienojums, kurš izolēts no *Sp. Maxima* uzrāda ievērojamu pretvīrusu aktivitāti ar IC₅₀ vērtību 6,8 μg/ml [30].

1.3.2. Olbaltumvielas un aminoskābes

Spirulīna ir pilnvērtīgs un kvalitatīvs proteīnu avots, jo tā satur dzīvībai un organisma uzturēšanai nepieciešamās olbaltumvielas. Olbaltumvielas ir vitāli nepieciešamas dzīvo organismu vielas, jo nodrošina organisma pareizu funkcionēšanu. Ķermenis tās izmanto, lai atjaunotu muskuļus un audus pēc lielām slodzēm. Proteīni ir neatņemama kaulu, skrimšļu, asiņu un ādas sastāvdaļa [31].

Spirulīna satur aptuveni 60-70% proteīnu, nukleīnskābju un aminoskābju. Svarīgākās aminoskābes, ko satur *spirulīna*, ir izoleicīns, leicīns, lizīns, metionīns, fenilalanīns, treonīns, triptofāns un valīns, bet var būt arī citas (skatīt 1.2. tabulu) [32]. *Spirulina plantesis* ir visbagātākais proteīnu avots no visiem mikroorganismiem. Kopējais proteīnu saturs variē no 4600 līdz 6300 g uz 1 kg aļģu sausās biomasas [33].

1.2. tabula

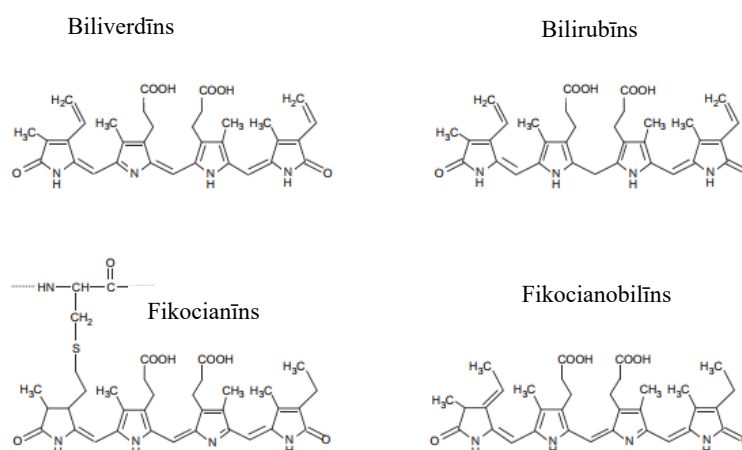
Aminoskābju daudzums *Spirulīnas* aļģēs [34]

Aminoskābe	Daudzums g kg ⁻¹	Proteīnu ekstrakts g kg ⁻¹
Lizīns	51,0 ± 6,2	53,9 ± 0,1
Leicīns	70,2 ± 0,2	80,2 ± 0,2
Izoleicīns	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Valīns	28,6 ± 0,2	36,6 ± 1,5
Treonīns	61,6 ± 1,0	55,4 ± 0,4
Histidīns	9,0 ± 0,1	7,3 ± 0,1
Triptofāns	12,2 ± 0,1	10,7 ± 0,1
Fenilalanīns	48,2 ± 0,4	42,6 ± 0,1
Tirozīns	48,3 ± 0,5	43,3 ± 0,1
Metionīns	17,2 ± 0,2	17,18 ± 0,1
Cisteīns	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,1
Aspargīnskābe	118,2 ± 1,1	97,0 ± 0,2
Glutamīnskābe	105,0 ± 0,9	116,5 ± 0,2
Serīns	68,5 ± 0,2	72,5 ± 0,3
Prolīns	19,5 ± 0,5	18,6 ± 0,8

Glicīns	77,6 ± 0,1	84,2 ± 0,2
Alanīns	99,1 ± 0,8	109,4 ± 0,2
Arginīns	76,9 ± 0,7	68,4 ± 0,1

Pigmenti

Papildus parastajiem proteīniem *spirulīna* satur arī fikobiliproteīnus, krāsainus pigmentus, kas darbojas kā gaismas uztvērējs fotosintēzes laikā. Un to struktūra satur hromoforus, kas saistīti ar cisteīnu atliekām (skatīt 1.3. attēlā). Šie krāsainie pigmenti iedalās trīs daļās: fitoeritrīns (20000-22000), allofikocianīni (15500-17500 Da) un fikocianīni (16000-20000 Da). Fikocianīnus izmanto pārtikas un kosmētikas ražošanas nozarēs kā dabīgo krāsvielu, pateicoties savai zilai krāsai. Viņiem piemīt arī pretiekaisuma, antioksidanta un pretvēža aktivitāte. Proteīnu frakcija var saturēt līdz pat 200g kg⁻¹ pigmentu [35].



1.3. att. Fikocianobilīna proteīnu grupa [36]

Visiem pigmentiem ir savas spektrālās īpašības un atšķirīgs absorbcijas spektrs. Allofikocianīni krāsojas zilgan-zaļi, un absorbcijas maksimumu sasniedz pie λ Amax 650–655 nm. Fikocianīni krāsojas zili, un absorbcijas maksimumu sasniedz pie λ Amax 615–640 nm. Fikoeritrīns krāsojas sarkans un absorbcijas maksimumu sasniedz pie λ Amax 565–575 nm.

Tāpat kā ciānbaktēriju morfoloģiju un sastāvu, arī pigmentu daudzumu ciānbaktērijās ietekmē vides temperatūra, pH, sāļums, slāpekļa daudzums, pesticīdi, barības vielas pieejamība, stress un smago metālu piesārņojums. Fikocianīni sastāda apmēram 14% no *spirulīna* sausās masas [37].

Pārtikas produkti, kuros izmanto pigmentus kā dabīgo krāsvielu, ir košļājamās gumijas, ledus šerberti, saldumi, bezalkoholiskie dzērieni, piena produkti un želejas. Kosmētikā pigmenti tiek izmantoti acu ēnu un lūpu krāsās [38].

Fikocianīns satur atvērta ķēdes tetrapirola hromoforu, kas pazīstams kā fikocianobilīns (PCB), molekula kas kovalenti saistīta pie apoproteīniem. Abiem piemīt spēcīgi izteikta antioksidanta iaktivitāte [36]. Daudzas aļģes ir bagātas ar PCB. Tas ir biliverdīna atvasinājums, kas zīdītāju šūnās ar biliverdīna reduktāzi tiek pārvērsts par fikocianurubīnu. Struktūrā ļoti līdzīgs savienojums bilirubīnam. Šis savienojums uzrāda ļoti spēcīgu NADPH oksidāzes inhibīciju zīdītāju šūnās. PCB veido 4,7% no visiem fikocianīniem [37].

Nukleīnskābes

Spirulīna satur 4 – 6 % nukleīnskābju. Un tas ir daudz zemāks procentuālais sastāvs nekā citām mikroaļģēm. Šo savienojumu dēļ tiek runāts par *spirulīnas* un citu mikroorganismu toksicitāti un nelabvēlīgiem efektiem. Nukleīnskābes spēlē lomu urīnskābes metabolismā. Tās zīdītājos katabolizē urīnskābi par adenīnu un guanīnu, kas izraisa podagru un sirds un asinsvadu slimības. Tāpat, Pasaules Veselības organizācija iesaka nepārsniegt dienā pieļaujamo nukleīnskābju devu, kas ir 4g. Lai to pārsniegtu, dienā būtu jāuzņem apmēram 80 g *spirulīnas* produkta [13].

1.3.3. Ogļhidrāti

Mikroaļģes ogļhidrātus sintezē un uzkrāj, kad tiek pakļautas dažādām stresa situācijām. Ogļhidrātu uzkrāšana sākas, kad intracelulārā fosfora koncentrācija nokrītas zem robežvērtības. Mikroorganismos ogļhidrātu sintēze sākas no oglekļa dioksīda citosolā vai arī hloroplastā. Tāpat kā visiem dzīvajiem organismiem ogļhidrāti ir enerģijas avots un nodrošina vielmaiņas procesus, kā arī nodrošina aļģēm izdzīvošanu tumsā.

Spirulīna satur 12,5 – 17 % ogļhidrātus. Starp plašāk sastopamajiem cukuriem pieder 7% ksilozes, 9,3% mannozes, 54,4% glikozes, 22,3% ramnozes un 27,8% galaktozes [39]. Tā satur arī glikokunjugātus, kā, piemēram, glikolipīdus [16].

Polihidroksisviestskābe

Polihidroksisviestskābe (PHB) ir dabā sastopams biopolimērs, kurš kalpo kā intracelulārs uzglabāšanas savienojums prokariotu organismos, cianbaktērijās, tostarp *spirulīnā*. Prokariotu šūnās PHB kalpo kā oglekļa rezerves avots. PHB tiek sintezēts no Acetil

koenzīma A, vairāku enzimatisku reakciju laikā. PHB saturs pieaug šūnas stresa apstākļos. Visbiežāk brīžos, kad apkārtējā vidē trūkst barības vielu [40].

Polisaharīdi

Polisaharīdi ir biopolimēri, kas dabīgi ir sastopami gan augos, gan dzīvniekos, un mikroorganismos. Pateicoties hidrofilo grupu klātbūtnei to struktūrās, polisaharīdi spēj piesaistīties dzīvajiem audiem, epitēlijšūnām un gļotādai. Tie sastāv no garas monosaharīdu vienību ķēdes, kas savā starpā savienotas ar glikozīdisko saiti. Tiem tiek pievērsta maksimāla uzmanība, pateicoties to fizikālķīmiskām īpašībām un bioloģiskai aktivitātei. Polisaharīdi pārsvarā sastopami jūras augos, sēnītēs un aļģēs.

Pētnieki ir vienprātis par to, ka polisaharīdi ir atbildīgi par bioloģisko aizsardzību pret infekcijas slimībām, samazinot alergiskus un iekaisuma procesus. Tie regulē imūnās sistēmas atbildi pret ārējās vides ietekmi. Polisaharīdi izraisa imūnmodulāciju, palielinot eritrocītu, granulocītu, monocītu un fibroblastu proliferāciju. Ar ļoti spēcīgi izteiktu pretaudzēju aktivitāti, aizsardzības funkciju pret brīvajiem radikāļiem un spēju ietekmēt DNS [41]. In vitro studijās apliecināts, ka tie uzrāda šūnu kodolu enzīmu pastiprinātu aktivitāti un uzlabo DNS labošanas funkciju [42].

Ir noskaidrots, ka polisaharīdi, kas izolēti no *spirulīnas* satur 9 galvenos monosaharīdus: L-fukozi, D-glikozamīnu, L-ramnozi, L-arabinozi, D-galaktozamīnu, D-galaktozi, D-glikozi, D-ksilozi un D-mannozi [43]. Starp plašāk zināmajiem polisaharīdiem *spirulīnas* aļģēs ir *Immulina polisaharīds* un *Kalcija spirulāns*.

Kalcija spirulāns

Kalcija spirulāns ir polisaharīds, izolēts no *spirulīna* aļģēm. Tam piemīt spēcīgi izteikta antivirālā aktivitāte, gan pret herpes zooster vīrusu, gan citu veidu vīrusiem [44]. Citos gadījumos tiek runāts arī par pretvēža aktivitāti, jo spēj inhibēt ļaundabīgo šūnu replikāciju [45]. Tas sastāv no ramnozes (52,3%), 3-O-metil-rhamnozes (32,5%), 2,3-di-O-metil-rhamnozes (4,4%), 3-O-metilkilozes (4,8%), nelieliem daudzumiem citu cukuru un sulfātu. *Kalcija spirulāna* molekulmasa ir 74 600 daltonu, un tā ir aptuveni 100 reizes mazāka nekā *Immulina* molekulmasa [46].

Immulina polisaharīds

Immulina ir augstas molekulmasas polisaharīdu ekstrakts, izolēts no *spirulina plantesis*. To saturs variē no 25 - 30 %. Šī polisaharīdu frakcija darbojas kā spēcīgs NF-kappa B aktivators, un inducē IL-1 β un TNF- α . NF- κ B regulē vairāku gēnu izpausmi, kas iesaistīti

iekaisuma sākuma reakcijās, ieskaitot citokīnus, hemokīnus un adhēzija molekulas [47]. Lai gan šī aktivitāte ir pierādīta *in vitro* pētījumos, patreiz trūkst pārliecinošu pierādījumu par tās darbību *in vivo*. Balahandrans *in vivo* veiktā pētījumā, pierādīja, ka pēc orālas *spirulīna* lietošanas pelēm, ar zināmu *immulīna* daudzumu, būtiski pastiprinājās barjerfunkcija pret ārējās vides faktoru iedarbības [48].

Immulina ir komerciāli pieejams *spirulīnas* ekstrakts, kas kalpo kā imunitāti uzlabojošs preparāts [49]. *Immulina* preparātu izstrādāja zinātnieku grupa ASV Misisipi Universitātē doktora David Pasco-Paszkowski vadībā. Doktors apgalvo, ka iegūtais polisaharīds no *spirulīnas* ir viens no spēcīgākajiem dabīgajiem imūnsistēmas aizsargiem. Kā arī viņš uzsvēra, ka tas jālieto katru dienu, lai nodrošinātu, ka mūsu pašu organisms spēj mūs pasargāt no ārējiem un iekšējiem kairinājumiem [50]. Tabulā 1.3. apkopoti monosaharīdi un to daudzumi *immulina* polisaharīda molekulā.

1.3. tabula

***Immulina* polisaharīda sastāvs [47]**

Monosaharīds	Moli, %
Ramnoze	35,4
Glikuronskābe	9,7
Fukoze	7,7
Galaktoze	7,1
2-Metil-ramnoze	5,9
Ksiloze	5,5
3-Metil-ramnoze	4,2
3-Metil-ksiloze	4,2
4-Metil-ramnoze	3,9
Glikoze	3,6
Mannoze	2,4
Galakturonskābe	2,0
3-Metil-galaktoze	2,0
Arabinoze	1,8

Aminocukuri	1,5
2,3 – Dimetil-fukoze	1,2
N-acetil-glikozamīns	0,9
2-Metil-glikoze	0,5
Glicerols	0,4

1.3.4. Citi ķīmiskie savienojumi

Fenolie savienojumi

Fenoli ir organisma sekundārie metabolīti, kuri rodas glikozes metabolismā. Šie savienojumi dabā var eksistēt brīvā veidā, saistīti vai polimēru formā. Savienojumus raksturo aromātiskais gredzens struktūrā, saistīts ar karboksilgrupām un vienu vai vairākām hidroksilgrupām vai metilgrupu. Šos savienojumus var klasificēt kā flavonoīdus, kumarīnus vai fenolskābes. Vienkāršā ūdeņraža atomu un elektronu pārnese ir šo savienojumu bioloģiskās aktivitātes mehānisma pamatā.

Fenolu savienojumi mikroaļģēs nav ļoti daudz pētīti, galvenokārt tas tāpēc, ka to koncentrācija ir zema. Fenoli tāpat kā polisaharīdi kalpo kā aizsardzības mehānisma daļas pret nelabvēlīgiem ārējās vides kairinājumiem. Un tiek uzskatīts, ka tie ir dominējošie savienojumi ar antioksidatīvo aktivitāti [10].

Fenolo savienojumu saturu *spirulina plantesis* aļģēs var noteikt ar vairākām ekstrakcijas metodēm. Vislabākos rezultātus uzrāda ūdens ekstrakti, kurā kopējais fenolu saturs pārsniedz 43 mg/100 g aļģu. 80% un 100% metanolā to saturs nedaudz pārsniedz 20 mg mg/100 g aļģu. Šajās aļģēs sastopami fenolie savienojumi kā flavonoīdi, karotenoīdi, gallusskābe, hlorogēnskābe, katehīni, epikatehīni un pirokatehols [51][52][53].

Zeaksantīns

Luteīns un zeaksantīns ir izomēriski karotenoīdi [54]. Zeaksantīns un tā strukturālais izomērs luteīns ir visvairāk izplatītie ksantofila savienojumi, kas atrodami cilvēka ķermenī. Tie ļoti koncentrētā veidā ir sastopami acs ķermenī. Acs makulā ir zeaksantīns, bet luteīns vairāk sastopams acs perifērijā. Viņi abi darbojas kā zilās gaismas filtri un saista skābekli, aizsargājot acs iekšieni no oksidatīviem bojājumiem. Zeaksantīnam un luteīnam ir ļoti svarīga un izšķiroša nozīme uz acs un redzes veselību. Īpaši tie ir ļoti nepieciešami vecākā gada

gājuma cilvēkiem, kuriem ir vecuma izraisīta acs deģenerācija. Abi šī karotenoīda tipa savienojumi cilvēka organismā netiek sintezēti, tāpēc tie ir jāuzņem ar pārtiku. Piemēram, oranžā paprika, burkāni, spināti, brokoļi, kukurūza, olas dzeltenums un hurma ir bagāti ar luteīnu.

Zeaksantīns ir nozīmīgs vairāku acs slimību ārstēšanā un profilaksē, un ir neaizstājams, cilvēkam novecojot. Zināms, ka, cilvēkam novecojot, tāpāt kā citas organisma sistēmas un orgāni, arī acs ķermenis pamazām zaudē savas spējas un nespēj vairs reģenēties. Zeaksantīns šo procesu var uzlabot, un pētījumi liecina, ka to saturoši pārtikas produkti vai uztura bagātinātāju lietošana var būtiski atjaunot acs funkcijas.

Spirulīna ir ļoti bagāts zeaksantīnu avots, to daudzums sausajā masā var sasniegt līdz pat 74 mg uz 100 gramiem. Un to daudzums var vairāku simtu reižu pārsniegt citos pārtikas produktos esošos ksantofilus. Savukārt, *Spirulīnā* esošais lipīdu daudzums var palīdzēt uzsūkties zeaksantīnam cilvēka organismā [55].

Hlorofils

Hlorofils ir zaļais pigments, sastopams praktiski visos augos, aļģēs un ciānbaktērijās. Tas dod zaļo krāsu augu lapām un lapotnei. Tas ir nepieciešams augu biosintēzē, jo ļauj tām absorbēt gaismu. Tas ir sastopams vairākos veidos, kas savā starpā atšķiras ar ķīmisko formulu, kā hlorofils A, hlorofils B, hlorofils C un tā tālāk. Pirmo reizi hlorofilu izolēja 1815. gadā. Hlorofils A, pateicoties tai ķīmiskai stabilitātei, tiek izmantots kā krāsviela. Pārsvārā to iegūst no augstākiem augiem, biosintēzē no citas formas hlorofila.

Spirulīna kā krāsviela jau tiek pielietota pārtikas, kosmētikas un farmaceitiskajā rūpniecībā. Papildus pigmentam fikociannīnam, tā satur arī ļoti daudz hlorofila A tīrā veidā. 1989. gadā veiktais eksperiments apliecināja, ka *spirulīna* satur 1,15% tīru hlorofilu A [56].

Lai gan salīdzinoši maz ir veikti pētījumi par hlorofilu kā potenciālu molekulu medicīnā un farmācijā, tā patreizējā nozīme medicīnā, darbojoties kā spēcīgam antioksidantam, pankreatīta gadījumos, un vairāki pētījumi liecina, ka tam ir nozīme arī anēmijas profilaksē. Kā arī tas labvēlīgi ietekmē hemoglobīna un ferritīna līmeņa paaugstināšanos organismā [57][58].

Vitamīni

Spirulīna ir bagāts vitamīnu avots. Tā satur praktiski visus nepieciešamos vitamīnus, izņemot D vitamīnu, kuri nepieciešami organisma fizioloģiskai darbībai. Ļoti lielā daudzumā ir atrasti tādi B grupas vitamīni kā tiamīns un riboflavīns, kā arī E vitamīns. Vitamīnu saturs

var mainīties pēc *spirulīnas* ieguves avota un vietas. Tabulā 1.4. apkopoti atrastie vitamīnu daudzumi *spirulina Arthrospira* sugā.

1.4. tabula

Vitamīnu daudzums *Spirulīna Arthrospira* [59]

Vitamīns	mg/100 g
Vitamīns A	29 µg
Vitamīns K	25,5 µg
Vitamīns E	5 mg
Askorbīnskābe (vit. C)	10,1 mg
Tiamīns (B1)	3,5 mg
Riboflavīns (B2)	4,0 mg
Niacīns (B3)	14,0 mg
Pantotēnskābe (B5)	0,94 mg
Piridoksīns (B6)	0,8 mg
Bioīns (B7)	0,005 mg
Folijskābe (B9)	0,01 mg
Ciānkobalamīns (B12)	0,32 mg

Tokoferoli

Tokoferoli ir ķīmiski organisko savienojumu klase, visbiežāk metilēti fenoli. Ļoti daudziem šīs klases savienojumiem piemīt vitamīna E aktivitāte. Šo vitamīnu pirmo reizi identificēja 1936. gadā no žurkām, kā faktoru, cik lielā mērā žurkai ir iespējams vairoties. Tā radās arī vitamīna ķīmiskais nosaukums – tokoferols – kas nozīmē no grieķu valodas “palikt stāvoklī”.

E vitamīns sastāv no 8 dažādām formām: 4 tokoferoli un 4 tokotrienoli. Visi satur fenola gredzenu ar hidroksilgrupu, kas kalpo kā ūdeņraža donors, un hidrofobu sānu ķēdi. Visi iedalās kā α (alpha), β (beta), γ (gamma) un δ (delta) formās. No kurām α – tokoferols ir visbiežāk sastopamā forma.

Lai gan pārsvarā tiek runāts par tokoferolu antioksidatīvo iedarbību, pateicoties struktūrā esošajai hidroksilgrupai, pēdējo gadu pieredze liecina, ka tiem piemīt ļoti daudzas

bioloģiskās iedarbības. Visaugstākā tokoferola koncentrācija ir augu eļļā, riekstos, sēklīs un graudos [60][61].

Spirulīna satur α – tokoferola formu. Svaiga *spirulīna* iedzīvotājiem ir pieejama samērā reti, dēļ tās uzglabāšanas. Svaigas biomasas žāvēšana un uzglabāšana ir vienīgie drošie līdzekļi tās komercializācijai. Tomēr žāvējot un uzglabājot sauso biomasu var rasties neatgriezeniskas ķīmiskā sastāva izmaiņas. Oksidatīvās sastāvdaļas, kā, piemēram, α -tokoferols ir jutīgas pret atmosfēras skābekli, gaismu un temperatūras svārstībām. Šie procesi negatīvi ietekmē to saturu. *Spirulīna* vidēji satur 1,72 mg α -tokoferolu uz 100 g aļģu. Bet, uzglabājot ilgstoši, tā daudzums samazinās [62].

Beta - karotīns

Beta-karotīns ir sarkanbrūns pigments, bagātīgi pieejams augos un augļos. Tas ir terpenoīds, bioķīmiski sintezēts no 8 izoprēna vienībām, un tādēļ satur 40 oglekļa atomus. No citiem karotenoīdiem tas atšķiras ar to, ka abos molekulas galos satur beta gredzenus. Organismā tas ir prekursors A vitamīnam. Pārtikā to izmanto kā krāsvielu [63]. *Spirulīna* ir ļoti labs beta-karotīna avots, to saturs ir apmēram 700 – 1700 mg/kg aļģu. Organismā tas pilnībā biotransformējas par A vitamīnu. Pigmentam, atšķirībā no produkta, nav kumulatīvi toksiska efekta, tādēļ nav iespējama tā pārdozēšana [62].

Minerālvielas

Papildus lielam klāstam vitamīnu, *spirulīna* satur arī daudzas, neorganiskas dabas minerālvielas, gan makroelementus, gan mikroelementus, kuri ir nepieciešami organisma dzīvības procesiem. *Spirulīnā* ir atrodamas visas nepieciešamās minerālvielas. Komerciāli ražotos produktos, minerālvielu daudzums sasniedz līdz pat 7% no sausās aļģu masas. Pētījumi liecina, ka *spirulīna* ir bagātīgs dzelzs, kalcija, fosfora un mangāna avots (skatīt 1.5. tabulu) [13][59].

1.5. tabula

Minerālvielu saturs mg/100g *Spirulīna plantesis* [64]

	Na	K	Ca	Mg	Fe	Cd	Cr	Cu	Zn	Mn	Se	P
Spirulina plantesis	1262,64 ± 0,03	1412,97 ± 0,04	826,33 ± 0,08	388,87 ± 0,05	95,37 ± 0,06	0,02 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,31 ± 0,09	2,68 ± 0,03	4,29 ± 0,06	0,12 ± 0,03	750,7 ± 0,03

1.4. *Spirulīnas* farmakoloģiskie efekti un izmantošana

21. gadsimtā *spirulīna* tiek dēvēta par nākotnes pārtiku. Kā uztura bagātinātājs tā ir nepārspējama ar savu unikālo aminoskābju, vitamīnu un mikroelementu kompleksu, ko cilvēka organisms gandrīz pilnībā spēj uzņemt un pārstrādāt bez atlikuma. Zinātniskajos pētījumos pierādīts un arī Pasaules veselības organizācija (PVO) publiski atzinusi, ka *spirulīna* ar savu bioloģiski aktīvo iedarbību spēj organismu pasargāt no divām trešdaļām cilvēcei zināmo slimību, jo paaugstina organisma pretestību, atbrīvo šūnu enerģiju un apgādā orgānus ar to darbības nodrošināšanai tik nepieciešamajām uzturvielām. Turklāt bez jebkāda riska *spirulīnu* uzturā var lietot jau no agrīna vecuma. *Spirulīnas* farmakoloģisko efektu diapazonu veido atsevišķu aktīvo vielu iedarbība un savstarpēja to sinerģija.

Pateicoties tās plašajam un daudzveidīgajam sastāvdaļām, tā nodrošina ātru enerģijas pieplūdi visam organismam. Sastāvā esošie polisaharīdi un nepieciešamās taukskābes viegli pārvar šūnu membrānu un nodrošina enerģijas atbrīvošanos. *Spirulīna* palielina zarnās dabīgās baktērijas, kas, savukārt, palielina B6 vitamīna ražošanu, nodrošinot organismam spēku un enerģiju. Tās efekts uz enerģijas palielināšanu ir devas atkarīgs. Jo lielāka deva ir iedzerta, maksimālās dienas uzņemšanas koncentrācijas ietvaros, jo lielāka enerģija. Tā nodrošina organismam mundruma sajūtu visas dienas garumā. Pateicoties proteīnu un aminoskābju klāstam, to pielieto kā specializētu pārtiku sportistiem kā enerģijas un pilnvērtīgu olbaltumvielu avotu. Šīs zilaļģes palielina organisma spējas, enerģijas un spēka atjaunošanos pēc lielas fiziskās piepūles [65].

Spirulīnu ieteicams pievienot profilaktiski bērnu, jauno māmiņu, vecāku cilvēku uzturam, kuri pakļauti lielām fiziskām vai emocionālām slodzēm. Kā veselības un tonusa uzturēšanai, ilglaicīga noguruma noņemšanai, un ātrākai atveseļošanās procesam pēc slimībām, ilglaicīgas medikamentozas ārstēšanas un ķīmijterapijas [65].

Spirulīna no organisma spēj izvadīt smagos metālus un to sāļus, toksīnus, radionukleotīdus un citus radioaktīvus savienojumus. Tādējādi tā var kalpot kā papildus uztura avots cilvēkiem, kuri dzīvo ekoloģiski nelabvēlīgos apstākļos vai saskaras ar kaitīgu vidi savas profesionālās darbības rezultātā, un cilvēkiem, kurus ir skārušas smago metālu un toksīnu saindēšanās. 2006. gadā tika veikts placebo kontrolēts, divkāršs pētījums, lai novērtētu *spirulīnas* ekstrakta efektivitāti arsēna saindēšanās gadījumos. Pētījumā iekļāva cilvēkus no Bangladešas, Indijas, Taivānas un Čīles, kas ar dzeramo ūdeni ilgākā laika posmā uzņēma lielu arsēna koncentrāciju, kā rezultātā attīstījās hroniska arsēna saindēšanās, kuram nav specifiskas ārstēšanas. Rezultāti liecināja, ka pēc 16 ārstēšanās nedēļām, *spirulīna*

kombinācijā ar cinku, ievērojami samazināja metāla koncentrāciju organismā. Teorētiski var domāt par efektivitāti arī citu smago metālu saindēšanās gadījumos [66].

Spirulīna pēc 2 mēnešu kursa pārliecinoši samazina triglicerīdu un zema blīvuma lipoproteīnu līmeni asinīs, un arī paaugstina augsta blīvuma holesterīnu. Nepiesātinātās taukskābes normalizē tauku apmaiņu un samazina sliktā holesterīna līmeni asinīs. Visa šī ietekme netieši ietekmē arī asinsspiedienu, samazinot gan diastolisko, gan sistolisko asinsspiedienu, un kopumā deva aizsargājošu iedarbību uz sirds un asinsvadu sistēmu. Pārliecinošs tā efekts pierādīts gan in vitro, gan in vivo studijās [67][68][69]. 4 nedēļu ilgā terapijā ar *spirulīnu* pelēm samazinājās tauku profils un tās kļuva tievākas. Tā būtiski ietekmē lipīdu metabolismu dzīvniekiem. Un pateicoties gamma-linolēnskābei tām samazinājās arī cukura daudzums asinīs. *Spirulīna* samazina lipīdu profilu un taukskābju daudzumu, tādējādi samazinot hiperlipidēmijas sindromu. Tajā esošie antioksidanti normalizē lipīdu oksidācijas procesus. Kā arī tā iedarbojas uz galvas smadzeņu centriem, uzlabojot vielmaiņu un samazinot bada sajūtu [70]. Tā efektīvi uzlabo šūnu membrānu receptoru jutīgumu un pilnvērtīgu insulīna saistību ar tiem, samazina glikozes līmeni asinīs un novēršot komplikāciju rašanos [71].

Spirulīnas antioksidatīvā iedarbība plaši pārbaudīta gan in vitro, gan in vivo pētījumos. Tā samazina oksidatīvo stresu, lipīdu proliferāciju, brīvo radikāļu veidošanās. Ir pierādīts arī pozitīvs efekts uz alergiskiem cilvēkiem, samazinot alergēnu aktivitāti organismā un uzlabojot imūnsistēmas atbildi uz to izraisītu kairinājumu. Uzlabo asinīs esošo imūnglobulīnu daudzumu [72][70][73]. *Spirulīnas* sastāvā ir daudz aktīvu komponentu, kas uzlabo imūnsistēmu, bet polisaharīdi tiek uzskatīti par galvenajiem, kas uzlabo T un B šūnu proliferāciju, tādējādi uzlabojot organisma rezistenci. Pirmais eksperimentālais pētījums tika veikts ar pelēm 1994. gadā, un tas tika pētīts uz antivielu ražošanas ietekmi. Šajā pētījumā tika ziņots, ka fikocianīni un polisaharīdi kaulu smadzenēs aktivēja monocītu, eritrocītu, granulocītu un fibroblastozes proliferāciju. Pētnieki arī norādīja, ka polisaharīdiem ir nozīmīga loma šūnu līdzsvara uzturēšanā. Tiem ir nozīmīga loma eritropoētina aktivitātē, uzlabojot leukocītu un kaulu smadzeņu augšanu [70]. Tā ekstrakti pēdējā laikā ir plaši izmantoti krēmos, šķīdumos un ziedēs ādas veselībai. Kolagēna fibrils, kas atrodas mikroaļģēs, piemīt īpašībām, kas pozitīvi ietekmē brūču slēgšanu ārstēšanas procesā. *Spirulīna* nomāc baktēriju augšanu un vairošanos brūču zonā. Tajā ir liels dabīgo antioksidantu klāsts, kuriem piemīt membrānu stabilizējoša pretiekaisuma, tūska mazinoša, reģenerējoša iedarbība [74].

To var pielietot kuņģa – zarnu trakta slimību: gastrīta, čūlas slimības, kolīta, pankreatīta, aknu cirozes, disbakteriozes profilaksei un ārstēšanai, pateicoties spēcīgi

izteiktam antioksidatīvam efektam un aizsargājošam efektam uz gļotādām [71] *In vitro* pētījumā polisaharīdi, izolēti no *Spirulīnas* aļģēm, samazināja *H.pylori* baktērijām saistīties ar kuņģī esošo mucīnu zemā pH. Kā arī aizsargāja no inficēšanās ar baktēriju, samazinot baktēriju blīvumu vairāk par 90% [75].

Ļoti labi dokumentēta ir *spirulīnas* pretiekaisuma aktivitāte. Dažādu alergisku reakciju gadījumos samazinās histamīna atbrīvošanās no tuklajām šūnām. Pētījumā, kur tā tika dota indivīdiem ar alergisku rinītu, novēroja IL-4 samazināšanos par 32%. Ievērojami uzlabojot fiziskos rādītājus un samazinot simptomu biežumu un ilgumu [76]. Citā pētījumā novēroja strauju imunoglobulīna A ražošanas pieaugumu [77]. Arī dabīgo killersūnu un interferona IFN γ pieaugums ir novērojams pēc *spirulīnas* lietošanas. Ir labi zināms, ka dažādu barības vielu deficīts organismā un nepilnvērtīgu ēdienu lietošana uzturā, izpaužas dažādu mediatoru darbības traucējumos, T šūnu produkcijā, imunoglobulīnu ražošanā, kas noved pie imunitātes samazināšanos. Tā modulē imūnsistēmas darbību, apejot barības vielu deficītu [78]. Sastāvā esošā gamma-linolēnskābe nomāc prostaglandīnu un iekaisuma progresēšanu [79].

Pārliecinoši pētījumi *in vitro*, un nesen pētījumi *in vivo* ir pierādījuši *spirulīnas* antivirālo aktivitāti, pasargājot organisma šūnas pret vairākām vīrusu līnijām, ieskaitot gripas vīrusu A. Tā ekstrakta aktīvais polisaharīds *kalcija spirulāns* inhibē replikāciju Herpes simpleks I, cilvēka citomegalovīrusam, masalu izraisošam vīrusam, pēdu un mutes slimību izraisošiem, gripas vīrusa paveidam A un arī cilvēka imūndeficīta vīrusam 1. *Spirulīnas* ekstrakts inhibē replikāciju T šūnās, monoklonālās šūnās un langerhansa šūnās. Tā ūdens ekstrakts neļauj sintezēties vīrusu proteīniem [80]. *In vivo* pētījumos uz dzīvnieku modeļiem, pierādīts, ka tā uzlabo pretvīrusu aktivitāti, pārtraucot hemaglutināciju [81][82]. *In vitro* studijās *spirulīnas* ekstrakts uzrāda ļoti labus rezultātus uz HIV vīrusu inhibīciju gan cilvēku T šūnu un monocītu līnijās. Terapeitiskais indekss ir ļoti augsts, un koncentrācija, kurā ekstrakts uzrāda vīrusa aktivitātes samazināšanos uz pusi, ir ļoti zema, tikai 5-10 $\mu\text{g/ml}$ [81].

Teorētiski tiek apgalvots, ka *spirulīna* varētu dot pozitīvu efektu arī onkoloģijā pateicoties tā kombinētajām antioksidatīvajām un imunomodulējošām īpašībām. Lai gan ir daudz pētījumu uz šūnu līnijām *in vitro*, un dzīvnieku modeļiem *in vivo*, ir tikai nedaudzi pētījumi uz cilvēkiem. Iespējamais tā mehānisms saistīts ar vēža šūnu proliferācijas inhibīciju un dabīgu šūnas apoptozes ierosināšanu. Pretvēža aktivitāte saistīta ar sastāvā esošo fikocianīnu, kas traucē DNS sintēzi vēža šūnās. Tie saistās ar mitogēnu receptoru uz audzēja šūnu membrānas virsmas un tādējādi aktivē apoptotisko signālu pārnesei [83]. Koničkova *in vitro* un *in vivo* pētījumā uz peļu un žurku līnijām pierādīja, ka *spirulīnas* ekstrakts statistiski uzlabo antioksidatīvo aktivitāti pēc 5 dienu lietošanas. Samazina brīvo radikāļu veidošanos mitohondrijos [84].

Jau iepriekš tika minēts, ka *spirulina* ir bagāts dzelzs avots. *In vivo* pētījumi pārlicinoši pierāda, ka cilvēkiem pieaug dzelzs līmenis pēc *spirulīna* lietošanas. Vēl vairāk, ilgstošākā laika periodā tā būtiski uzlabo asins ainu [85]. Fikocianīniem arī ir loma anēmijas ārstēšana, jo tie stimulē endogēnā eritropoētīna stimulēšanu, kas pazīstams kā eritrocītu proliferācijas un diferenciacijas indikators. *Spirulīnai* ir efekts anēmijas jeb mazasinības un citu anēmijas veidu ārstēšanā un profilaksē, ar uztura deficītu, asins zudumiem un grūtniecību saistītos gadījumos. Pārmantotas un iegūtas talasēmijas gadījumā ir novērota pakāpeniska stāvokļa uzlabošanās pēc 3 mēnešu kursa. Ir novērotas pozitīvas izmaiņas arī aknu rādītājos, samazinās kopējais bilirubīna un aknu specifisko enzīmu koncentrācijas, kā arī brīvā dzelzs koncentrācija aknās samazinās [82].

Spirulīna uzlabo arī reproduktivitāti gan vīriešiem, gan sievietēm [86] [87].

1.5. Spirulīnā esošo ķīmisko savienojumu analīžu metodes

1.5.1. Fenolo savienojumu noteikšana

Fenolu saturu *spirulīnas* produktos var noteikt, izmantojot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju (AEŠH) savienojumā ar UV detektoru. Pētījumā [88] *S. Plantesis* ekstraktu izšķīdina tīrā ūdenī (30 mg ekstrakta uz 1 ml ūdens) un centrifugē 10 minūtes 4706 apgriezīenos. Pēc tam iegūto paraugu filtrē caur celulozes acetāta membrānfiltru 0,25-0,45 μm.

Filtrāta analīzi veic ar AEŠH metodi, kā kolonnu izmantojot SUPELCOSIL LC-18 (250 mm, 4,6 mm, 5 mm). Kolonnas temperatūra uzturēta 20 °C visu analīzes laiku. Kustīgā fāze pagatavota no 0,5% etiķskābes šķīduma (A) un nitrila acetāta (B) šķīduma. Eluēšanu veica pirmās 2 minūtes ar 100% A šķīdumu, 40% no A un 60% no B šķīduma izmantoja nākamās minūtes analīzes laikā, no 2 līdz 60 minūtēm, pie plūsmas ātruma 1 ml/min. Injicējamā parauga tilpums - 25 μL. Polifenolus detektēja, izmantojot UV detektoru pie 280 nm. Lai identificētu izdalītos fenolos savienojumu, to izdalīšanas laikus salīdzināja, izmantojot vienu vielu maisījumu standarta šķīdumu ar koncentrāciju 100 mg/l [88]. Ar šo metodi *Spirulina plantesis* sugā tika identificēti gallusskābe, tirosols, katehīns, o un p-kumarīnskābe, kafijskābe, apigenīns un citi bioaktīvi fenolie savienojumi.

Machu [89] pētījumā fenolo savienojumu noteikšanai izmantoja AEŠH metodi kopā diožu matricas detektoru, kā kolonnu izmantojot C18 Kinetex (Phenomenex, Torrance, CA, ASV). Kā visefektīvākā ekstrakcijas metode izvēlēta šķīdinot biomasu metanola – ūdens –

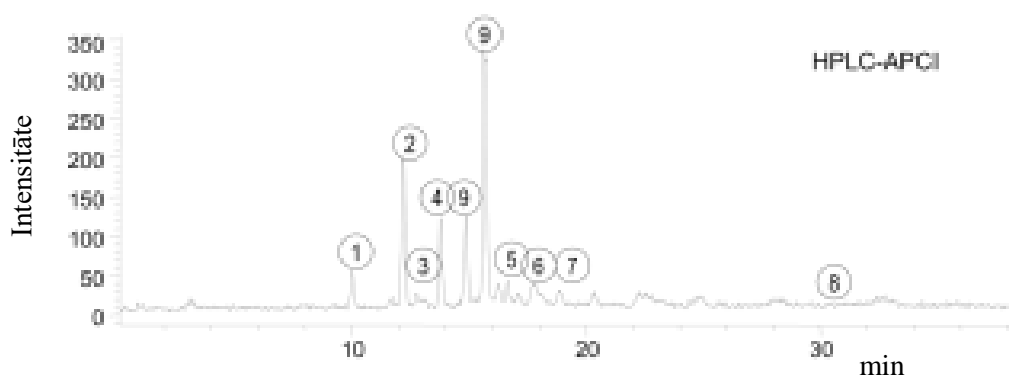
etiķskābes maisījumā attiecībā 30:69:1. Šķīdums likts ūdens vannā 50 minūtes 70⁰ C temperatūrā, nepārtraukti maisot.

AEŠH analīze veikta kā kustīgo fāzi izvēloties ūdens un etiķskābes maisījums (99:1) – A fāze, un ūdens-acetonitrila-etiķskābes maiījumu (67:32:1) – B fāze. Gradients apstākļi izvēlēti sekojoši - 0-10 min: 90% A + 10% B; 10-16 min: 80% A + 20% B; 16-20 min: 60% A + 40% B; 20-25 min: 50% A + 50% B; 25-27 min: 60% A + 40% B; 27-35 min: 90% A + 10%B.

Atdalīšana veikta 23⁰ C temperatūrā ar plūsmas ātrumu 1 ml/min. Un hromatogrammas reģistrētas pie 275 nm.

Šķidrums hromatogrāfija - tandēma masspektrometrija (ŠH-MS)

Analizējot un atdalot fenolos savienojumus *spirulīnas* paraugos, izmantota arī apgrieztās fāzes kolonna Microsorb-MV C18 (250 x 4.6 x 5 μm). Mobilā fāzē izmantoti šķīdinātāji ūdens – metanols – acetonitrils – etiķskābes maisījums attiecībā 15:2:2:1, un acetonitrils. Gradients apstākļos attiecīgi pirmais maisījums tika uzturēts pie 100% 40 minūtes un 20% nākamās 10 minūtes. Masspektrometrijas analīzē izmantoti šādi analizātori: elektronu izsmidzināšana, jonu slazda analizātors, atmosfēras spiediena ķīmiskā jonizācija un kvadrupols (skatīt 1.4. attēlā) [90].



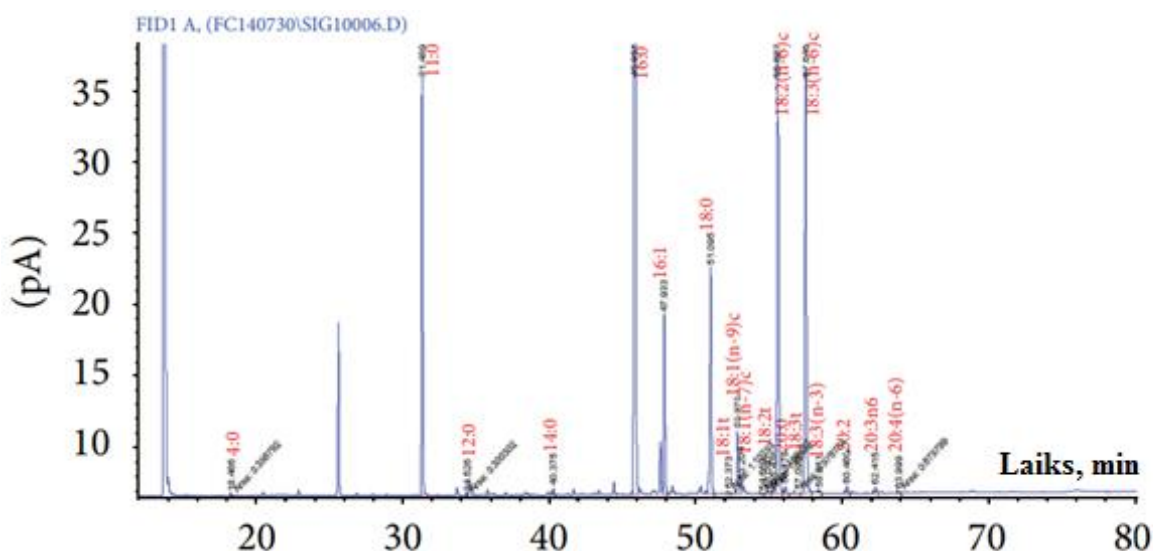
1.4. Att. Fenolo savienojumu hromatogramma iegūta ar AEŠH-APCI metodi, izmantojot Zorbax XDB C18 kolonnu 5.0 x 2.1 mm x 5 μm: 1. Siphonein, 2. Zeaksantīns, 3. Miksoksantofils, 4. Astaksantīns, 5. Feofitīns, 6. Hlorofila a degradācijas produkts, 7. Hlorofils a, 8. Beta- karotīns [90].

1.5.2. Taukskābju noteikšana

Pārtikas produktos kvantitatīvu tauku satura noteikšanu parasti veic ekstrahējot to ar kādu lipofīlu šķīdinātāju. Taukskābju ekstrakcijai izmanto 2 dažādas metodes. Pirmajā gadījumā 15 mg parauga pievieno 10 μ l benzēna šķīduma (17:0) kā iekšējo standartu un esterificēts ar 2 ml $\text{BCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 12% 100⁰ C 30 minūtes. Pēc dzesēšanas pievieno 1 ml ūdens un taukskābju metilesterus ekstrahē ar 1 ml petrolēteri. Pēc centrifugēšanas 5 min organisko slāni noņem un turpina ekstrakciju. Beigās ekstraktus apvieno un iztvaicē līdz sausam atlikumam. Izšķīdina 100 μ l n—heksānā un nosaka ar gāzu hromatogrāfiju.

Otrs ekstrakcijas veids ir superkritiskās šķidrums ekstrakcijas izmantošana, kā superkritisko šķīdumu izmantojot CO_2 . 10 g parauga ekstrahē 240 atm spiedienā 60⁰ C 1 stundu. Pēc atdzesēšanas un spiediena samazināšanas, ekstraktu apstrādā ar CHCl_3 , iztvaicē un no jauna atšķaida ar n-heksānu.

Taukskābes nosaka un atdala ar gāzu hromatogrāfiju, kas aprīkota ar SP-2380 kausēta kvarca kapilāra kolonnu, 30m \times 0,25 mm (Supleco), un liesmas jonizācijas detektoru. Injektora un detektora temperatūru uzstāda pie 250⁰ C, kamēr kolonnas temperatūru paaugstina sākot no 30⁰ C līdz 220⁰ C. Identificēšanu un kvantificēšanu veic, izmantojot autentiskas taukskābju standartvielas (skatīt 1.5. attēlā) [88]. Kā nesējgāzi lipīdu atdalīšanai izmanto hēliju.



1.5. Att. Taukskābju hromatogramma, iegūta ar gāzu hromatogrāfiju [91].

Lipīdu funkcionālo grupu identifikāciju sausā *spirulīnas* biomasā var veikt izmantojot arī infrasarkanās spektroskopijas metodi, ar novājinātu starojumu. Spektrus reģistrē istabas

temperatūrā $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ reģionā, ar 4 cm^{-1} izšķirtspēju, izmantojot termālās gravimetriskās analīzes un diferenciālās termogravimetrijas analīzes metodes. Termogravimetriskās līknes un atvasinātos daudzumus analizēja termobalansā, izmantojot slāpekļa plūsmu 50 ml/min un sildīšanas ātrumu 10^0 C min^{-1} , šajā nolūkā 5 mg parauga nosver aizvākotā alumīnija cepurītē un silda, lai sasniegtu temperatūru no $30 - 550^0 \text{ C}$ [92].

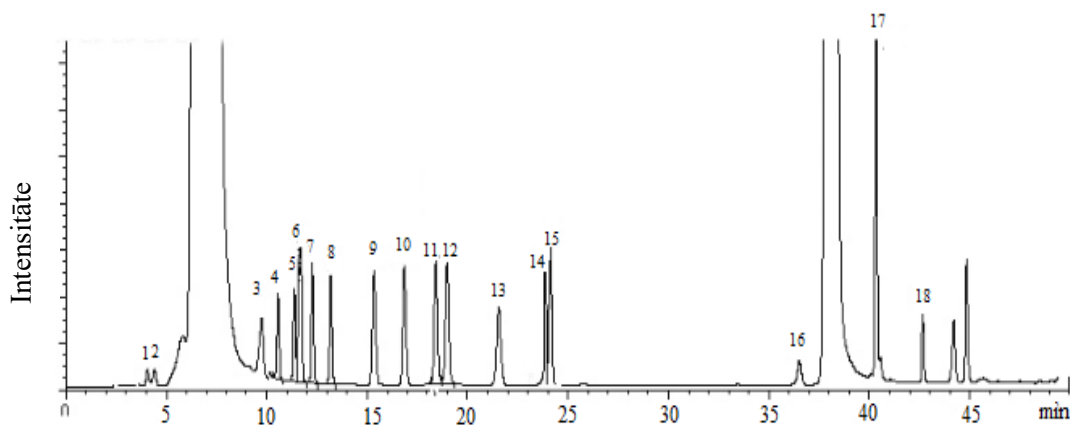
1.5.3. Aminokābju noteikšana

Brīvās un kopējās aminokābes ekstrahē un nosaka kā feniltiokarbamila atvasinājumus, izmantojot apgrieztās fāzes AEŠH ar UV detektoru pie 254 nm . Kā vielu sadalīšanas kolonnu izmanto Supelcosil LC 18-DB (Supelco, Bellefonte, PA), $25 \times 0,46 \text{ cm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$, ar kolonnas temperatūru $45 \text{ }^\circ\text{C}$ [88].

Brīvo aminokābju ekstrakcijai iepriekš sasmalcinātam 150 g lielam paraugam pievieno 2 ml $0,37 \text{ M}$ trifluoretiķskābes šķīduma. Homogenizē un pēc tam pievieno $0,2 \text{ ml}$ nātrija deoksholātu ($0,36 \text{ M}$) un atstāj istabas temperatūrā uz 10 minūtēm. Centrifugē 15 minūtes 3000 apgriezienos. Superekstraktu atdala un centrifugē vēlreiz 1 stundu 5000 apgriezienos, lai pilnībā atdalītos sīkākās nogulsnes [88].

Aminokābju derivatizācijas metodē pie $10 \text{ }\mu\text{l}$ vai $25 \text{ }\mu\text{l}$ iegūtā gala ekstrakta pievieno $25 \text{ }\mu\text{l}$ $10 - 3 \text{ M}$ Norleicīnu (Nle), ko izmanto kā iekšējo standartu un $25 \text{ }\mu\text{l}$ svaigi pagatavota šķīduma, kas satur etilspirtu-ūdeni-trietamīnu (TEA) – PITC ($7:1:1:1$). Izmantojot rotācijas iztvaicēšanu, ekstraktus 20 minūtēs izžāvē istabas temperatūrā un izšķīdina 250 vai $500 \text{ }\mu\text{l}$ AEŠH kustīgajā fāzē izmantotajā buferšķīdumā [88].

Aminokābju atvasinājumu analīzi veic trīskāršā gradienta apstākļos, pie kustīgās fāzes plūsmas ātruma 1 ml/min . Izmantoti trīs eluenti: $0,7 \text{ M}$ CH_3COONa + $2,5 \text{ ml/l}$ TEA + CH_3COOH pH līdz $6,4$; ūdens; $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ ($80:20$). Gradientu programma sekojoša: no 20% A, 75% B, 5% C līdz 20% A, 30% B, 50% C 25 minūtēs, tad līdz 10% A, 10% B, 80% C 1 minūtē, šādi apstākļi uzturēti 4 min . Pēc tam 10 minūtes atjauno kustīgo fāzi sākotnējos apstākļos (skatīt 1.6. attēlu) [88].



1.6. Att. Tipiska aminoskābju hromatogramma iegūta ar LiChrospher®100RP-18 kolonnu, 1 Asp; 2 Glu; 3 Ser; 4 Arg; 5 Thr; 6 Gly; 7 Ala; 8 Pro; 9 Val; 10 Met; 11 Ile; 12 Leu; 13 Phe; 14 Cys; 15 CysH; 16 Lys; 17 His; 18 Tyr [93]

Aminoskābju adalīšanu un detektēšanu var veikt izmantojot specializētas aminoskābju kolonnas, kas radītas šķidrums hromatogrāfijas masspektrometrija analīzei. Šīs kolonnas neprasa parauga iepriekšēju sagatavošanu vai pēckolonnas derivatizāciju. Kolonnas raksturojas ar lielāku efektivitāti tieši aminoskābju analīzē, ātrāku analīzes laiku, ilgāku kolonnas darbības ilgumu. Izmantojot parastās hromatogrāfijas kolonnas ŠH-MS aminoskābju analīzei rodas problēma, nosakot izobāras aminoskābes. Šīs kolonnas spēj atdalīt izobāras aminoskābes, tas ir, aminoskābes ar vienādu masas lādiņa attiecību, piemēra, leicīnu un izoleicīnu, valīnu un norvalīnu, un citas. Selektīvu aminoskābju caurlaidības spēja ir ļoti augsta, mazāk kā viena minūte. Standarta aminoskābju analīzes ilgums 10 minūtes. Tā ļauj manipulēt gan ar kustīgās fāzes sastāvu un gradienta metodi, tādējādi izstrādājot metodi, atbilstoši parauga īpašībām, nosakot visefektīvāko. Ar šo kolonnu iespējams kopumā identificēt 55 aminoskābes [96].

Aminoskābju un proteīnu noteikšana ar Kjeldāla metodi

Kjeldāla metode ir slāpekļa kvantitatīvas noteikšanas metode organiskajos savienojumos. Šī metode ir pasaules standarts aminoskābju un proteīnu saturu noteikšanā dažādās matricās: cilvēku un dzīvnieku pārtikā, mēslojumā, notekūdeņos, fosīlā kurināmā.

Metode pamatojas uz parādību, ka organiskajās vielās ietilpstošais slāpeklis, to karsējot Kjeldāla kolbā kopā ar koncentrētu sērskābi, pāriet amonija sulfātā, rodas amonija joni. Reakcijas paātrināšanai pievieno katalizatoru, par kuru Kjeldāls sākotnēji izmantoja dzīvsudraba oksīdu, taču tā radītās bīstamības dēļ mūsdienās dzīvsudraba oksīds ir aizstāts ar

mazāk bīstamo katalizatoru: maisījumu, kas satur kālija un vara (II) sulfātu, un titāna dioksīdu.

Metodes priekšrocība ir tās piemērotība dažādiem paraugiem un spēja nodrošināt iegūtos rezultātus ar lielu precizitāti, bet tajā pašā laikā tā ir diezgan laikietilpīga.

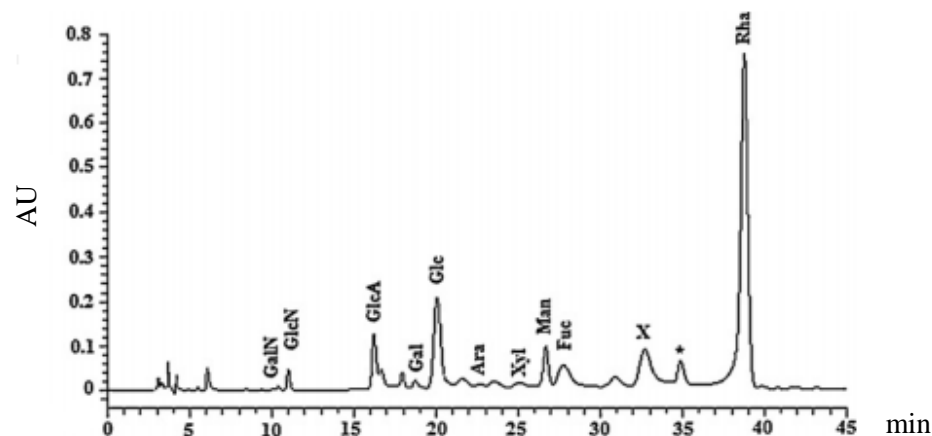
S. Plantesis paraugu iepriekš žāvē istabas temperatūrā, un sasmalcina. Iesver paraugu pergamenta laiviņā un ievieto speciālās kjeldāla kolbās, pievieno 2 tabletes katalizatora un 20 ml koncentrētas sērskābes. Mineralizāciju veic 90 minūtes.

Pēc mineralizācijas beigām kolbu ievieto destilātorā, pievieno Taširo indikatoru. Destilātoram nodrošina metodi ar parametriem 50 ml ūdens, 40 ml nātrija hidroksīda un 50 ml borskābes. Kad atdestilējies, paraugu titrē ar 0,1 M sālsskābes šķīduma [94][95].

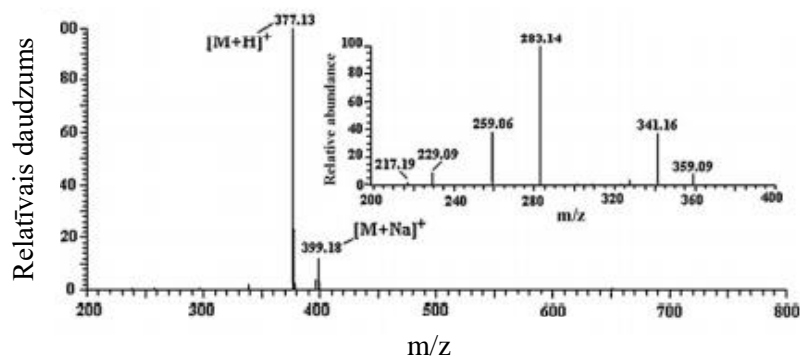
1.5.4. Ogļhidrātu noteikšana

Kopējo ogļhidrātu saturu nosaka izmantojot divpakāpju sērskābes hidrolīzi. Tās nolūkā sausai aļģu biomasai, apmēram 25 mg, pievieno 250 µl 72% sērskābes. Ievieto ūdens vannā uz 60 minūtēm, 30⁰ C, un ik pēc 15 minūtēm ar stikla nūjiņu samaisa, lai novērstu agregāciju. Pēc tam pievieno 7 ml ūdens un inkubē žāvēšanas skapī 1 stundu 121⁰ C. neutralizēšanai izmanto CaCO₃ līdz pH sasniedz 6, un centrifugē 13000 apgr/min. uz 30 sekundēm. Kopējo ogļhidrātu daudzumu mēra izmantojot *Accu chek* asins glikozes mērītāju [97].

Šķidrums hromatogrāfija un kapilārā elektroforēze ir populārākās metodes ogļhidrātu atdalīšanai. Metodes parasti sakombinē ar dažādiem detektoriem, piemēram, fluorescences vai UV detektoru. Ogļhidrātu analīzei AEŠH savienojumā ar fotodiožu matricas detektoru un elektronu izsmidzināšanas jonizācijas masspektrometru, ar iepriekšēju parauga derivatizāciju, uzrāda labus rezultātus ogļhidrātu atdalīšanai no *spirulīnas* sausās biomasas (skatīt 1.7. un 1.8. attēlā). Šajā nolūkā kā kustīgā fāze izmantots acetonitrils un 0,01 mol L⁻¹ amonija acetāta ūdens šķīdums (pH 4,5) un Waters Symmetry Shield RP18 vielu izdalīšanas kolonu. Detektēšana veikta pie viļņu garuma 245 nm [98].



1.7. Att. Tipiska oghidrātu hromatogramma, iegūta ar Waters Symmetry Shield RP18 kolonnu $4,6 \times 250$ mm, $5 \mu\text{m}$ [98]



1.8. Att. Masspektrs nezināmam savienojumam *spirulīnas* polisaharīdā SPPB [98]

1.5.5. Pigmentu noteikšana

Karotinoīdu noteikšanai 3 g *spirulinas* pulvera ekstrahēja ar 25 ml acetona. Šķīdumu atstāja ledusskapī uz 24 stundām un pēc tam centrifugēja 10 minūtes 3000 apgriezienos. Tāpat kā pigmentu gadījumā, 0,5 ml šī šķīduma atšķaidīja 100 reizes un noteica tā optisko blīvumu pie 450 nm [88].

Pētījumā [99] beta-karotīnu noteica ar UV-Vis spektrofotometru. Ekstrakta sagatavošanu veic ultraskaņas vannā 45°C . Analīzi veic trīs ekstrakta atšķaidījumos un trīs dažādos laika posmos. Iegūtos ekstraktus ievieto centrifūgas mēģenē, tiem pievieno KOH un n-heptānu un uzgaida kamēr norit saponifikācijas process un pēc tam paraugi tiek centrifugēti 4200 apgriezienos.

Parauga sagatavošanu veic, kamēr parādās dzeltenbrūns slānis un analīzi veic pie viļņu garuma 436 nm.

Hlorofila satura noteikšanai kā šķīdinātājus var izmantot 95% dietilēteri, 96% metanolu vai 100% acetonu. Uz katru gramu parauga pievieno 50 ml šķīdinātāja. Paraugu homogenizē, filtrē caur 2 slāņu biezu filtru un homogenizē vēlreiz. Hlorofilus nosaka spektrofotometriski pie 400 – 700 nm. Eksperimentāli noskaidrots, ka hlorofils A maksimālo absorbciju uzrāda pie 662 nm, bet hlorofils b pie 646 nm [100].

Augstas izšķirtspējas plānslāņa hromatogrāfija, ļoti labi atdala tādus pigmentus *spirulīnas* paraugos, kā karotenoīdus un hlorofilu. Šajā gadījumā izmantots Camag firmas instruments, ar TLC plāksni (HPTLC SilicaGel 60 F254 plates 20 × 10 cm). Kā mobīlā fāze izmantotas dažādas organisko šķīdinātāju kombinācijas, lai veiksmīgāk un efektīvāk varētu panākt atdalīšanu. Pirmā kustīgā fāze: izmantots petrolētera un acetona maisījums (75:25), otrā – medicīniskā petroleja, izopropilspirts un ūdens maisījums (100:10:0,25), trešā – petrolēteris, cikloheksāns, etilacetāta, acetona un etanola maisījums (60:16:10:10:6) [101].

1.5.6. Fikocianīnu noteikšana

Pareizi izvēlēta ekstrakcijas metode fikocianīnu un fikocianobilīnproteīnu attīrīšanai un sakoncentrēšanai ir atslēga tam, lai iegūtu maksimāli iespējamo vielas daudzumu no aļģēm. Vairākas ciānbaktēriju sugas, tostarp, *spirulīnas* šūnas ir ārkārtīgi izturīgas, tādēļ to ekstrakcijas metodēm jābūt tādām, kas spētu šūnu sienīgas izārdīt un proteīni varētu atbrīvoties. Pigmentu attīrīšanai un sakoncentrēšanai visbiežāk tiek izmantotas šādas ekstrakcijas metodes:

- Sasaldētas biomasas homogenizācija javā diatomīta klātbūtnē, attiecībā 5:1.
- Sasaldēšana un atkausēšana 24 vai 48 stundas, otrajā gadījumā, procedūra atkārtota divas reizes ar 24 stundu starplaiku.
- Neorganisko skābju ekstrakcija: biomasas pakļauta dažādās koncentrācijās (2, 4, 6, 8 un 12 M) sālsskābes iedarbībai, attiecībā 5:1, un atstāta istabas temperatūrā 24 stundas.
- Organisko skābju ekstrakcija: procedūra tāda pati, kā ekstrakcijā ar neorganisku skābi, tikai šajā gadījumā izmantota 1 M etiķskābe.
- Lizocīma terapija. Lizocīmu pievieno biomasai 0,1 mM nātrija fosfāta buferšķīduma klātbūtnē, kas satur nātrija etilēndiamīntetraetiķskābi, iegūstot galīgo koncentrāciju 100 µg/mL⁻¹.

- Apstrāde ar ultraskaņu: biomasu ievieto ultraskaņas vannā uz 40 minūtēm, stikla pārlišu klātbūtnē, attiecībā 1:1,1.
- Ūdens ekstrakcija – biomasu suspendēta ūdenī un pigmentu nosaka spektrofotometriski.
- Homogenizācija – biomasu homogenizē dabiskās smilts klātbūtnē, izmantojot 50 mM nātrija fosfāta buferšķīdums ar pH 6,8, pēc tam ekstraktu centrifugējot.
- Sasaldēšana un atsaldēšana 50 mM nātrija fosfāta buferšķīdums ar pH 6,8 klātbūtnē.
- Homogenizācija – šajā gadījumā biomasu suspendējot 50 mM nātrija fosfāta buferšķīdumā ar pH 6,8, un pakļaujot homogenizācijai 10 minūtes dažādos ātrumos (5, 10, 20 un 1000 apgr./min.).

Tomēr ir minētas arī citas, daudz mazāk lietotas ekstrakcijas metodes, kā ekstrakcija osmotiskā spiedienā, iedarbība ar abrazīvu un iedarbība ar ķīmiskiem reaģentiem [102, 103].

C-fikocianīna identifikācija, izolācija un attīrīšana ir izaicinājums pētniekiem. Šobrīd ir izstrādātas vairākas metodes c-fikocianīna atdalīšanai un attīrīšanai, kas ietver vairākus soļus, tādus kā centrifugēšanu un dialīzi, un vairāku soļu pigmentu attīrīšanu. Turklāt to efektivitātes pacelšana bieži vien ir laikietilpīga un dārga. Līdz pat 90% no ražošanas izmaksām ir saistītas tieši ar attīrīšanas metodi, būtiski ierobežojot to plašo pielietojumu. Attīrīšanai visbiežāk izmanto amonija sulfāta daļiņas kombinācijā ar dažādām hromatogrāfijas metodēm, dodot labus rezultātus. Pie biežāk izmantotākajām pieder jonu apmaiņas hromatogrāfija, jonu stiprības eluācijas vai pH gradienta eluācijas hromatogrāfija un gēla filtrācija. Labus rezultātus var sasniegt arī ar ātrdarbības pretstrāvas hromatogrāfiju izmantojot apgrieztās fāzes micellas šķīdinātāju sistēmu. Ūdens divfāzu ekstrakcija ir vēl viena tehnika fikocianīna attīrīšanai ar augstu efektivitāti [104, 105].

Pie citām metodēm pieder *Expanded Bed* adsorbcijas hromatogrāfija, poliakrilamīda gēla elektroforēze, ātrā proteīna šķidrums hromatogrāfija, rivanola sulfāta procedūra, hidroksilapatīta un hidrofobās mijiedarbības hromatogrāfija [106].

Veiksmīgākai attīrīšanai amonija sulfāts tiek izmantots vairākās koncentrācijās un kā veiksmīgākais tiek atzīts 60% šķīdums. 30 un 50% amonija sulfāta šķīdums, kam seko attīrīšana ar hidroksilapatītu un DEAE Sephadex A-50 kolonnu iegūtā fikocianīna tīrības pakāpe bija nedaudz virs 4,0 % . Savukārt citā pētījumā izmantojot 60% amonija sulfātu, iegūtā pigmenta tīrības pakāpe bija 5,06 % . šajā gadījumā attīrīšanas metodes bija izmantotas tādas pašas, kā izmantojot DEAE-sefarozes CL-6B kolonnu un tai sekojošu Sephadex G-100 kolonnu. Kā trūkumi tiek minēti daudzie soļi attīrīšanas procesā, kas bieži ietver vairāku

hromatogrāfisko metožu izmantošanu. Iegūtais pigments šķīdums ir diezgan atšķaidīts, un tālākai izmantošanai ir nepieciešama tā sakoncentrēšana. Kā arī procesu sarežģītība [105].

Jonu hromatogrāfijā jeb precīzāk anjonu hromatogrāfijā proteīnu, tostarp, pigmentu atdalīšanai, kā jonu avoti kalpo NaCl un HCl šķīdumi, šajā gadījumā izmantojot Q-Sepharose 4 ātrās plūsmas kolonnu (1,5x10) [107].

Hidrofobās mijiedarbības hromatogrāfija izmanto kolonnu, kas pildīta ar metil makro porām 1,5 x 20 cm. Kā kustīgā fāze izmatots $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ar plūsmas ātrumu 1 ml/min [107].

Divpakāpju ūdens ekstrakcija, ir ekstrakcijas un attīrīšanas metode, kuras pamatā biomolekulas sadalās starp divām vai vairākām savstarpēji nesajaucamām ūdens fāzēm. Šī metode ir efektīva, ekonomiska, un var sasniegt augstu tīrības pakāpi un reģenerāciju, vienlaikus saglabājot molekulas aktivitāti. Šajā gadījumā iepriekš neapstrādātam c-fikocianīna ekstraktam pievienoja iepriekš nosvērtus polietilēnglikola un kālija fosfāta daudzumus. Maisījumu apmēram stundu vienmērīgi maisīja, lai panāktu līdzsvaru, un pēc tam atstāj uz nakti, lai maisījums noslāņotos. Šo metodi apvieno jau ar zināmo jonu apmaiņas hromatogrāfiju. Kā kustīgā fāze izmantota NaCl šķīdums, kura koncentrāciju atdalīšanas procesā lineāri palielina [105].

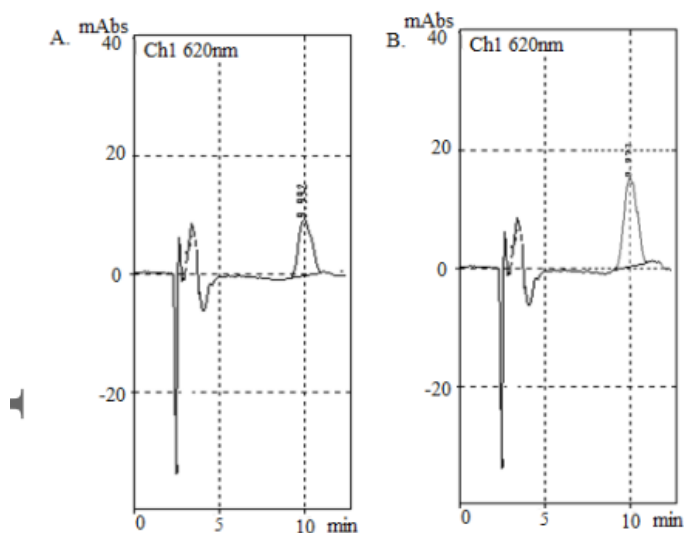
7% poliakrilamīda gēla elektroforēze – šajā metodē 10 – 50 g biliproteīna dializāta tika izšķīdināts krekinga buferšķīdumā ar pH 7, kas satur ~ 2 nātrija dodecila sulfāta + 1-merkaptotanolu. Maisījumu vāra 5 minūtes. Elektroforēze tika veikta pie sprieguma 100 V, un strāvas 12,5 A, 4 stundas [109, 110].

Hidroksilapatīta hromatogrāfija ir jauna un mazlietota metode pigments attīrīšanai. Šajā metodē 500 mg ekstrakta suspendē 50 ml 100 mM nātrija buferšķīduma ar pH 7, pievienojot amonija sulfāta pulveri, un ļauj nostāvēties 60 minūtes 4^o C. Pēc tam centrifugē 10 000 × g 30 min 4^o C. Nogulsnes izšķīdina nelielā tilpumā 5 mM Na-fosfāta buferšķīdumā ar pH 7,0 un atstāj dializēties uz nakti pie 4^o C, pret vienu un to pašu buferšķīdumu. Tad fikocianīnu ievieto 2,5 cm × 25 cm hidroksilapatīta kolonnā, un atdala izmantojot Na buferšķīdumu (pH 7), ar palielinātu jonu stiprību (no 5 – 150 mM). Pēc centrifugēšanas, zilās krāsas nogulsnes izšķīdina 150 mM Na-fosfāta buferšķīdumā ar pH 7,0 un dializē pret to pašu buferšķīdumu [111].

Rivanola sulfāta procedūra, kuras pamatā neapstrādātu ekstraktu pakļauj rivanola ūdens šķīduma iedarbībai, kombinētas jonu apmaiņas hromatogrāfijas apstākļos, izmantojot Sephadex G-25 (50,0/2,0 cm) kolonnu. Kā kustīgo fāzi izmantots ekstrakta buferšķīdums [112].

Proteīnu atdalīšana ar AESH veikta izmantojot apgrieztās fāzes proteīnu kolonnu Vydac C-4 (250 mm × 4,6 mm), kas pildīta ar 5 μm poraina butil-silīcija dioksīda daļiņām. Plūsmas ātrums analīzei tika uzturēts 1 ml/min. Šajā pētījumā kā kustīgā fāze izmantots acetonitrils ar 0,1% trifluoretiķskābi [113]. Citā pētījumā [104] hromatogrāfiskā analīze proteīnu atdalīšanai veikta izmantojot Orbit 100 C4, 5 μm, 250 × 4,0 mm kolonnu un 0,1% trifluoretiķskābes ūdens maisījumu, un acetonitrilu, kurš satur 0,1% trifluoretiķskābi kā kustīgo fāzi, pie plūsmas ātruma 0,8 ml/min.

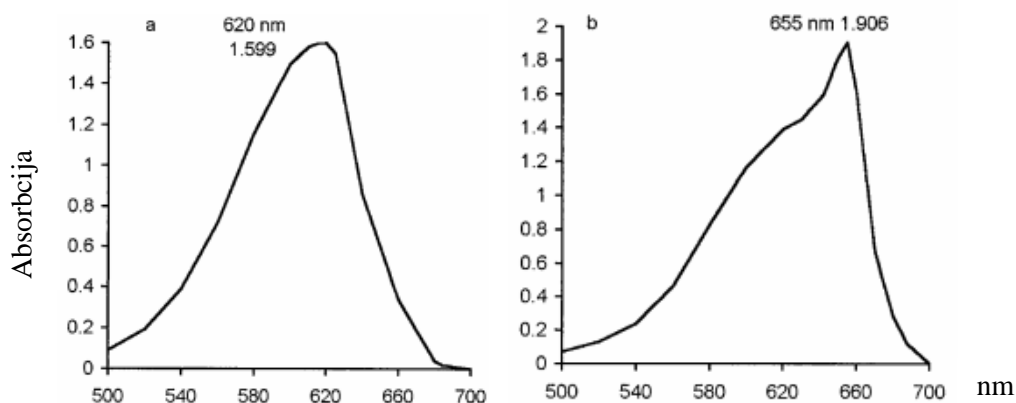
Rutīnas analīzēm fikocianīnu un allofikocianīnu ekstraktus var analizēt, izmantojot HPLC metodi ar Bio-Gel HPHT kolonnu, 10 × 0,78 cm, 10 μm. Kā kustīgo fāzi izmantojot fosfāta buferšķīdumu - 1 mM (pH 7,0) – A kanāls un 250 mM fosfāta buferšķīdums (pH 7,0) – B kanāls. Abiem buferšķīdumiem kā piedevu jāsatur 0,1 M NaCl un 1 mM NaN₃. Gradianta programma sekojoša: 6 minūtes izokrātiski apstākļi, ar kustīgās fāzes sastāvu 80% A un 20% B šķīduma, pēc tam 2 minūtēs to izmaina līdz 100% B šķīduma, šādu sastāvu uzturot 7 minūtes. Detektēšanai izmantots UV detektors pie 650 nm allofikocianīnam un 620 nm fikocianīnam (skatīt 1.9. un 1.10. attēlu) [114].



1.9. Att. Fikocianīna hromatogramma a) produktam, kur fikocianīns identificēts, b) ekstraktam, kas iegūts no *Arthrospira Plantesis*, pie 620 nm [104].

Kvalitatīvai fikocianīnu noteikšanai 3g *S. Plantesis* atšķaidīja ar 100 ml dejonizēta ūdens un dekantēja. Pēc tam 20 ml šī šķīduma centrifugēja 10 minūtes 3000 apgriezienos, un 0,5 ml šķīduma atšķaidīja vēl 100 reizes ar destilētu ūdeni. Iegūtā ekstrakta optisko blīvumu noteica spektrofotometriski pie 615 un 652 nm (skatīt 1.10. attēlā) [114]. Mahadev pētījumā [115] fikocianīnu ekstrahēja, izmantojot dažādas ekstrakcijas metodes, bet visos gadījumos ekstraktus uzturēja 40 °C 24 stundas un tikai tad spektrofotometriski mērija. Kvantitatīvai

analīzei ir jā sagatavo standarti un jā veic to kalibrācija. Pēc tam izrēķinot parauga koncentrāciju [116, 117].



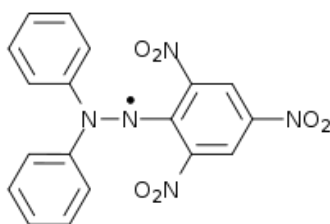
1.10. Att. Absorbēcijas spektrs a) fikocianīnam, b) allofikocianīnam [114]

1.5.7. Antiradikālā aktivitāte

Antiradikālā aktivitāte (ARA) ir viens no galvenajiem raksturlielumiem, kas norāda uz bioloģiski aktīvo vielu un savienojumu spēju aizsargāt šūnas un organismu kopumā no brīvajiem radikāļiem un to uzkrāšanās. Metode īpaši piemērota dažādu augu, uztura bagātinātāju un kosmētikas komponentu raksturošanai.

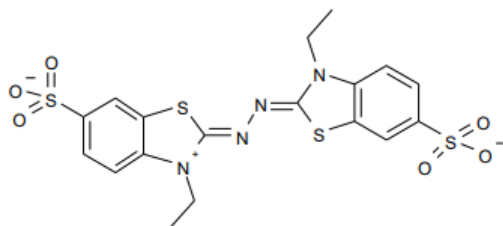
Pietam noteiktā antiradikālā aktivitāte atšķiras starp pielietotajām testēšanas metodēm. Tāpēc precīzākiem rezultātiem iesaka izmantot dažādas metodes. Kā iekšējo standartu var izmantot askorbīnskābi jeb C vitamīnu un troloksu, kopā ar tādiem brīvajiem radikāļiem, kā piemēram, DFPH un ABTS. Antiradikālo aktivitāti var noteikt arī ar FRAP metodi [118].

DFPH jeb 2,2-difenil-1-pikrilhidrazils ir tumšs kristālisks pulveris. Tā struktūrformula parādīta 1.11. attēlā. Tam ir divi galvenie pielietojumi ķīmijas analīzēs. Pirmkārt, kā brīvais radikālis, antiradikālās aktivitātes mērījumos un, otrkārt, kā iekšējais standarts elektronu paramagnētiskās rezonanses signāla un intensitātes novērtēšanā. Tas ir biežāk lietotais brīvais radikālis, kurš savu absorbēcijas maksimumu sasniedz pie 515 nm.



1.11. att. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DFPH) radikāļa strukturformula

2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolīn-6-sulfonāta) (ABTS) ir brīvais radikālis (skatīt 1.12. attēlu), kurš tiek izmantots pētīt specifisku enzīmu reakcijas kinētiku, kā arī novērotu specifisku molekulu saistīšanos. Tā izmantošana antiradikālās aktiviātes mērījumos ir elastīgāka, jo to ir iespējams pielietot dažādās pH vidēs, atšķirībā no DFPH. ABTS absorbcijas maksimumu sasniedz pie 734 nm.



1.12. att. 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolīn-6-sulfonāta) (ABTS) radikāļa struktūrformula [119]

Troloks jeb 6-hidroksi-2, 5, 7, 8-tetrametilhromāna-2-karbonskābe ir ūdenī šķīstošs antioksidants, vitamīna E analogs. Lieto bioloģiskos un bioķīmiskos testos, lai novērtētu antiradikālo un antioksidatīvo darbību [119].

Pilnīgu antioksidatīvo aktivitāti var noteikt ar dzelzs reducējošo antioksidanta indikatoru (FRAP). Šis šķīdums sastāv no 300 mM acetāta buferšķīduma ar pH 3,6, 10 mM 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazīna, un 50 mM FeCl₃·6H₂O proporcijās 10:1:1 (v/v/v). Analīzei izmanto 75 μl *spirulīnas* ekstrakta, kam pievieno 2 ml FRAP reaģentu un 12 minūtes šo šķīdumu maisa. Iegūtā šķīduma absorbcija tiek mērīta pie 593 nm. Vitamīns C jeb askorbīnskābe tiek izmantota standartlīknes pagatavošanai, un rezultāti izteikti mg uz askorbīnskābes ekvivalentu pret sauso masu g. Metode balstās uz O-Fenantrolīna-Fe²⁺ kompleksa veidošanos un sabrukšanu helātu veidojošo aģentu klātbūtnē. Iegūtie rezultāti apstiprināja analizēto *spirulīnas* paraugu augsto radikālo aktivitāti [88].

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Darbā analizēto paraugu raksturojums

Visi paraugi, kuri analizēti kursa darba ietvaros, tika iegādāti mazumtirdzniecības vietās.

1. Paraugs – Spirulina Diet 100 N115 tabl. Neto masa 45 g, ražotājs Hankintatukku OY, Lehtolankatu 18, FI 03600, Karkkila, Somija.

Sastāvs: 1 tabl. satur 360 mg aļģes *Spirulina*. Palīgvielas – apjoma palielinātājs E460 (celuloze), glazētājviela E470b (tauskābju magnija sāļi), pretsalīpšanas viela E551 (silīcija dioksīds).

2. Paraugs – Spirulina N180 tabl. Neto masa 128 g, ražotājs Swanson Health Products Inc, ASV.

Sastāvs: 1 tabl. Satur 500 mg mikroaļģes *Arthrospira plantensis*. Palīgvielas – stabilizētājs E170 (kalcijs karbonāts), biezinātājs E460 (mikrokristāliskā celuloze), pretsalīpšanas viela E470b (stearīnskābe, magnija stearāts), iridētājs E468 (šķērsšūtās karboksimetilcelulozes nātrija sāļi), glazētājviela E904 (šellaka).

3. Paraugs – Spirulīnas tabletes N380, Neto masa 190 g, izcelsme Ķīna. Fasētājs: SIA “Smartfoody”, Skolas iela 25 – 1, Rīga, Latvija

Sastāvs: 1 tabl. Satur 500 mg mikroaļģes *Arthrospira plantensis*.

4. Paraugs – Spirulīnas pulveris, Neto masa 180 g, izcelsme Ķīna. Fasētājs: SIA “Smartfoody”, Skolas iela 25 – 1, Rīga, Latvija.

Sastāvs: mikroaļģes *Arthrospira plantensis* pulveris.

5. Paraugs – Spirulīnas pulveris 100%, Neto masa 150 g, izcelsme Ķīna. Ražots Polijā pēc SIA “DietMarket” pasūtījuma. Šmerļa iela 3, Rīga, LV-1006, Latvija.

Uzturvērtība 100g: enerģētiskā vērtība 309kcal, Olbaltumvielas 56,6 g, Tauki 4,1 g, Oglhidrāti 11,3 g, soda, rupjais malums 16,4 g.

2.2. Paraugu sagatavošana

Paraugu sagatavošanas ietvaros tika izvēlēti divi ekstrakcijas veidi ar dažādiem šķīdinātājiem:

1. Dejonizēts ūdens.
2. 80% metanola šķīdums ūdenī.

Centrifūgas mēģenē uz analītiskajiem svāriem nosver ± 1 g parauga (skatīt 2.6. tabulu). Paraugus tablešu formā vispirms pietā sasmalcina līdz smalkam pulverim, tad:

- pievieno 50 ml attiecīgo reaģentu (ūdeni, 80% metanolu);
- liek ultraskaņas vannā uz 60 minūtēm;
- centrifugē 4000 apgriezīenos 5 minūtes;
- filtrē, izmantojot 0,45 μ M filtrus (MS NylonSyringeFilters);
- iegūtos filtrātus uzglabā leduskapī +4°C līdz analīžu veikšanai.

2.6. Tabula

Paraugu iesvari

Paraugs	Iesvars, g
1. Paraugs	1,0080
2. Paraugs	1,0045
3. Paraugs	1,0011
4. Paraugs	1,0072
5. Paraugs	1,0071

2.3. Izmantotās laboratorijas iekārtas un piederumi

- Elisa mikroplašu lasītājs “BIOBASE-ELI10A” (Cold Chain System Co., Ltd., China);
Uzņemšanas diapazons (viļņu garums): 400,0 – 999,0 nm, izšķiršanas spēja: 2 nm, spektrālais filtrs: 405, 450, 492, 630, 510, 515, 770 nm.
- Šķīdumu hromatogrāfijas iekārta Agilent 1290 ar kolonnas un paraugu termostatu, nepārtrauktu kustīgās fāzes degazēšanas iekārtu, automātisko paraugu injicēšanas iekārtu un diožu matricas detektoru (DAD) (Agilent Technologies, Vācija).
- Augstas izšķirtspējas masas spektrometrs Agilent 6230 TOF LC/MS (Agilent Technologies, Vācija).
- Analītiskie svāri XB 220 A Precisa ($\Delta m \pm 0,0001$) g.

- Analītiskie svāri “METTLER TOLEDO ME204” ($\Delta m \pm 0,0001$) g.
- Analītiskie svāri “BOECO BP831” ($\Delta m \pm 0,0001$) g.
- Fotometrs KFK-3, spektrālais diapazons 315 – 990, ar precizitāti 0,001 A.
- Ultraskaņas vanna “BRAUSONIC 221”, sērijas nr. 350183.
- Centrifūga “Jouan centrifuga B4i”, sērijas Nr. 30102787 (Thermo Fisher Scientific, Vācija).
- Vortex maisītājs “YellowLine TTS 2”.
- Automātiskās mikropipetes “Sartorius” (1 – 100 μL ; 100 – 1000 μL).
- Multipipete, 8-kanālu.
- Pipešu uzgaļi “Sarstedt” (Nümbrecht, Germany).
- Filtri paraugu filtrēšanai (0,45 μm MS NylonSyringeFilters).
- 96 lauciņu mikroplates “Sarstedt” (Nümbrecht, Germany).
- 1, 2, 5, 10 mL pipetes, B klase.
- 25 mL mora pipete, B klase.
- 50, 100, 250 mL mērkolbas.
- Piesta ar piestalu.
- Stikla nūjiņas.
- Kroku filtri, diametrā 10 cm.
- Centrifūgas mēģenes, 50 mL.
- Plastmasas vienreizējās pipetes.

2.4. Izmantotie reaģenti

Dzelzs (II) un (III) jonu noteikšanai

- Fe^{3+} jonu standartšķīdums $\gamma_{\text{Fe}}=0,1$ mg/mL;

Gatavo: 23,8167 mg $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ šķīdina 50 mL dejonizētā ūdenī.

- Fe^{2+} standartšķīdums ar masas koncentrāciju 0,1 mg/mL;

Gatavo: 59,8021 mg $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ šķīdina 250 mL dejonizētā ūdenī.

- Sulfosalicilskābe 20 %;

Gatavo: 10 g vielas šķīdina 50 mL ūdens.

- Amonija buferšķīdums $\text{pH} = 10$;

Gatavo: 27 g NH_4Cl , izšķīdina dejonizētā ūdenī, pievieno 175 mL konc. NH_4OH un ar dejonizētu ūdeni uzpilda līdz 500 mL atzīmei.

- Hidroksilamīna hidrohlorīds 10%;

Gatavo: 10 g tīras vielas šķīdina 100 mL dejonizēta ūdens.

- Sērskābe 2 M;

Gatavo: ņem 55,83 ml skābes un uzmanīgi lej klāt 500 mL dejonizēta ūdens.

- 1,10-fenantrolīns 1 g/L;

Gatavo: 250 mg vielas šķīdina 250 dejonizēta mL ūdens.

Antiradikālās aktivitātes noteikšanai ar DFPH

- 2,2 – difenil – 1 – pikrilhidrazils (DFPH) (Sigma – Aldrich), 150 μ M ;

Gatavo: 1,7 mg reaģenta šķīdina 28,8 mL metanolā.

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhromāna-2-karbonskābe (Trolox) (Sigma – Aldrich), 10 mM;

Gatavo: 12,5 mg antioksidatīvā reaģenta šķīdina 5 mL metanolā.

Kopējo fenolo savienojumu noteikšana

- Gallusskābes monohidrāts (Sigma – Aldrich), 2 mg/mL;

Gatavo: 10 mg skābes šķīdina 5 ml 50% metanola.

- Nātrija karbonāts (Sigma – Aldrich), 7%;

Gatavo: 700 mg Na₂CO₃ šķīdina 10 ml H₂O.

- Folin – Ciocalteu 1:1 ar dejonizētu ūdeni (Sigma – Aldrich).

Aminoskābju analīze, izmantojot AEŠH/MS

- Acetonitrils 100% (LiChrosolv – Merck).

- Skudrskābe 0,1% (Sigma – Aldrich) (1mL skudrskābes atšķaida līdz 1 L dejonizēta ūdens).

- L-Tirozīns 99% (Alfa Aesar) (9,3 mg šķīdina 10 ml dejonizēta ūdens).

- Dejonizēts ūdens – dejonizēts laboratorijā ar “Adrona Crystal 5”, elektrovadītspēja <0,3 μ S.

2.5. Spektrofotometriskā kopējo fenolo savienojumu noteikšana *spirulīnas* ekstraktos

Standartšķīdumu pagatavošana

Kopējo fenolu kvantitatīvai noteikšanai izmanto metodi, kas iepriekš aprakstīta [120]. Standartšķīdumu atšķaidījumus gatavoja no galluskābes izejas standartšķīduma ar koncentrāciju 2 mg/mL. Sākumā tika pagatavota galluskābes standartšķīdumu sērija ar sekojošām koncentrācijām 0,025; 0,035; 0,050; 0,075; 0,100; 0,150 un 0,200 mg/mL (skatīt 2.7. tabulā). Alikvotās daļas no šķīdumiem pārnesot ependorfos, atšķaidot ar 50% metanolu un samaisot.

2.7. tabula

Galluskābes seriālo atšķaidījumu sērija

Standarta Nr. p. k.	Konc., mg/mL	Galluskābes μ L no iepriekšējā atšķaidījuma	MeOH 50%, μ L
G	0,200	150	1350
F	0,150	1125	375
E	0,100	1000	500
D	0,075	1125	375
C	0,050	1000	500
B	0,035	1050	450
A	0,025	1071	429

Paraugu sagatavošana un analīze

Kopējo fenolu noteikšanai izmantoja 100% *spirulīnas* ūdens ekstrakta šķīdumus (skatīt 2.8. tabulu). 96 lauciņu mikroplates katrā lauciņā pievienoja 75 μ L dejonizētā ūdens. Pēc tam pievienoja 25 μ L attiecīgos galluskābes standartšķīdumus triplikātos un pagatavotā parauga ekstraktus pa trīs atkārtojumiem katrā lauciņā. Pēc tam visiem lauciņiem pievienoja 25 μ L *Folin-Ciocalteu* reaģenta (attiecībā 1:1 ar dejonizētu ūdeni), samaisīja ar orbitālo maisītāju un sešas minūtes inkubēja tumsā. Tad pievienoja 100 μ L 7% nātrija karbonāta šķīduma, samaisīja un 90 minūtes inkubēja tumsā. Plati kratīja 60 sekundes un ar mikroplašu lasītāju nolasi katra parauga absorbciju pie 770 nm. Kopējo fenolu noteikšanai izmantoja 100% *spirulīnas* ūdens ekstraktus (skatīt 2.8. tabula). Metodes kontrolei izmantoja galluskābi un augu paraugu nesaturošo analītu (75 μ L H₂O/25 μ L 50% MeOH) trīs replikātos.

No iegūtajiem absorbcijas mērījumiem konstruēja galluskābes kalibrēšanas grafiku, uz y ass atliekot izmērītās absorbcijas vērtības un uz x ass - galluskābes koncentrāciju. Kopējo fenolu saturu augu paraugos noteica pēc iegūtā kalibrēšanas grafika taisnes vienādojuma,

iekļaujot pārrēķinu uz 100% ekstraktu un fenolu saturu izsakot galluskābes ekvivalentos (GSE) mg uz 1 gramu parauga.

2.8. tabula

Mikroplates shēma kopējo fenolu noteikšanai shēma

Galluskābes standarti			Paraugu sērija								
0,025	0,025	0,025	1_1	1_1	1_1	3_1	3_1	3_1	5_1	5_1	5_1
0,035	0,035	0,035	2_1	2_1	2_1	4_1	4_1	4_1	1_1	1_1	1_1
0,05	0,05	0,05	3_1	3_1	3_1	5_1	5_1	5_1	2_1	2_1	2_1
0,075	0,075	0,075	4_1	4_1	4_1	1_1	1_1	1_1	3_1	3_1	3_1
0,1	0,1	0,1	5_1	5_1	5_1	2_1	2_1	2_1	4_1	4_1	4_1
0,15	0,15	0,15	1_1	1_1	1_1	3_1	3_1	3_1	5_1	5_1	5_1
0,2	0,2	0,2	2_1	2_1	2_1	4_1	4_1	4_1			
Negatīvā kontrole			Negatīvā kontrole			Negatīvā kontrole			Negatīvā kontrole		

1_1 100% ekstrakts

2.6. *Spirulīnas* ekstraktu antiradikālās aktivitātes noteikšana

Standartšķīdumu pagatavošana

Antiradikālās aktivitātes noteikšanai izmantoja 100% *spirulīnas* ūdens ekstraktus.

Antiradikālās aktivitātes kvantitatīvajai noteikšanai *spirulīnas* ekstraktos sākumā pagatavoja troloksa standartšķīdumu sērijas ar sekojošām koncentrācijām 0,50; 0,40; 0,30; 0,20; 0,15; 0,075; 0,0375 un 0,0188 mM (skatīt 2.9. tabulu). Atšķaidījumus gatavoja no reaģenta izejas standartšķīduma ar koncentrāciju 10 mM, alikvotās daļas pārnesot ependorfos, atšķaidot ar 50% metanolu un samaisot ar Vortex maisītāju.

Troloksa seriālie atšķaidījumi

Troloksa Nr.p.k.	Stand. Izejas šķ.	Troloksa konc. mM	μL troloksa no iepriekšējā atšķaidījuma	CH ₃ OH, μL
Stock.	Izejas šķ.	10		
A		0,5	75	1425
B		0,4	1200	300
C		0,3	1125	375
D		0,2	1000	500
E		0,15	1125	375
F		0,075	750	750
G		0,0375	750	750
H		0,0188	752	748

Paraugu sagatavošana un analīze

96 lauciņu mikroplates katrā lauciņā pievienoja 20 μL troloksa standartšķīduma vai pagatavotā parauga ekstrakta triplikātos, kam sekoja 180 μL 150 μM DFPH metanola šķīduma pievienošana un 1 stundas inkubēšana tumsā. Plati pēc inkubēšanas kratīja 60 sekundes un ar mikroplašu lasītāju nolasīja absorbciju pie 515 nm.

Metodes kontrolei tika izmantoti DFPH seriālie atšķaidījumi (100; 50; 25; 12,5 un 6,25 μM) (skatīt 2.10. tabulu), DFPH kontrole ar metanolu (20 μL MeOH/180 μL 150 μM DFPH) un tukšā kontrole jeb *blank* (200 μL 80% MeOH).

DFPH seriālo atšķaidījumu sērija

DFPH konc., μM	DFPH μL no iepriekšējā atšķaidījuma	MeOH 96%, μL
150		0
100	1000	500
50	750	750
25	750	750
12,5	750	750
6,25	750	750

Antiradikālās aktivitātes noteikšanai izmantoja 100% ūdens ekstraktu šķīdumus.

No iegūtajiem absorbcijas mērījumiem konstruēja troloksa kalibrēšanas grafiku, uz y ass atliekot izmērītās absorbcijas vērtības un uz x ass – askorbīnskābes koncentrāciju. Aļģu paraugu antiradikālo aktivitāti noteica pēc iegūtā kalibrēšanas grafika taisnes vienādojuma,

iekļaujot pārrēķinu uz 100% ekstraktu un ARA izsakot mg troloksa ekvivalentu uz 1 gramu parauga.

2.7. Fe(III) un (II) jonu noteikšana *Spirulīnas* paraugos

Kalibrēšanas grafiks Fe^{3+}

100 mL mērkolbā gatavo atšķaidītāku Fe^{3+} jonus saturošu standartšķīdumu ar koncentrāciju $\gamma_{Fe} = 0,01$ mg/mL. Tā nolūkā 10 mL izejas standartšķīduma pārnes 100 mL mērkolbā un atšķaida ar dejonizētu ūdeni. Kalibrēšanas grafika konstruēšanai piecās 50 mL mērkolbās pārnes 1, 2, 4, 6, 8 ml sagatavoto standartšķīdumu (skatīt 2.11. tabulu). Visās mērkolbās klāt pievieno 1,0 ml 20 % sulfosalicilskābes šķīduma un 10 mL amonija buferšķīduma (pH=10). Sestajā mērkolbā gatavo salīdzināšanas šķīdumu, kurā ieliets tikai sulfosalicilskābes šķīdums un buferšķīdums. Visu kolbu saturu atšķaida ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei un rūpīgi samaisa. Izmēra iegūto šķīdumu gaismas absorbciju pret salīdzināšanas šķīdumu kivetēs ar slāņa biezumu 5 cm pie $\gamma = 490$ nm, izmantojot *Fotometru KFK-3*. Konstruē kalibrēšanas grafiku uz y ass ievietojot gaismas absorbcijas intensitāti, uz x ass šķīduma koncentrāciju.

2.11. tabula

Kalibrēšanas grafika standartšķīdumu sagatavošana

Mērkolbas nr.	V _{standartšķīdums} , ml	$\gamma_{\text{standartšķīdumam}}$, mg/L
1.	0	0
2.	1	0,2
3.	2	0,4
4.	4	0,8
5.	6	1,2
6.	8	1,6

Analizējamā parauga sagatavošana Fe^{3+} jonu noteikšanai

Spirulīnas paraugu nosver uz analītiskajiem svāriem (sver ar precizitāti $\pm 0,0001$ g) un šķīdina 100 mL mērkolbā dejonizētā ūdenī. Tablešu paraugiem, vispirms 1 tableti sasmalcina pietā līdz smalkam pulverim. Pēc šķīdināšanas ar kroku filtru nofiltrē. 10 ml filtrāta pārnes 250 ml mērkolbā un atšķaida ar dejonizētu ūdeni. Pēc tam 25 ml iegūtā šķīduma pārnes trīs 50 mL mērkolbās. Pēc tam visās sešās mērkolbās pievieno 1,0 mL 20 % sulfosalicilskābes šķīduma un 10 mL amonija buferšķīduma (pH=10). Izmēra iegūto šķīdumu gaismas absorbciju pret salīdzināšanas šķīdumu kivetēs ar slāņa biezumu 5 cm pie $\gamma = 490$ nm.

Kalibrēšanas grafiks Fe^{2+}

Vispirms tiek sagatavoti Fe^{2+} standartšķīduma saturoši šķīdumi ar 6 dažādām masas koncentrācijām un vienu salīdzināmo šķīdumu bez Fe^{2+} standartšķīduma. Tā nolūkā no sagatavotā standartšķīduma 100 ml mērkolbās tiek pārnesti 1, 2, 4, 6, 8 un 10 ml standartšķīduma (skatīt 2.12. tabulu). Tālāk katrai mērkolbai pievieno 1 ml hidroksilamīna hidrohlorīdu, 10 ml fenantrolīna reaģenta un 8 ml sērskābes. Salīdzināmais šķīdums tiek gatavots tāpat, bet nepievienojot standartšķīdumu. Visu kolbu saturu atšķaida ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei un rūpīgi samaisa. Izmēra iegūto šķīdumu gaismas absorbciju pret salīdzināšanas šķīdumu kivetēs ar slāņa biezumu 1 cm pie $\gamma = 508$ nm, izmantojot *Fotometru KFK-3*. Konstruē kalibrēšanas grafiku uz y ass atzīmējot gaismas absorbcijas intensitāti, uz x ass šķīduma koncentrāciju.

2.12. tabula

Kalibrēšanas grafika standartšķīdumu sagatavošana

Mērkolbas nr.	$V_{\text{standartšķīdums, ml}}$	$\gamma_{\text{standartšķīdumam, mg/L}}$
1.	1	1
2.	2	2
3.	4	4
4.	6	6
5.	8	8
6.	10	10

Analizējamā parauga sagatavošana Fe^{2+} jonu noteikšanai

Spirulīnas paraugus nosver uz analītiskajiem svariem (sver ar precizitāti $\pm 0,0001$ g) un šķīdina 100 mL mērkolbā dejonizētā ūdenī. Tablešu paraugus vispirms piestā sasmalcina līdz smalkam pulverim. Pēc šķīdināšanas, izmantojot kroku filtru, nofiltrē. 10 ml filtrāta pārnes 250 ml mērkolbā un atšķaida ar dejonizētu ūdeni. Pēc tam 25 ml iegūtā šķīduma pārnes trīs 100 mērkolbās. Katrā mērkolbā pievieno 1 ml hidroksilamīna hidrohlorīdu, 10 ml fenantrolīna reaģenta un 8 ml sērskābes. Kolbu saturu atšķaida ar dejonizētu ūdeni un nosaka gaismas absorbciju pret salīdzināšanas šķīdumu kivetēs ar slāņa biezumu 1 cm pie $\gamma = 508$ nm.

2.8. Spirulīnas ekstraktu ķīmiskā sastāva noteikšana, izmantojot AEŠH/MS

Hromatogrāfiskās analīzes dati aminoskābju sastāva noteikšanai:

- Hromatogrāfiskā kolonna Intrada Amino Acid (3,0 x 50 mm,) (Imtrakt Corp., Japāna).
- Kustīgā fāze gradienta apstākļos (skatīt 2.13. tabulu): A kanāls – 100 mM NH₄COOH, B kanāls – 0,1% skudrskābe acetonitrilā.
- Parauga injekcijas tilpums – 5 µL.
- Kolonnas temperatūra – 35 °C.

2.13. tabula

Kustīgās fāzes gradienta režīms

Laiks, min	A, %	B, %	Plūsmas ātrums, mL/min
3,0	14,0	86,0	0,6
10,0	100,0	0,0	
12,0	14,0	86,0	
14,0	14,0	86,0	

Hromatogrāfiskās analīzes dati fenolo savienojumu noteikšanai:

- Apgrieztās fāzes hromatogrāfijas kolonna “XBridge C8” (2,1 x 150 mm, 3,5 µm) (Waters Corporation, Ireland).
- Kustīgās fāze gradienta apstākļos (skatīt 2.14. tabulu): A kanāls – dejonizēts ūdens/0,1% skudrskābe, B kanāls – acetonitrils.
- Parauga injekcijas tilpums – 20 µL.
- Kolonnas temperatūra – 40 °C.

2.14. tabula

Kustīgās fāzes gradienta režīms

Laiks, min	A, %	B, %	Plūsmas ātrums, mL/min
1,0	98,0	2,0	0,3
10,0	5,0	95,0	
20,0	5,0	95,0	
22,0	98,0	2,0	
25,0	98,0	2,0	

Masspektrometrijas dati:

- Elektronu izsmidzināšana pozitīvajā režīmā (ESI+).
- Paātrinājums – 4000 V.
- Skenēšanas diapazons – m/z 70 – 1500.
- Fragmentēšanās spriegums – 130 V.
- Iekšējais masu kalibrācijas šķīdums – 121,050873 m/z un 922,009798 m/z (G1969-85001 ES-TOF Reference Mass Solution Kit, Agilent Technologies & Supelco) tika izmantots visu analīžu laikā.

Aminoskābju kalibrēšanas grafiki noteikšanai ar AEŠH/MS

9,3 mg aminoskābes tiroksīna iesvērta un izšķīdināta 10 ml dejonizēta ūdens. Tālāk sagatavo aminoskābes atšķaidījumus ar sekojošām to koncentrācijām 1000, 500, 250, 100, 50, 10, 1 µg/ml. Katru pagatavoto šķīdumu hromatogrāfiskajā sistēmā ievada trīs reizes. Iegūtajās hromatogrammās nointegrē atbilstošās aminoskābes joslu, iegūst to laukumu. Konstruē kalibrēšanas grafiku uz y ass liekot iegūto joslu vidējos laukumus, uz x ass - koncentrāciju.

Paraugu sagatavošana fenolo savienojumu noteikšanai ar AEŠH/MS

Pētāmo *spirulīnas* paraugu aminoskābju sastāva novērtēšanai izmantoja ūdens ekstraktus. Ķīmiskā sastāva novērtēšanai izmantoja ūdens un 80% metanola *spirulīnas* ekstraktu šķīdumus, pārnestus hromatogrāfiskajās pudelītēs. Paraugi tika analizēti, izmantojot *Agilent 1290* šķīdumu hromatogrāfu, kas saslēgts ar augstas izšķirtspējas masas spektrometru *Agilent 6230 TOF LC/MS*. Analīzes apstākļi ir atrodami 2.7. nodaļā. AEŠH/MS analīzes rezultātā iegūtās hromatogrammas tika apstrādātas, izmantojot *MassHunter Qualitative Analyses B.07.00* datu apstrādes sistēmu. Bioloģiski aktīvie savienojumi identificēti atbilstoši to precīzajām masām, izmantojot *Phenol – Explorer [121]* un *3 - D Lipid Data Bank [122]* brīvpiekluves *online* datubāzes.

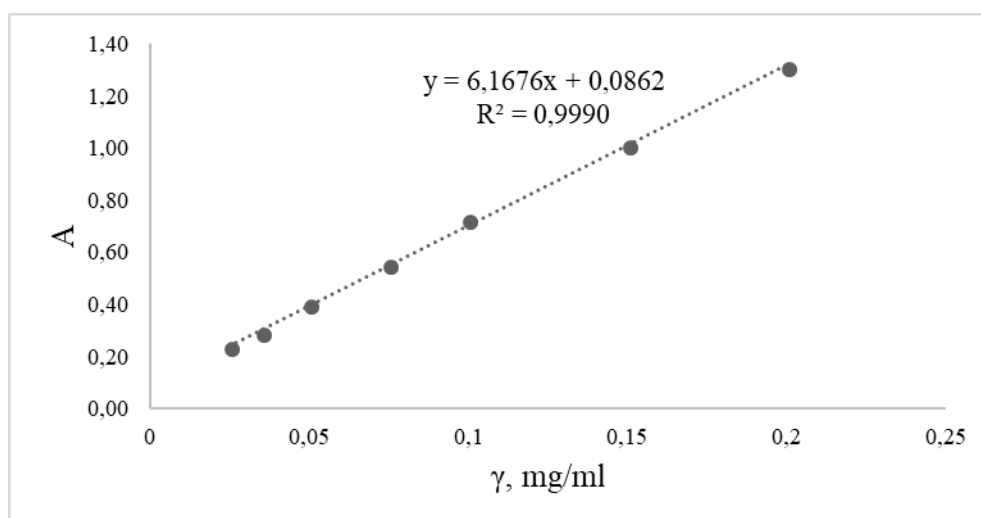
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Latvijā, lai pierēģistrētu un izplatītu vairumtirdzniecības un mazumtirdzniecības vietās uztura bagātinātājus, nav nepieciešamība uzrādīt atsevišķus ziņojumus par drošības, efektivitātes un sastāva pētījumiem. Šīs procedūras ievērojami atšķiras, no tām, kas jāveic zāļu reģistrēšanai. Tostarp, ja zālēm ir jābūt klāt zāļu instrukcijai, tad uztura bagātinātāju marķēšana vien aprobežojas ar teorētiskā sastāva, teikuma par farmakoloģisko aktivitāti, ražotāja un reģistrācijas apliecības turētāja kontaktu atspoguļošanu. Pieņemot, ka ražotājs uztura bagātinātāju ražošanā izmanto savas metodes un piedevas, kuras var atšķirties, ievērojami var atšķirties arī paša gala produkta īpašības. Pamatojoties uz to, šī maģistra daba mērķis bija noteikt ķīmisko vielu analīzi dažos Latvijā sastopamajos uztura bagātinātājos ar spirulīnu sastāvā, savā starpā tos salīdzinot. Tā ietvaros tika iegādāti pieci *spirulīnas* farmaceitiskie produkti, kas atšķiras savā starpā ar formu un/vai ražotāju.

Par *spirulīnas* ķīmisko vielu sastāvu liecina daudzu valstu zinātnieku publicēti raksti, pārskati un pētījumi. Ņemot par pamatu šo literatūru, tālāk analizēti šie produkti.

3.1. Spektrofotometriskā kopējo fenolo savienojumu noteikšana *spirulīnas* ekstraktos

Fenolo savienojumu noteikšanai tika izmantota spektrofotometriskā mikroplašu metode ar gallusskābes standartšķīdumu sēriju, koncentrāciju diapazonā no 0,025 līdz 0,200 mg/mL. No eksperimentāli iegūtajām standartšķīdumu absorbcijas vērtībām pie 770 nm tika konstruēta gallusskābes kalibrēšanas taisne (skatīt 3.13. attēlā).-



3.13. Att. Gallusskābes kalibrēšanas grafiks ($\lambda = 770 \text{ nm}$, $b = 0,6 \text{ cm}$)

Pārbaudītajā diapazonā gallusskābes absorbcijas intensitāti un šķīduma koncentrāciju saista lineāra funkcija, kuru apraksta sakarība $f(x) = (6,1676 \pm 0,0855) x + (0,0862 \pm 0,0093)$. Savukārt iegūtais korelācijas koeficients $R^2 = 0,9990$ atbilst prasībām ($\geq 0,998$) un norāda uz metodes linearitāti izvēlētajā koncentrāciju diapazonā.

Izmantojot gallusskābes kalibrēšanas taisnes vienādojumu, aprēķināta kopējo fenolo savienojumu masas koncentrācija pētāmajos *spirulīnas* paraugos, izsakot pret gallusskābes ekvivalentu (GSE) mg uz 1 g parauga pēc vienādojuma 3.1.

$$GSE \frac{mg}{g} = \frac{A \cdot 100}{at\check{s}k\%} \cdot \frac{V}{m} * 1000$$

(3.1)

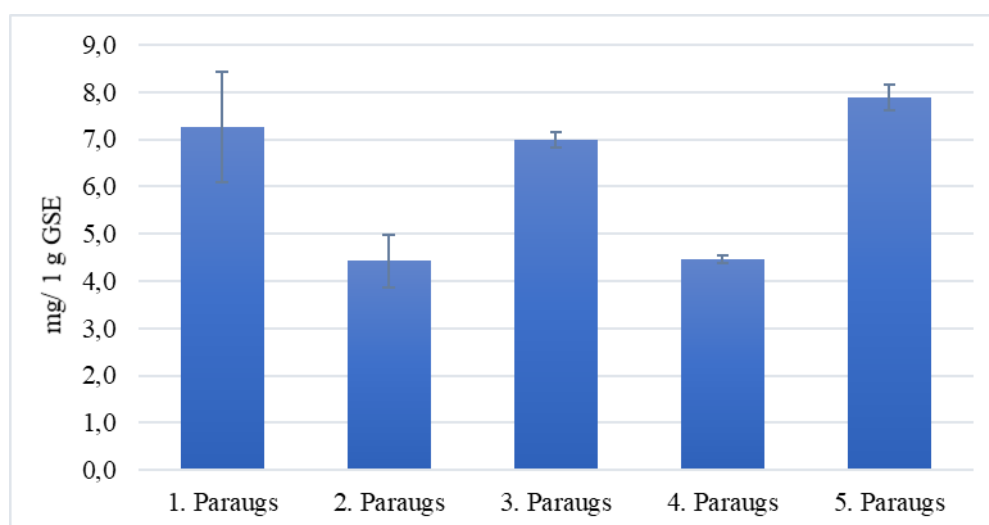
kur A – izmērītā absorbcija;

atšķ.% - analizējamā ekstrakta procentuālais atšķaidījums, %;

V – tilpums, mL;

m – parauga iesvars, mg.

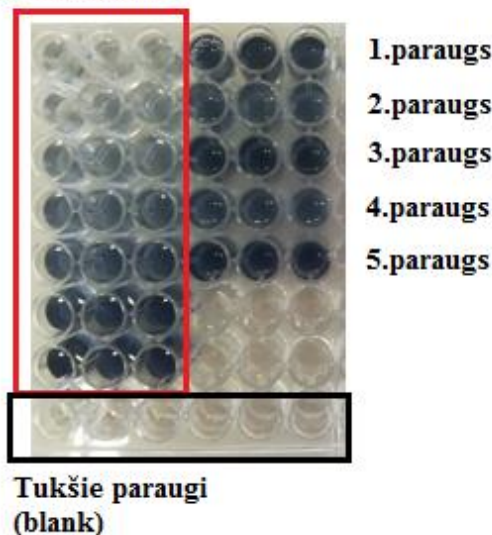
Tā, kā *spirulīnas* saturošo produktu lietošanai uzturā patērētājiem rekomentē izmantot ūdeni, eksperimentā izmantoti tikai 100% ūdens ekstrakti.



3.14. Att. Kopējo fenolo savienojumu daudzums *spirulīnas* paraugos

Pēc 3.14. attēlā attēlotā grafikā ir redzams, ka fenolo savienojumu saturs starp paraugiem variē un ir atšķirīgs. Tā vissaugstākais fenolo savienojumu saturs novērojams 5. paraugā, kur tas sasniedz $7,882 \pm 0,260$ mg/1 g parauga, tam seko 1. un 3. paraugs, attiecīgi fenolu saturs $7,258 \pm 1,172$, un $6,998 \pm 0,165$ mg/1 g parauga. Zemāko saturu uzrāda 2. paraugs ar $4,426 \pm 0,561$ mg/1 g parauga (skatīt 3.15. attēlā).

Standartšķīdumi

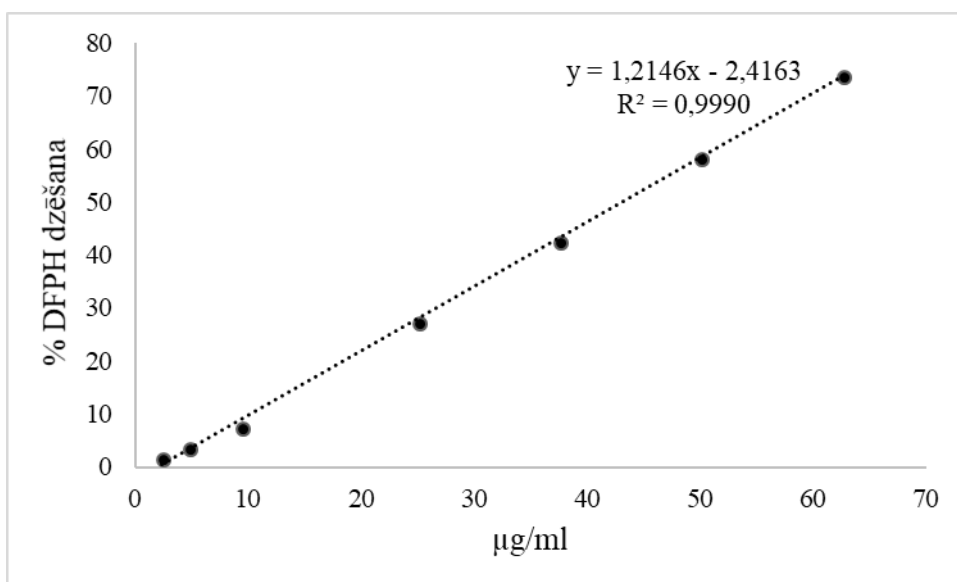


3.15. Att. Kopējo fenolo savienojumu noteikšanas mikroplātes izkārtojums

Fenolo savienojumu saturu pētījumi mikroaļģēs nav daudz atrodami, jo to koncentrācijas dabīgos apstākļos audzētās aļģēs ir diezgan zemas. Dažādi apstākļi, kā, piemēram, gaisma, mikroelementi, aminoskābes un nitrātu līmenis aļģu kultūrās būtiski ietekmē fenolu vielmaiņu. Gaisma tiek minēta kā būtiskākais elements to vielmaiņā. Dabīgos apstākļos audzētu spirulīnu aļģēs kopējais fenolo savienojumu saturs variē starp $2,42 \pm 0,21$ un $4,99 \pm 0,29$ mg uz 1 g sausas biomasas. Bet paaugstinātos stresa apstākļos to saturs var sasniegt līdz pat 50 mg uz 1 g biomasas. Šajā gadījumā nav zināma būtiska informācija par apstākļiem, kur un kā audzēta *spirulīna* komerciāliem nolūkiem, tādēļ nevaram salīdzināt apstākļu ietekmi uz to saturu [51,52].

3.2. *Spirulīnas* ekstraktu antiradikālās aktivitātes noteikšana

Antiradikālā aktivitāte vērtēta gan atkarībā no DFPH reaģenta dzēšanas procentiem, gan izteikta kā troloksa ekvivalents. No eksperimentāli iegūtajām standartšķīdumu absorbcijas vērtībām pie viļņu garuma 515 nm tika konstruēta troloksa kalibrēšanas taisne koncentrāciju diapazonā no 2,35 līdz 62,5 $\mu\text{g/mL}$ atkarībā no DFPH reaģenta dzēšanas spējām (skatīt 3.16. attēlā).



3.16. Att. Troloksa kalibrēšanas grafiks atkarībā no DFPH dzēšanas spējas ($\lambda = 515 \text{ nm}$, $b = 0,6 \text{ cm}$)

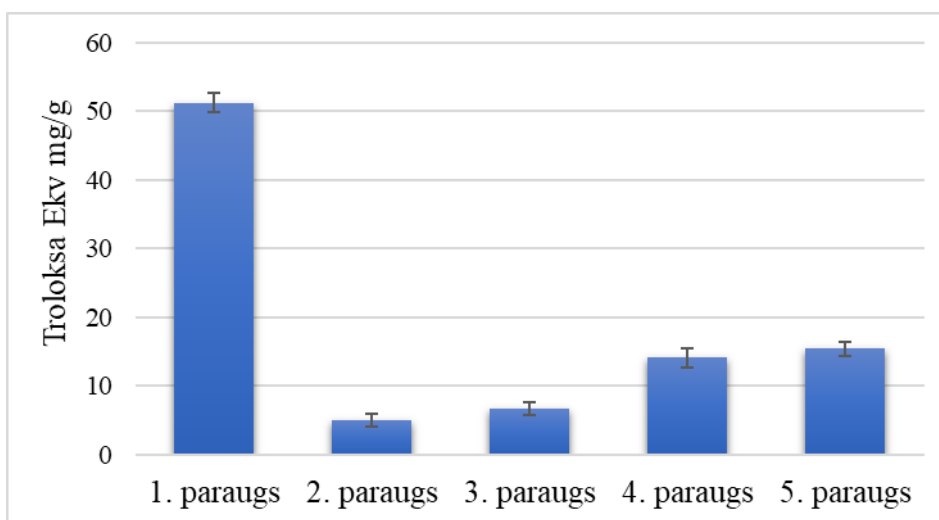
Pārbaudītajā diapazonā troloksa absorbcijas intensitāti un šķīduma koncentrāciju saista lineāra funkcija, kuru apraksta sakarība $f(x) = (1,2146 \pm 0,0174) x - (2,4163 \pm 0,6076)$. Savukārt iegūtais korelācijas koeficients $R^2 = 0,9990$ atbilst prasībām ($\geq 0,998$) un norāda uz metodes linearitāti izvēlētajā koncentrāciju diapazonā.

Antiradikālā aktivitāte tiek aprēķināta pēc 3.2. vienādojuma:

$$\text{Troloksa Ekv. mg/g} = \frac{\text{Troloks} \cdot 100}{\text{atšķ.}} \cdot \frac{1000}{m} \quad (3.2.)$$

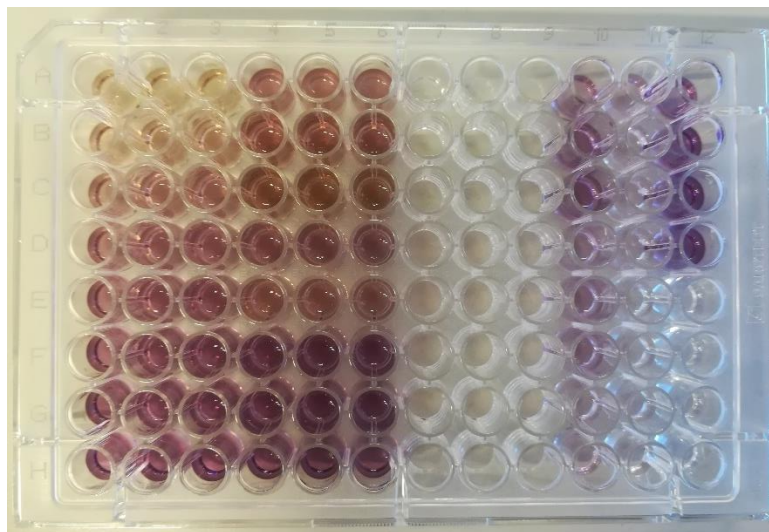
kur m – parauga iesvars, mg;

atšķ. % - analizējamā ekstrakta procentuālais atšķaidījums, %.



3.17. Att. Antiradikālā aktivitāte 100% spirulīnas ūdens ekstraktiem

Arī antiradikālā aktivitāte izvērtēta 100% *spirulīnas* ūdens ekstraktam. Kā 3.17. attēlā redzamajā grafikā varam novērot, pārliecinoši izteiktāka antiradikālā aktivitāte ir 1. paraugam, salīdzinot ar pārējiem paraugiem. Tā antiradikālā aktivitāte sasniedz $51,213 \pm 1,411$ TE mg/g parauga. Kamēr 4. un 5. paraugs uzrāda nepilnus 20 TE mg/g parauga. Zemākā antiradikālā aktivitāte novērojama 2. paraugam, tam tā ir $5,005 \pm 0,935$ TE mg/g parauga (skatīt 3.18. attēlu).



3.18. Att. Antiradikālās aktivitātes noteikšanai sagatavotā mikroplate ar DFPH reaģentu

Citu autoru pētījumos *spirulīna* antiradikālā aktivitāte izteikta kā askorbīnskābes ekvivalenti. Bet arī troloks uzrāda labus rezultātus. *Spirulīnas* antiradikālā aktivitāte pārbaudīta gan *in vitro*, gan *in vivo* eksperimentos, un tiek dokumentēta visai plaši. Aktivitāte noteikta gan spirta, gan ūdens ekstraktos. Spirta ekstraktos tā variē starp 7 mg/g līdz 14 mg/g sausas biomasas. Ūdens ekstraktos šī aktivitāte ir daudz spēcīgāk izteikta. Antiradikālo aktivitāti veido sastāvā esošie bioloģiski aktīvie savienojumi ar antioksidatīvo darbību, kā, piemēram, fenoli, flavonoīdi, karotenoīdi, pigmenti un citi savienojumi [51, 52].

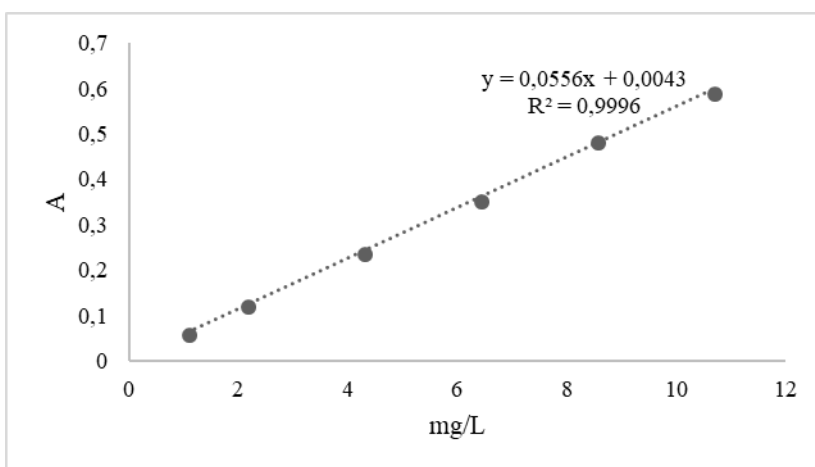
3.3. Fe (III) un (II) jonu noteikšana *Spirulīnas* paraugos

Dzelzs ir viens no svarīgākajiem metāliem aļģu attīstībā, fotosintēzē un elpošanā. Tā daudzums var atšķirties, gan starp sugām, gan vietas, kur aļģes ievāktas. Literatūrā ir plaši aprakstītas metodes Fe jonu noteikšanai spirulīnā, pamatā izmantojot atomu absorbcijas spektrometriju. Šajā darbā dzelzs jonu noteikšanai tika izvēlēta vienkāršāka metode – fotometrija (skatīt 3.19. attēlu).



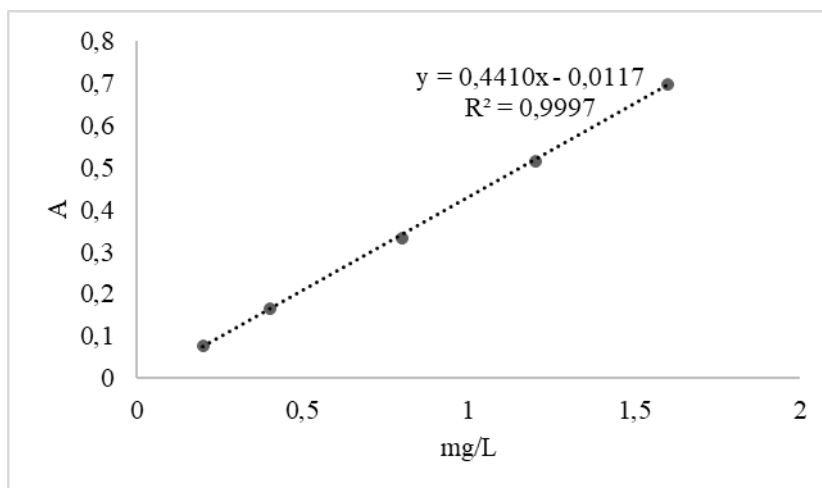
3.19. Att. Sagatavotie paraugu šķīdumi Fe (III) un (II) jonu daudzuma noteikšanai *spirulīnas* paraugu ūdens šķīdumā, izmantojot fotometrijas metodi

Tika izveidoti divi kalibrēšanas grafiki, attiecīgi Fe (II) (skatīt 3.20. attēlā) un (III) joniem (skatīt 3.21. attēlā). Koncentrāciju diapazonā 1 – 10 mg/L Fe (II) joniem, un 0,2 – 1,6 mg/L Fe (III) joniem.



3.20. Fe (II) jonu kalibrēšanas grafiks (b=1cm, λ=508 nm)

Šajā diapazonā dzelzs (II) jonu absorbcijas intensitāti un šķīduma koncentrāciju saista lineāra funkcija, kuru apraksta sakarība $f(x) = (0,0556 \pm 0,0005) x + (0,0043 \pm 0,0034)$. Iegūtais korelācijas koeficients $R^2 = 0,9996$ atbilst prasībām ($\geq 0,998$).



3.21. Fe (III) jonu kalibrēšanas grafiks ($b=1\text{cm}$, $\lambda=508\text{ nm}$)

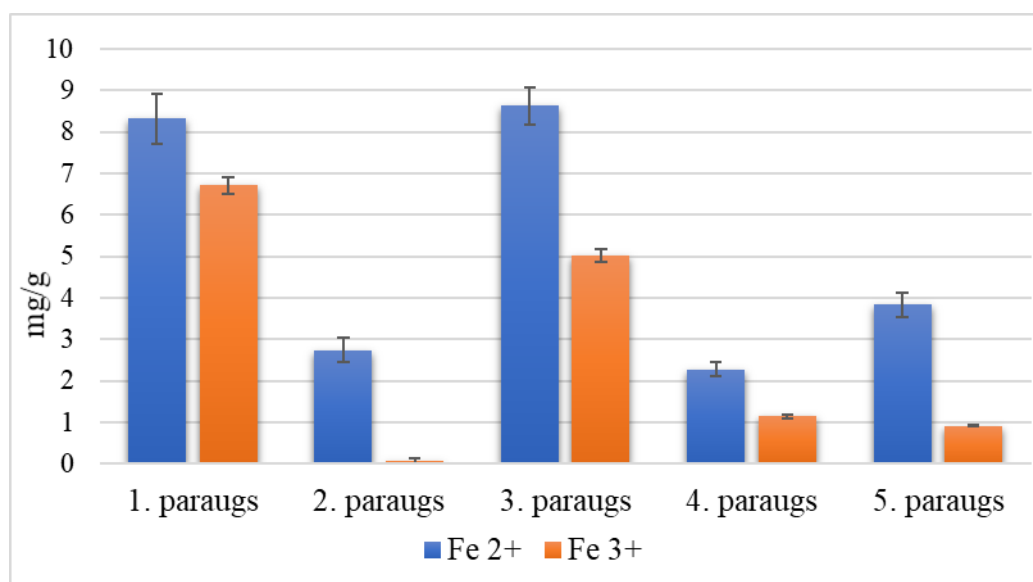
Dzelzs (III) jonu standartšķīduma kalibrēšanas diapazonā lineāro funkciju apraksta sakarība $f(x) = (0,4410 \pm 0,0043) x - (0,0117 \pm 0,0043)$. Arī šis korelācijas koeficients $R^2 = 0,9997$ atbilst prasībām ($\geq 0,998$).

Dzelzs (II) un (III) jonu masu paraugā aprēķina pēc vienādojuma (3.3.), ņemot vērā paraugu atšķaidījumus.

$$m \text{ (mg)} = \gamma * 0,100 * \frac{V_{kolbai}}{V_{pipetei}} * \frac{V_{kolbai}}{V_{pipetei}} \quad (3.3.)$$

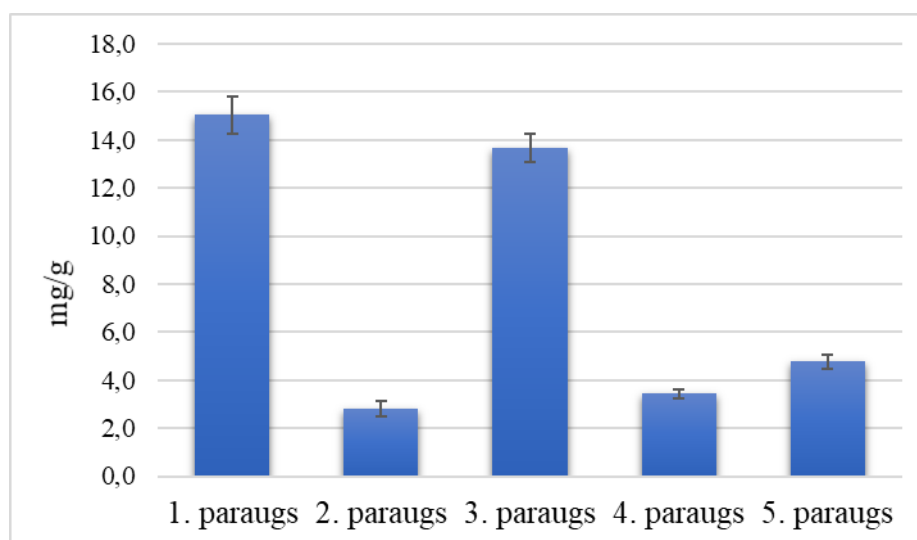
kur γ – masas koncentrācija, mg/L;

V – tilpums, L.



3.22. Att. Fe jonu saturs spirulīnas paraugos

3.22. Attēlā redzamā grafikā ir attainotas Fe (II) un (III) jonu masas *spirulīnas* paraugos. Kā redzams Fe (II) jonu masa visos paraugos ir lielāka nekā Fe (III) joniem. Lielākais dzelzs (II) saturs ir 3. paraugā, kur tas sasniedz $8,638 \pm 0,448$ mg/g parauga. Nedaudz zemāks saturs ir 1. paraugam, attiecīgi $8,317 \pm 0,605$ mg/g. Zemākais saturs atrodams 4. paraugā, kur tas ir $2,276 \pm 0,169$ mg/g parauga. Dzelzs (III) saturs visvairāk ir atrodams 1. paraugā, kur tas sasniedz $6,712 \pm 0,191$ mg/g, nedaudz zemāks 3. paraugam, attiecīgi $5,018 \pm 0,155$ mg/g parauga. Zemākais saturs ir atrodams 2. paraugā, kur tas sasniedz vien $0,069 \pm 0,016$ mg/g parauga.



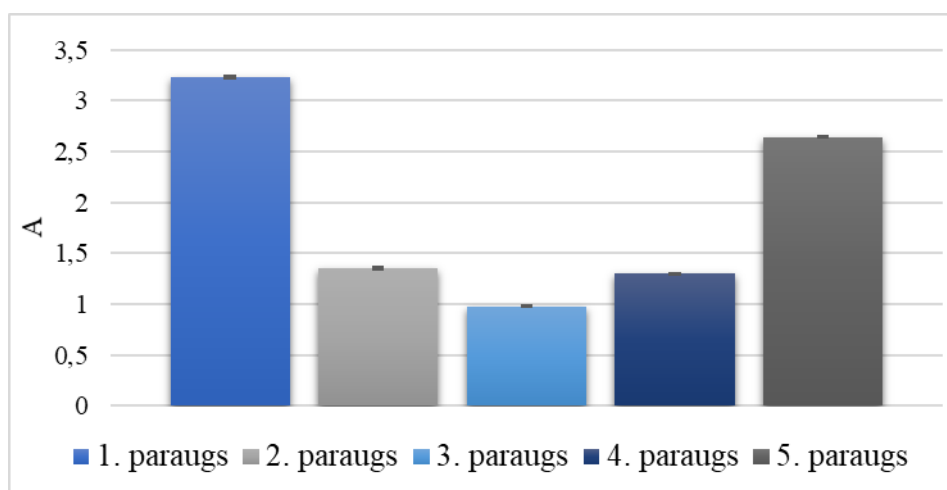
3.23. Att. Kopējais dzelzs saturs *spirulīnas* paraugos

Kopējais dzelzs daudzumu visvairāk atrodams 1. un 3. paraugā, kur tas sasniedz attiecīgi $15,029 \pm 0,795$ un $13,657 \pm 0,602$ mg/g parauga. Viszemākais saturs 2. paraugā, kur tā daudz ir $2,815 \pm 0,308$ mg/g parauga (skatīt 3.23. attēlā).

Citu autoru pētījumos un literatūrās atrodamo dzelzs daudzums *spirulīnas* aļģēs variē no 1,8 mg/g līdz 8,7 mg/g. Šajā gadījumā diapazons ir mazliet lielāks sākot no 2,8 līdz pat 15 mg/g, bet uzskatāms, ka atbilst citu autoru datiem. Bet arī šajā gadījumā ļoti daudz ietekmē vide, kur aļģes augušas un to uzņemtās barības vielas. Literatūrā pozicionē, ka *spirulīna* ir bagātīgs dzelzs jonu avots un ieteicams lietot uzturā, kā arī ieteicams lietot dažādu anēmiju gadījumos. Dzelzs dienas deva vidēji ir 18 mg, kura atšķiras starp dzimumiem, vecuma, un grūtniecības [123, 124].

3.4. Pigmenta fikocianīna noteikšana *spirulīnas* ekstraktos

Spirulīna ir bagāta ar krāsainiem pigmentiem, tostarp fikobiliproteīniem. No tiem plašāk zināms fikocianīns, kurš *spirulīnas* aļģēm dod zilo krāsu. Fikocianīns darba ietvaros noteikts divejādi, mērot spektrofotometriski pie 630 nm un nosakot hromatogrāfiski (skatīt 3.24. attēlā).



3.24. Att. Fikocianīna absorbcijas intensitāte ($\lambda=630$ nm) *spirulīnas* ūdens šķīdumos vienādās paraugu koncentrācijās

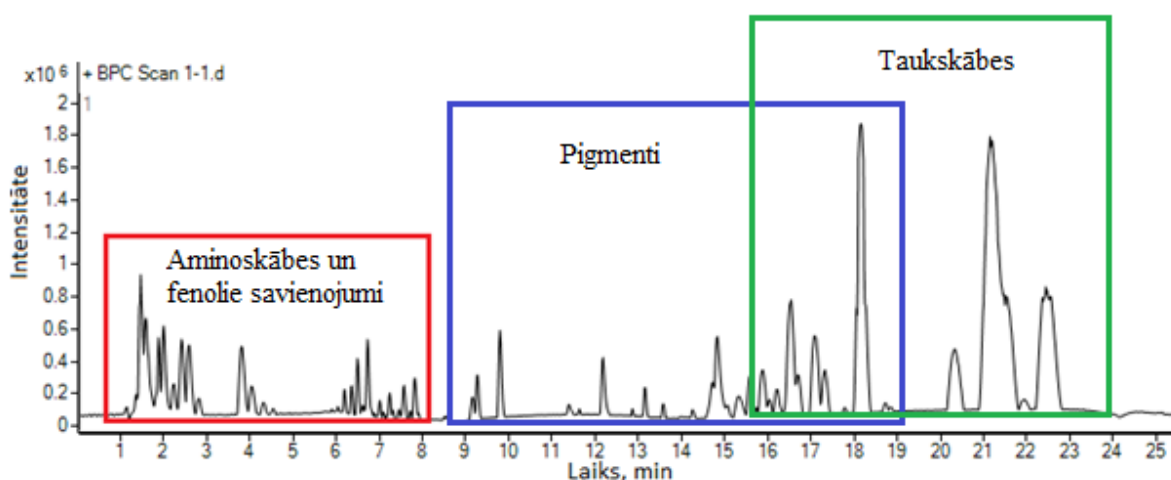
Šajā gadījumā var tikai tīri kvalitatīvi salīdzināt absorbcijas mērījumus, jo nav pieejamas standartvielas, lai veiktu arī to kvantitatīvo analīzi. Kā redzams 3.24. attēlā absorbcija ir lielāka 1. paraugam, nedaudz mazāka - 5. paraugam. Zemākā absorbcija ir 3. paraugam. Pēc literatūras, *spirulīna* ir viens no bagātākajiem fikocianīna avotiem, kas pazīstams ar spēcīgu antioksidatīvo darbību. Ja salīdzinām ar 3.2. nodaļā apkopoto informāciju par antiradikālo aktivitāti, tad šie rezultāti savā starpā korelē, kur 1. paraugs uzrāda labākus rezultātus.

Fikocianīna relatīvos daudzumus kvalitatīvi var salīdzināt izmantojot arī hromatogrāfisko analīzes metodi, pēc savienojuma iegūtajiem laukumiem. Iegūtie rezultāti korelē ar spektrofotometriskajiem mērījumiem.

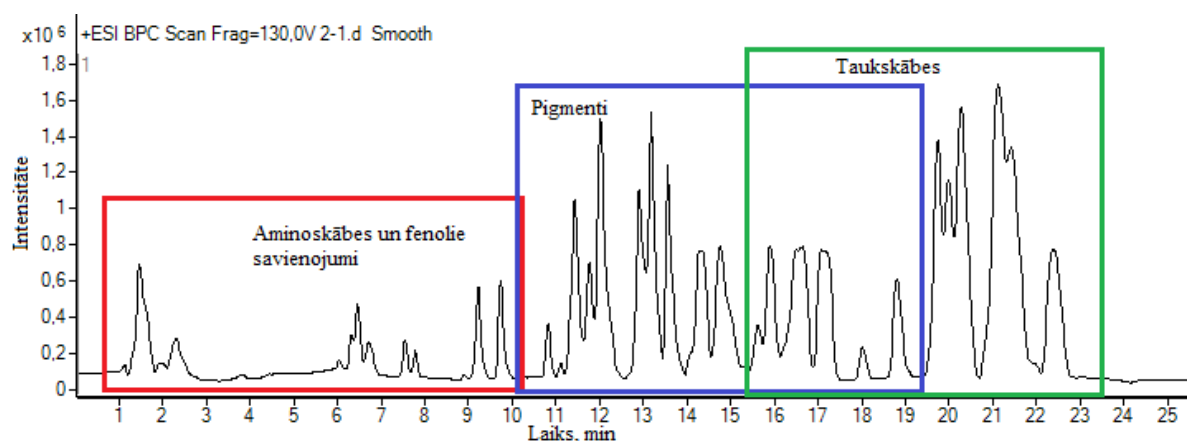
Spirulīnas proteīnu frakcija satur ļoti daudz fikocianīnu un allofikocianīnu. Abi šie fikobiliproteīni ir ar spēcīgi izteiktu antioksidatīvu, pretiekaisuma un imūnstimulējošu iedarbību [35].

3.5. *Spirulīnas* ekstraktu ķīmiskā sastāva noteikšana, izmantojot AEŠH/MS

Kā jau iepriekšējās nodaļās aprakstīts, *spirulīnas* aļģe satur ļoti daudz dažādu vērtīgu bioloģisko savienojumu. Literatūras apskatā ir aprakstīti būtiskākie savienojumi, kuriem piemīt kāda farmakoloģiskā iedarbība. Pirmkārt pieejamā literatūra pozicionē, ka *spirulīnas* aļģes ir bagātas ar olbaltumvielām un aminoskābēm. Tādēļ lielākais uzsvars darbā tika likts uz kvalitatīvu brīvo aminoskābju noteikšanu. Sākotnēji savienojumu izdalīšanu no matricas veic, izmantojot šķidrums hromatogrāfiju (AEŠH). Izdalīto savienojumu identifikācija tika veikta izmantojot masspektrometriski iegūto bāzes hromatogrammu (BPC) (skatīt 3.25. un 3.26. attēlā),



3.25. att. Parauga N1, šķīdināta ūdenī, bāzes joslu hromatogramma (BPC)



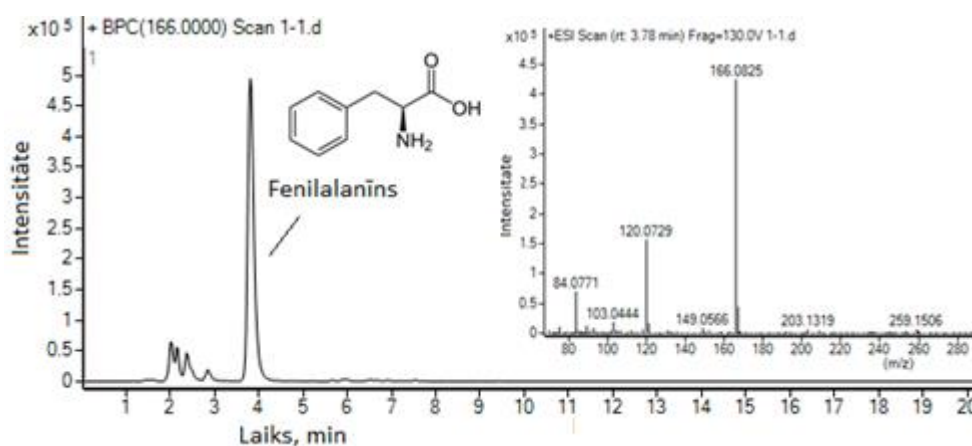
3.26. att. Parauga N2, šķīdināta metanolā, bāzes joslu hromatogramma (BPC)

Attēlos salīdzinātas abas BPC hromatogrammas paraugam N1 šķīdinātam dažādās vidēs. Kā redzams aminoskābes un fenolīe savienojumi ir krietni polārāki un to ekstrakcija efektīvāk

notiek, izmantojot ūdens vidi, savukārt daļu pigmentu un taukskābju iespējams izekstrahēt, izmantojot 80 % metanola šķīdumu ūdenī.

Aminoskābju saturs noteikšana

Aminoskābju noteikšanai tika izmantoti *spirulīnas* ūdens ekstrakti. Aminoskābju izdalīšanai tika izmantota speciāla kolonna, kas radīta brīvo aminoskābju noteikšanai - Intrada Amino Acid. Tālāk seko iegūto joslu raksturošana, izmantojot lidojuma laika masspektrometriju (TOF-time of flight) detektoru. Izdalīto savienojumu identifikācija tika veikta izmantojot bāzes hromatogrammu (BPC) (skatīt 3.27. attēlā), balstoties uz visu nosakāmo aminoskābju $[M+H]^+$ jonu m/z vērtībām (skatīt 3.15. tabulā).



3.27. att. Fenilalanīna hromatogramma un tam atbilstošais masspektrs paraugā N1, iegūts ar Amino Intrada kolonnu

Lidojuma laika masspektrometrija ļauj analizēt savienojumus, pēc to precīzajām masām. Tā ir vienīga analīzes metode, kas precīzi nosaka analizējamo savienojumu molu masu. Metodes priekšrocība ir tāda, ka bez standartvielām analītiķis var nedefinēt, kādi savienojumi atrodas analizējamajā paraugā. Savienojumi tika identificēti, izmantojot ar *MassHunter Qualitative Analyses B.07.00* datu apstrādes sistēmu.

Identificējamās aminoskābes, to prezīzās masas un molekulārā formula

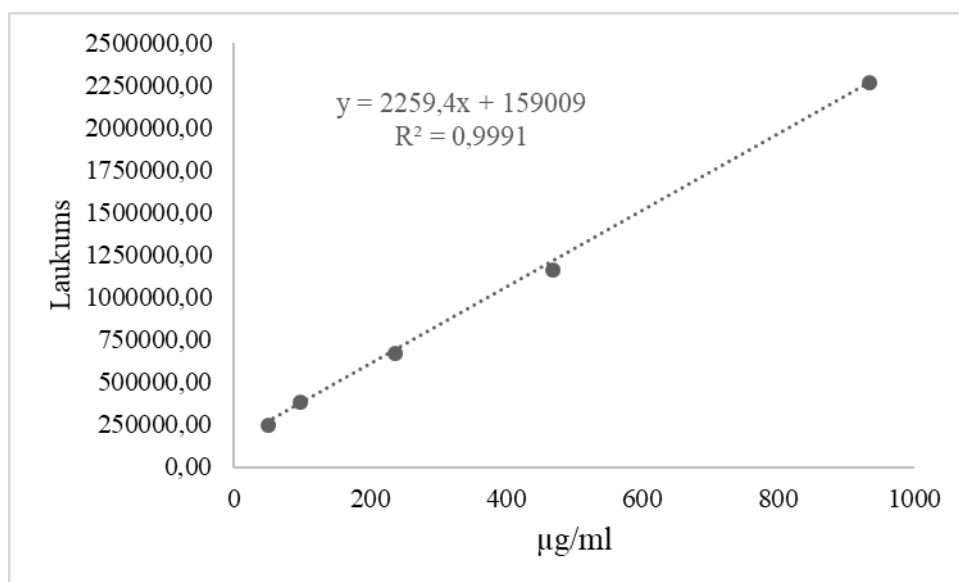
Aminoskābe	Molekulārā formula	(M+H) ⁺ aprēķinātā
Glicīns	C ₂ H ₅ NO ₂	76,0393
Alanīns	C ₃ H ₇ NO ₂	90,0550
Serīns	C ₃ H ₇ NO ₃	106,0499
Prolīns	C ₅ H ₉ NO ₂	116,0706
Valīns	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118,0863
Treonīns	C ₄ H ₉ NO ₃	120,0655
Benzoskābe	C ₇ H ₆ O ₂	123,0441
Leicīns	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132,1019
Asparagīns	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	133,0680
Aspargīnskābe	C ₄ H ₇ NO ₄	134,0448
Glutamīns	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	147,0764
Lizīns	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	147,1128
Glutamīnskābe	C ₅ H ₉ NO ₄	148,0604
Fenilalanīns	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166,0863
Arginīns	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175,1190
Tirozīns	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182,0812
Triptofāns	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205,0972

3.16. Tabulā ir uzskaitītais visas aminoskābes, kuras tika identificētas visos paraugos. To satura kvantitatīvai noteikšanai izmantota tirozīna standartšķīdumu kalibrācija, koncentrāciju diapazonā 46,5 – 930 µg/mL (skatīt 3.28. attēlā).

Identificēto aminoskābju joslu laukumi *spirulīnas* paraugos, izmantojot Intrada Amino Acid kolonnu

Aminoskābe	1.Paraugs	2.Paraugs	3.Parugs	4.Paraugs	5.Paraugs
Leicīns/Izoleicīns	6329048	2501305	6504454	4445713	6910802
Valīns	6984895	5323354	7280238	5252448	8324246
Triptofāns	596047	351842	442722	324710	488814
Fenilalanīns	5673032	3439591	4931697	3794395	5012144
Tirozīns	640191	402289	610038	435722	647948
Metionīns	538350	n.a.	595303	303711	617235
Glutamīnskābe	1043102	379581	707571	586588	841260
Serīns	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	72827
Prolīns	6918594	6923725	7406753	6993364	8057215
Alanīns	429420	n.a.	267711	224523	364408
Arginīns	271975	230827	159922	191610	173155
Treonīns	n.a.	n.a.	1710671	1210959	1752987

n.a.-nav atrasts;



3.28. Att. Tirozīna kalibrēšanas grafiks

Pārbaudītajā diapazonā tirozīna absorbcijas intensitāti un šķīduma koncentrāciju saista lineāra funkcija, kuru apraksta sakarība $f(x) = (2259,3568 \pm 39,3013)x + (159009 \pm 18815)$. Iegūtais korelācijas koeficients $R^2 = 0,9991$ atbilst prasībām ($\geq 0,998$). Pēc iegūtās sakarības tiek aprēķinātas identificēto aminoskābju masas koncentrācija (3.4.), masa (3.5.), un saturs uz 1 g parauga (3.6.) pēc attiecīgiem vienādojumiem.

$$\gamma = \frac{y - 159009}{2259,36}; \quad (3.4.)$$

kur y – aminoskābju joslas laukums.

$$m = \frac{\gamma * V}{1000}; \quad (3.5.)$$

kur γ – masas koncentrācija, $\mu\text{g/mL}$, V – tilpums, mL , m – masa, mg .

$$m_{\text{amino}}(1 \text{ g}) = \frac{m_{\text{amino}} * 1000 \text{ mg}}{m_{\text{parauga}}}; \quad (3.6.)$$

kur m_{amino} – aminoskābju masa, mg ; m_{parauga} – masa paraugam, mg

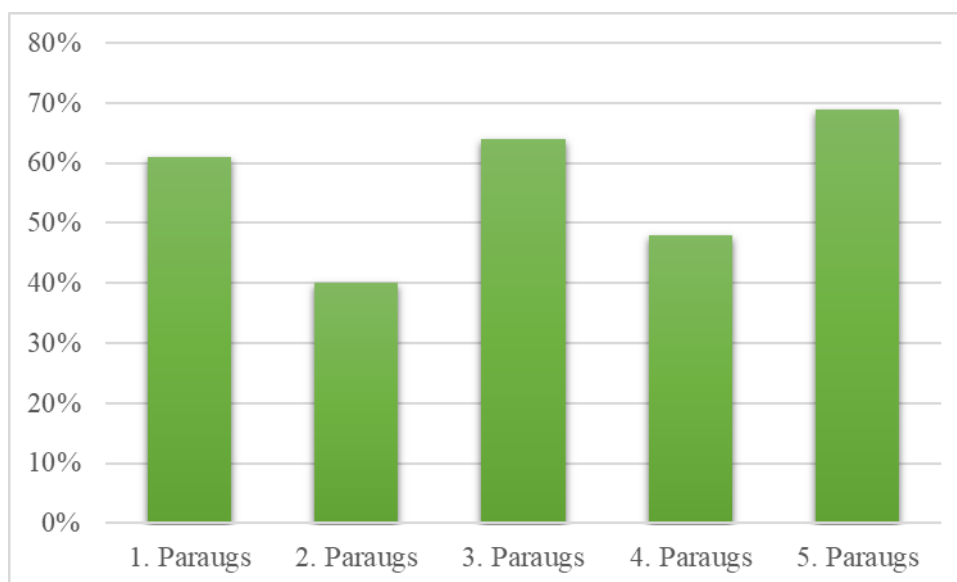
Aminoskābju daudzums mg uz 1 g parauga

Aminoskābe	1.Paraugs	2.Paraugs	3.Paraugs	4.Paraugs	5.Paraugs
	mg/g				
Leicīns/Izoleicīns	135,46	51,60	140,27	94,19	148,36
Valīns	149,86	113,77	157,42	111,91	179,42
Triptofāns	9,59	4,25	6,27	3,64	7,25
Fenilalanīns	121,06	72,27	105,50	79,88	106,64
Tirozīns	10,56	5,36	9,97	6,08	10,74
Metionīns	8,33	n.a.	9,64	3,18	10,07
Glutamīnskābe	19,41	4,86	12,13	9,39	14,99
Serīns	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOQ
Prolīns	148,40	149,03	160,21	150,16	173,55
Alanīns	5,94	n.a.	2,40	1,44	4,51
Arginīns	2,48	1,58	0,02	0,72	0,31
Treonīns	n.a.	n.a.	34,30	23,11	35,03

n.a.-nav atrasts;

<LOQ – zem kvantificēšanas robežas.

Kā redzams 3.17. tabulā *spirulīnas* paraugos dominē aminoskābes leicīns, izoleicīns, valīns, fenilalanīns un prolīns. Šo aminoskābju daudzums ir izteikti lielāks nekā pārējām. Aminoskābe serīns tika atrasts tikai 5. paraugā, bet to koncentrācija iet ārpus kalibrēšanas grafika diapazona, tādēļ to precīzu daudzumu nav iespējams noteikt. 2. paraugā nebija sastopams alanīns, metionīns, serīns un treonīns, savukārt, 1. paraugā nebija tikai treonīna un seīna. Pārējās aminoskābes bija atrodamas visos paraugos.



3.29. Att. Noteiktais kopējo aminoskābju daudzums *spirulīnas* paraugos

3.29. attēlā varam novērot, ka procentuāli kopējām aminoskābēm bagātākais ir 5. paraugs, tur to daudzums sastāda 69%, 3. paraugā 64% sastāda aminoskābes, bet 1. paraugā – 61%. Vismazākais aminoskābju daudzums noteikts 2. paraugā, tur aminoskābju daudzums sastāda 40 %.

Spirulīna tiek uzskatīta par bagātāko proteīnu un aminoskābju avotu no visiem mikroorganismiem. Maģistra darbā iegūtie rezultāti apstiprina literatūrā pieejamo informāciju, ka to daudzums sastāda vairāk nekā 60%, un sastopamas 18 – 22 aminoskābes. Pēc literatūras datiem, *spirulīnā* dominē tādas aminoskābes kā leicīns un izoleicīns, metionīns, fenilalanīns, valīns un treonīns [33, 34].

Pigmentu noteikšana

Bez fikobiliproteīniem jeb fikocianīna, *spirulīnas* produktos ir sastopami arī tādi pigmenti kā hlorofils a, beta-karotīns, feofitīns a un pirofeofitīns a. 3.18. tabulā ir apkopoti pigmenti un to joslu laukumi, identificēti *spirulīnas* paraugu ūdens ekstraktos, izmantojot šķidrums hromatogrāfijas-masspektrometrijas analīzi.

Identificēto pigmentu joslu laukumi *spirulīnas* paraugos, izmantojot šķīdumu hromatogrāfijas metodi ar XBridge C8 kolonnu

	Molekulārā formula	1. Paraugs	2. Paraugs	3. Paraugs	4. Paraugs	5. Paraugs
Zeaksantīns/ luteīns	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	287829	467013	965083	229056	117178
Hlorofils a	C ₅₅ H ₇₂ MgN ₄ O ₅	1010829	1743744	2338496	145364	304063
Feofitīns a	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	1771683	66211945	109632418	12394915	5756
Beta-karotīns	C ₄₀ H ₅₆	84351	80521	n.a.	72493	94718
Astaksantīns	C ₄₀ H ₅₂ O ₄	278631	42039	n.a.	n.a.	197845
Kantaksantīns	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	98681	98812	96808	38205	95964
Feofitīna a O- alomērs	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₆	5327901	6133229	16853270	1252992	18992
Pirofeofitīns a	C ₅₃ H ₇₃ N ₄ O ₃	13421280	13069936	6603340	n.a.	12204
Miksoksantofils	C ₄₆ H ₆₆ O ₇	130074	68225	91792	99739	54816

n.a.-nav atrasts

Bez fikocianīna paraugos kopumā atrasti un identificēti vēl 9 pigmenti. Vislielākais relatīvais pigmentu daudzums ir 3. paraugam, savukārt mazākais – 5. paraugam. Beta-karotīns nebija atrodams 3. paraugā, savukārt astaksantīns – 3. un 4. paraugā. Pigmenti ir ļoti jutīgi savienojumi pret gaismu un temperatūru, un arī to stabilitāte ir zemāka nekā citiem savienojumiem. Piemēram, ļoti jutīgs savienojums ir iepriekš pieminētais beta-karotīns, kura daudzums samazinās ilgākā laika periodā. Kaut gan to daudzums, pēc literatūras datiem ir ļoti augsts, sasniedzot līdz pat 1700 mg/kg [62, 125]. Pigmenti raksturojas ar spēcīgi izteiktu antioksidatīvo darbību, pasargājot organisma šūnas no apkārtējās vides stresa un nelabvēlīgiem apstākļiem [62]

Fenolo savienojumu noteikšana

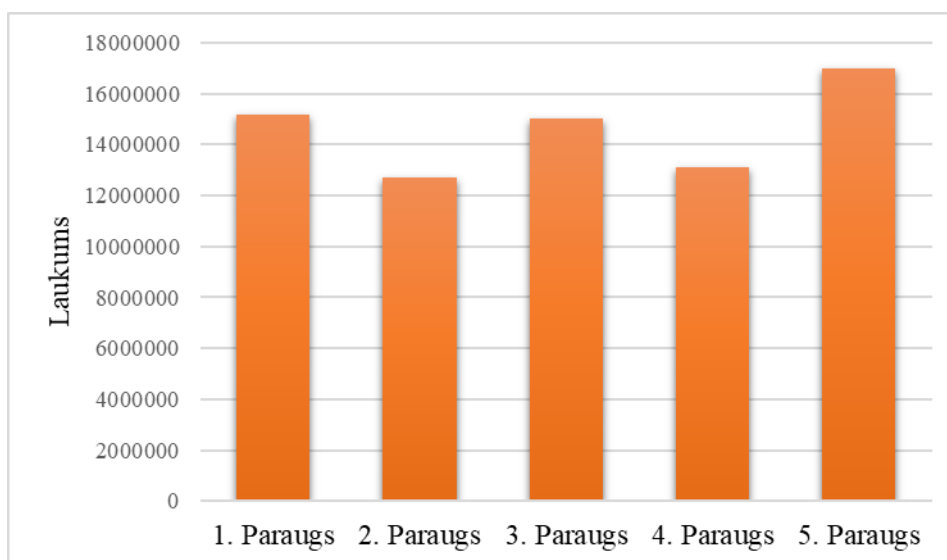
Kā jau literatūras apskatā minēts, *spirulīnas* aļģes satur fenolos savienojumus, no kuriem plaši ir sastopami tādi fenolie savienojumi kā gallusskābe, katehīns, tirosols, kumarīnskābe, furanokumarīni un citi savienojumi. Maģistra darbā pētītos *spirulīnas* produktos tika identificēti gan tādi savienojumi, kuri minēti arī literatūrā, gan mazāk aprakstīti [53, 90]. Piemēram literatūrā teikts, ka hlorogēnskābe ir bieži sastopama šajās aļģēs, bet dotajā gadījumā tā tika atrasta tikai 1. paraugā. Atšķirībā no literatūras datiem, šajos paraugos netika atrasta kafijskābe, bet tikai tās sulfāts (skatīt 3.19. tabulu).

Identificētie fenolie savienojumi, to joslu laukumi *spirulīnas* paraugos, izmantojot XBridge C8 kolonnu

	Molekulārā formula	1. Paraugs	2. Paraugs	3. Paraugs	4. Paraugs	5. Paraugs
Gallusskābe	C ₇ H ₆ O ₅	131313	171676	168831	79336	163780
Katehīns	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	19164	262266	229438	123277	227954
Kumarīnskābe	C ₉ H ₈ O ₃	2290712	515287	825167	1142293	394650
Sifonīns	C ₅₂ H ₇₆ O ₅	70584	28457	44638		
Tirosols	C ₈ H ₁₀ O ₂	3385852	2655801	2474660	2705144	4023940
Kafijskābes sulfāts	C ₉ H ₆ O ₇ S ₂	3113197	4651216	3140172	3583753	4880571
Rutīns	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	86591	71625	45464		46275
Tirosola sulfāts	C ₈ H ₁₀ O ₅ S	97379	101550	326169	164181	495226
Furanokumarīns	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	1303919	540763	3678248	2984839	3777647
Hlorogēnskābe	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	271873	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Vanilīnskābe	C ₈ H ₈ O ₄	126554	55168	n.a.	n.a.	43843
Kanēļskābe	C ₉ H ₈ O ₂	1238291	2361317	895563	1006849	1340018
Kvercetīns	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	288353	114634	68127	45129	81052
Kamferols	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	167672	115634	55119	67033	91545
Eugenols	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	53225	62327	48493	28897	82426
Gallokatehīns	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	381670	131001	416451	93996	466010
Epigallokatehīna O-glukoronīds	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₃	107066	n.a.	n.a.	n.a.	35156
Cerīnskābe	C ₉ H ₁₀ O ₅	28791	25300	35831	60425	40217
Apigenīns	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	n.a.	40649	n.a.	25976	13768
Krisīns	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	n.a.	17219	n.a.	n.a.	14575
Ferulskābe	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	46749	42126	72486	27243	38918
Flavanoīdi	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	n.a.	756878	681611	844547	735083
	C ₂₆ H ₃₂ O ₆	1972852	n.a.	1810210	142449	38919

n.a.-nav atrasts

3.1. nodaļā tika noteikts kopējais fenolo savienojumu daudzums, izteikts kā gallusskābes ekvivalents. Kā tika minēts 5. Paraugs uzrādīja visaugstāko rezultātu, kam sekoja 1. un 3. paraugs. Identificējot atsevišķus fenolos savienojumus ar AEŠH/MS iegūtie rezultāti korelē ar 3.1. nodaļā atspoguļotiem rezultātiem. Arī šajā gadījumā, zemākais fenolu saturs ir 2. paraugā, bet augstākais 5. paraugā (skatīt 3.30.attēlu).



3.30. Att. Fenolo savienojumu relatīvais sastāvs, iegūts izmantojot hromatogrāfisko analīzi

Fenolu bioloģiskā aktivitāte ir būtiski atšķirīga, un tā ir atkarīga no savienojumu struktūras, un avota. Galvenā tā funkcija aizsarfunkcija no brīvajiem radikāļiem un patogēniem. Kā arī tie ietekmē augu pigmentāciju, reprodukciju un augu augšanu. Lai gan šo savienojumu koncentrācija spirulīnas aļģēs ir zema, šajās aļģēs var noteikt flavonoīdus, kumarīnus, fenolskābes [10].

Lipīdu noteikšana

Lipīdi identificēti metanola ekstraktos. Zemāk esošā 3.20. tabulā apkopotas lipīdu savienojumu klases, kuras identificētas pētītajos *spirulīnas* produktos.

3.20. Tabula

Identificētie lipīdi un taukskābes, to joslu laukumi *spirulīnas* paraugos, izmantojot Xbridge C8 kolonnu

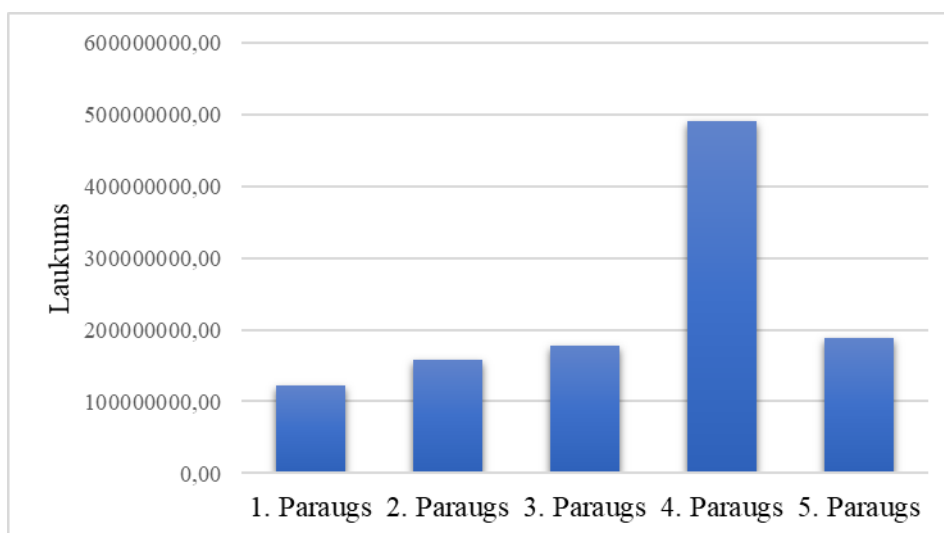
	Molekulārā formula	1.Paraugs	2.Paraugs	3.Paraugs	4.Paraugs	5.Paraugs
Gammalinolēnskābe	$C_{18}H_{30}O_2$	1407550	1151532	2124937	2508180	2222761
Palmitīnskābe	$C_{16}H_{32}O_2$	1330223	501392	404206	319662	320638
Linolskābe	$C_{18}H_{32}O_2$	828192	906947	1822008	2305088	1410475
Oleīnskābe	$C_{18}H_{34}O_2$	3325314	4113590	1802980	3168079	2736666
Fosfatidilinositols	$C_{47}H_{83}O_{13}P$	5185262	970331	501851	622511	489132

3.20. tabulas turpinājums

Digalaktosil diglicerīds	$C_{18}H_{34}O_{13}$	44186,31	152158	96715	24118	16456
Fosfatidilglicerols	$C_8H_{23}O_7P$	1785531	552354	830656	402757	141873
Monogalaktosil diglicerīds	$C_{12}H_{18}O_{12}$	8155491	3178859	3828436	1981434	1181609
Glicerofosfoglicerīns	$C_{44}H_{73}O_9P$	n.a.	10617557	11908919	10728575	9744515
Glicerofosfoinositols	$C_{39}H_{67}O_{13}P$	10764364	7756914	6754051	7132670	6668952
Eikosanoīds - Prostaglandīns	$C_{23}H_{34}O_5$	3621428	4028674	2934308	5356203	4141987
Diacilgliceroli	$C_{43}H_{66}O_5$	2917818	4083588	3825554	4503145	848095
	$C_{35}H_{58}O_5$	48942	n.a.	n.a.	n.a.	171352
	$C_{37}H_{64}O_5$	2992179	2408292	1763870	10080624	1646839
Steroīdu sulfāts	$C_{21}H_{32}O_6S$	1621108	969629	1981016	2991618	1097922
Sulfolipīds	$C_{43}H_{82}O_{12}S$	408694	337513	31054	13617	483517
Sterols	$C_{33}H_{58}O_6$	103512	112468	135921	173075	134872
Glicerofosfolipīds	$C_{21}H_{39}O_6P$	1641770	1611532	1419490	1814890	1646888
Glicerofosfoinositolglikāns	$C_{40}H_{75}O_{22}P$	3188671	3316067	3516286	3901665	3514466
Monoglicerīds	$C_{19}H_{38}O_4$	22123906	26351025	3148890	35425163	27676813
Oksidēti glicerofosfolipīdi	$C_{29}H_{51}O_{11}P$	12780226	35606467	56385382	148922789	47420904
	$C_{26}H_{47}O_9P$	3646522	1486810	1649938	44843791	11282894
Glicerofosfāts	$C_{27}H_{53}O_8P$	4277545	2990085	2830144	3348572	1254385
Dikarbonskābe	$C_{21}H_{36}O_4$	13146945	8012952	9181550	7087172	3655152

n.a.-nav atrasts

No tauksskābēm identificētas tās, kuras arī pēc literatūras datiem, ir procentuāli sastopamas vairāk, pie tām pieder gamma linolēnskābe, palmitīnskābe, linolskābe un oleīnskābe. Identificēti arī monoglicerīdi, diglicerīdi, steroli un citi savienojumi.



3.31. Att. Lipīdu relatīvais sastāvs, iegūts izmantojot hromatogrāfiskās analīzes metodes

Kā redzams 3.31. attēlā kopējais lipīdu daudzums relatīvi lielāks ir 4. paraugā, šajā paraugā to saturs stipri atšķiras starp pārējiem paraugiem. Zemākais lipīdu saturs novērots 1. paraugā.

3.6. Pētījumā izmantoto produktu savstarpējs salīdzinājums

Maģistra darba ietvaros iegādāti un salīdzināti šādi uztura bagātinātāji (skatīt 3.32. attēlā).



3.32. att. Maģistra darbā salīdzināmie produkti

Ražošanā un fasēšanā izmantotās īpatnības, palīgvielu sastāvs, forma, iepakojuma materiāls uzglabāšana – tas viss var ietekmēt gala produkta īpašības. Pēc likumdošanas iepakojuma materiāla galvenā funkcija ir aizsargfunkcija jeb produkta aizsardzība no ārējiem vides apstākļiem, un tas ir ciešā simbiozē ar pašu produktu. Ražotājam ir brīva izvēle, kādu konkrētu materiālu izvēlēties un kāpēc. Bieži vien šie argumenti ietver cenu, pieejamību,

atbilstību, iespējas, efektivitāti, ērtumu, saderību un vizuālos efektus. Atrast kopromisu jeb “zelta vidusceļu” ne vienmēr ir tik vienkārši un ātri. Īpaši gadījumos, kad produkts pats par sevi satur daudzus savienojumus. Proteīni un ogļhidrāti ir relatīvi stabili, vitamīni un mikroelementi visbiežāk ir jutīgi pret gaismu, skābekli un siltumu [126]. Fenolie savienojumi ir relatīvi stabili, galvenokārt jutīgi pret gaismu, skābekli un siltumu [127], tomēr vienlaicīgi var darboties kā antioksidanti. Lipīdi zaudē savas īpašības augstās temperatūrās. Pigmenti, C vitamīns jeb askorbīnskābe, B9 vitamīns jeb folijskābe un B1 vitamīns jeb tiamīns ir ļoti nestabili. Produktu uzglabājot nepiemērotos apstākļos, *spirulīna* var zaudēt līdz pat 50% tajā esošo pigmentu [126].

Spirulīnas pulveris ir nestabilākais un to arī pierāda ražotāju noteiktais ieteicamais uzglabāšanas ilgums. Tas skaidrojams ar produktā esošo daļiņu fizikālajām īpašībām, piemēram, dažādiem virsmas laukumiem. Tabletes ir sapresētas un to virsmas laukums ir lielāks [128]. Arī ražošanas procesā pielietotās palīgvielas atšķiras (skatīt 2.1. apakšnodaļu). Var izmantot gan inertas palīgvielas, gan tādas, kuras mijiedarbojas ar pašu produktu. Lai gan ne visiem produktiem ir norādīts palīgvielu sastāvs, tas var atšķirties un gala rezultātā ietekmēt produkta kvalitāti. Piemēram, palīgviela šķērsšūtās karboksimetilcelulozes nātrija sāls ar apzīmējumu E468, kura tiek pievienota 2. parauga ražošanā, tiek uzskatīta par kaitīgu, un vēlams uzmanīties lietojot šo piedevu. Šī piedeva slikti uzsūcas organismā un kopumā ietekmē arī paša produkta uzsūkšanos organismā. Pārējās piedevas tiek uzskatītas par drošām [129].

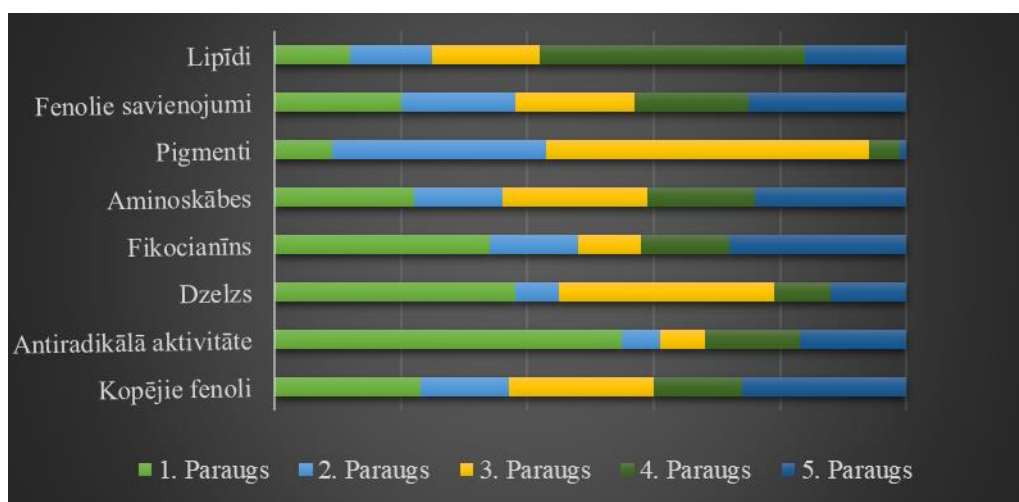
Un vēl viena lieta, kas ietekmē saturu – audzēšanas vieta un apstākļi. Vai un kur ražotājs iepircis izejvielu. Uztura bagātinātāju marķējumā šādu informāciju neuzrāda, un tas paliek nezināms. Tāpat kvalitatīvo saturu ietekmē izejvielas kultivēšanas apstākļi, vai *spirulīna* ir dabīgi audzēta vai mākslīgi.

Maģistra darbā izmantotie pirmie trīs paraugi ir tablešu formā, pārējie – smalka pulvera veidā (skatīt 3.33. attēlā). Ja sasaistām formu ar iegūtajiem rezultātiem, varam novērot ka 1. paraugs, tablešu formā, ir bagātākais ar bioaktīviem savienojumiem, tam seko 3. un 5. paraugs.



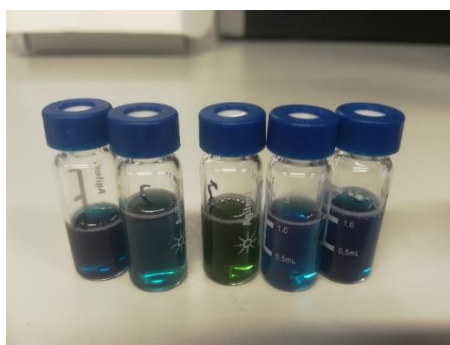
3.33. att. Maģistra darbā izmantoto paraugu formas 1. – 5. paraugs (sākot no kreisās)

3.34. attēlā ir apkopota informācija par iegūtajiem rezultātiem. Starp kopējo fenolu daudzumu un fenoliem savienojumiem var vilkt paralēles. Abās pozīcijās 5. paraugs uzrāda lielāko skaitlisko vērtību. Antiradikālo aktivitāti uzrāda gan fenolie savienojumi, pigmenti un fikocianīns, kur, savukārt, dominē 1. paraugs. Pigmenti, kuri ir ļoti nestabili, zemāko saturu uzrāda tieši 4. un 5. paraugā, kas ir pulvera veidā. Fenolo savienojumu un lipīdu saturs starp paraugiem atšķiras, bet relatīvi nenožīmīgi. Dzelzs joni uzrāda zemāko saturu 2. paraugā, bet arī 4. un 5. paraugā, tā daudzums nav augsts.



3.34. att. Veikto eksperimentu rezultātu salīdzinājums pa paraugiem

Spirulīnas sastāvā, kā jau literatūras apskatā minēts, ietilpst pigmenti fikocianīns un hlorofils. Fikocianīns dod zilo krāsu aļģei, bet hlorofils – zaļo. Kā varam novērot 3.33. attēlā, *spirulīnas* paraugi ir zaļā krāsā, bet ekstraktu – zilā. Ja salīdzinām fikocianīnu saturu, 1. un 5. paraugs uzrāda relatīvi lielāku vērtību. Kā redzams 3.35. attēlā, tieši šajos paraugos, tas ir, 1. un 5. paraugā vizuāli var novērot intensīvāku zilo krāsojumu.



3.35. att. Maģistra darbā izmantoto paraugu ekstrakti N1-N5 (sākot no kreisās)

Pēc iegūto datu analīzes, var secināt, ka maģistra darba mērķis ir sasniegts, un hipotēze, kas tika apspriesta darba ievadā, apstiprinājās. Maģistra darbā izmantotās metodes atspoguļo *spirulīnas* plašo sastāvu, un iegūtie rezultāti parāda to atšķirības starp *spirulīnas* paraugiem.

SECINĀJUMI

- 1) Apkopojot literatūrā pieejamo informāciju, secināts, ka *spirulīna* ir bagāta ar dažādiem bioloģi aktīviem savienojumiem, tādiem kā aminoskābes, mikroelementi, taukskābes, pigmenti, fenolie savienojumi, un citi.
- 2) Veicot piecu dažādu *spirulīnas* saturošo farmaceitisko preparātu ekstrakciju ar ūdeni, un fotometrisko analīzi, iespējams noteikt dzelzs (II) un (III) jonu daudzumus. Konstatēts, ka dzelzs jonu kopējais daudzums ievērojami atšķiras starp paraugiem. Lielākais to daudzums konstatēts 1. paraugā $15,029 \pm 0,795$ mg/g, savukārt mazākais – 2. paraugā, attiecīgi $2,815 \pm 0,308$ mg/g.
- 3) Izvērtējot kopējo fenolo savienojumu daudzumu, izsakot to uz galusskābes ekvivalentiem, novērots, ka tas variē starp paraugiem. Augstāks tas ir 5. paraugā ($7,882 \pm 0,260$ GSE mg/g), savukārt mazākais daudzums konstatēts 2. paraugā ($4,426 \pm 0,561$ GSE mg/g).
- 4) Antiradikālā aktivitāte, izteikta troloksa ekvivalentos, atšķiras starp analizētajiem paraugiem. Spēcīgāk tā izteikta 1. paraugam, attiecīgi $51,213 \pm 1,411$ TE mg/g, bet zemākā 2. paraugam – $5,005 \pm 0,935$ TE mg/g.
- 5) Izmantojot AEŠH/MS metodi un specializētu hromatogrāfisko kolonnu, identificētas un kvantificētas 13 *spirulīnas* produktos esošās brīvās aminoskābes. Iegūtie rezultāti parāda atšķirības starp analizētajiem paraugiem. Aminoskābēm bagātākais produkts ir 5. paraugs ar 69% no kopējās masas, savukārt 2. paraugs satur zemāko aminoskābju daudzumu (40%).
- 6) Mainot ekstrakcijas vidi un izmantojot AEŠH/MS metodi, iespējams izdalīt, identificēt un relatīvi kvantificēt dažādas savienojumu klases *spirulīnas* saturošos produktos. Ekstrakcijā ar ūdeni ir iespējams izdalīt fenolos savienojumus un pigmentus, savukārt ekstrakcijas vides nomaiņa uz metanolu, pastiprina tādu lipofīlo savienojumu kā taukskābes, izdalīšanu.
- 7) Maģistra darbā izvēlētās analīžu metodes atspoguļo *spirulīnas* saturošo produktu plašo bioloģiski aktīvo savienojumu sastāvu un būtiskas atšķirības starp darbā pētītajiem *spirulīnas* paraugiem.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt ļoti lielu pateicību maģistra darba vadītājai, ķīmijas fakultātes docentei, Dr. Chem. Ilvai Nakurtei par iespēju izstrādāt šo darbu. Paldies par atsaucību, padomiem, palīdzību un atbalstu visa darba tapšanas laikā.

Izsaku pateicību Analītiskās ķīmijas katedras ķīmiķei Gundegai Heibergai, par iespēju veikt pētījumu analītiskās ķīmijas laboratorijā.

Izsaku pateicību Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes Fizikālās katedras vadītājam Andrim Actiņam par iespēju izstrādāt šo darbu.

Liels paldies maniem draugiem un īpašs paldies manai ģimenei par izpratni un morālo atbalstu darba tapšanas laikā!

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Habibs, M. A. B.; Parvin, M. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fish. Aquaculture Circ.*, **2008**, 1-41.
2. NRA.LV. Veselība: *Spirulīna*, saukta par superproduktu. Pieejams internetā: <http://nra.lv/latvija/127202-veselibaspirulina-saukta-par-superproduktu.htm> (15.01.2018)
3. Veselam. Vai *spirulīna* ir brīnumlīdzeklis. Pieejams internetā: <http://veselam.la.lv/2015/04/02/vai-brinumlidzeklis/> (15.01.2018)
4. Gershwin, M. E.; Bealy, A. *Spirulina in human nutrition and health*; CRC Press: Taylor and Francis group; USA; 2007; pp. 1-10.
5. Wu, D.; Wang, S.; Liu, K.; Yu, X.; He, Y.; Wang, Z. Rapid measurement of morphological features of *Spirulina* microalgae filaments using microscopy and image processing algorithms. *Biosyst. Engin.*, **2012**, *112*, 35 - 41.
6. Algae-lab.com. *Spirulina Maxima* Microscopy Sample TBSSM-1 Living Algae [16.01.2018]. Pieejams internetā: <http://algae-lab.com/product/spirulina-maxima-live-algae/>
7. Colla, L. M.; Oliveira Reinehr, C.; Reichert, C.; Costa, J. A. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresour. Technol.*, **2007**, *98*, 1489-1493.
8. Hongsthong, A.; Sirijuntarut, M.; Prommeenate, P.; Thammathorn, S.; Bunnag, B.; Cheevadhanarak, S.; Tanticharoen, M. Revealing differentially expressed proteins in two morphological forms of *Spirulina platensis* by proteomic analysis. *Mol. Biotechnol.*, **2007**, *36*, 123-130.
9. Arunakumara, K. K. I. U.; Xuecheng, Z.; Xiaojin, S. Bioaccumulation of Pb²⁺ and Its Effects on Growth, Morphology and Pigment Contents of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. *J. Ocean Univ. Chin*, **2008**, *7*, 397-403.
10. Safafar, H.; van Wagenen, J.; Møller, P.; Jacobsen, C. Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Mar. Drugs*, **2015**, *13*, 7339-7356.
11. Karkos, P. D.; Leong, S. C.; Karkos, C. D.; Sivaji, N.; Assimakopoulos, D. A. *Spirulina* in clinical practice: evidence-based human applications. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2011**, *2011*, 1-4.
12. Phang, S. M. *Spirulina* cultivation in digested sago starch factory wastewater. *J. Applied Phycol.*, **2000**, *12*, 395-400.

13. Marrez, D. A.; Naguib, M. M.; Sultan, Y. Y.; Daw, Z. Y.; Higazy, A. M. Evaluation of Chemical Composition for *Spirulina platensis* in Different Culture Media. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.*, **2014**, *5*, 1170.
14. Wang, L.; Pan, B.; Sheng, J.; Xu, J.; Hu, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chem.*, **2007**, *105*, 36-41.
15. Otleş, S.; Pire, R. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *J. AOAC Int.*, **2001**, *84*, 1708-1714.
16. Kataoka, N.; Misaki, A. Glycolipids Isolated from *Spirulina maxima*: Structure and Fatty Acid Composition. *Agric. Biol. Chem.*, **1983**, *47*, 2349-2355.
17. Syarina, P. N. A.; Karthivashan, G.; Abas, F.; Arulselvan, P.; Fakurazi, S. Wound healing potential of *Spirulina platensis* extracts on human dermal fibroblast cells. *EXCLI J.*, **2015**, *14*, 385-393.
18. Fattore, E.; Fanelli, R. Palm oil and palmitic acid: a review on cardiovascular effects and carcinogenicity. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **2013**, *64*, 648-659.
19. Benoit, S. C.; Kemp, C. J.; Elias, C. F.; Abplanalp, W.; Herman, J. P.; Migrenne, S.; Lefevre, A. L.; Cruciani-Guglielmacci, C.; Magnan, C.; Yu, F.; Niswender, K.; Irani, B. G.; Holland, W. L.; Clegg, D. J. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *J. Clin. Invest.*, **2009**, *119*, 2577–2587.
20. German J.B. Dietary lipids from an evolutionary perspective: sources, structures and functions. *Matern. Child Nutr.*, **2011**, *7*, 2-16.
21. Kapoor, R.; Huang, Y. S. Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2006**, *7*, 531-534.
22. Ziboh, V. A.; Miller, C. C.; Cho, Y. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2000**, *71*, 361-366.
23. Kawamura, A.; Ooyama, K.; Kojima, K.; Kachi, H.; Abe, T.; Amano, K.; Aoyama, T. Dietary supplementation of gamma-linolenic acid improves skin parameters in subjects with dry skin and mild atopic dermatitis. *J. Oleo. Sci.*, **2011**, *60*, 597-607.
24. Das, U. N. Gamma-linolenic acid therapy of human glioma-a review of in vitro, in vivo, and clinical studies. *Med. Sci. Monit.*, **2007**, *13*, 119-131.
25. Miyake, J. A.; Benadiba, M.; Colquhoun, A. Gamma-linolenic acid inhibits both tumour cell cycle progression and angiogenesis in the orthotopic C6 glioma model through changes in VEGF, Flt1, ERK1/2, MMP2, cyclin D1, pRb, p53 and p27 protein expression. *Lipids Health Dis.*, **2009**, *8*, 1-10.

26. Wang, X.; Lin, H.; Gu, Y. Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids Health Dis.*, **2012**, *11*, 1-9.
27. Ouchi, S.; Miyazaki, T.; Shimada, K.; Sugita, Y.; Shimizu, M.; Murata, A.; Kato, T.; Aikawa, T.; Suda, S.; Shiozawa, T.; Hiki, M.; Takahashi, S.; Kasai, T.; Miyauchi, K.; Daida, H. Decreased circulating dihomo-gamma-linolenic acid levels are associated with total mortality in patients with acute cardiovascular disease and acute decompensated heart failure. *Lipids Health Dis.*, **2017**, *16*, 150-158.
28. Astarita, G.; McKenzie, J. H.; Wang, B.; Strassburg, K.; Doneanu, A.; Johnson, J.; Baker, A.; Hankemeier, T.; Murphy, J.; Vreeken, R. J.; Langridge, J.; Kang, J. X. A protective lipidomic biosignature associated with a balanced omega-6/omega-3 ratio in fat-1 transgenic mice. *PLoS One*, **2014**, *9*, 1-11.
29. El Baz, F. K.; El Baroty, G. S.; El Baky, H. H. A.; El-Salam, H. H. A.; Ibrahim, E.A. Structural characterization and Biological Activity of Sulfolipids from selected Marine Algae. *Grasas y aceites*, **2013**, *64*, 561-571.
30. Chirasuwan, N.; Chaiklahan, R.; Kittakoop, P.; Chanasattru, W.; Ruengjitchatchawalya, M.; Tanticharoen, M.; Bunnag, B. Anti HSV-1 activity of sulphoquinovosyl diacylglycerol isolated from *Spirulina platensis*. *Sci. Asia*, **2009**, *35*, 137–141.
31. Parimi, N. S.; Singh, M.; Kastner, J. R.; Das, K. C. Biomethane and biocrude oil production from protein extracted residual *Spirulina platensis*. *Energy*, **2015**, *93*, 697-704.
32. Moreira, M. L.; Rocha, A. S. R.; Ribeiro, C. L. G.; Rodrigues, R. S.; Soares, L. A. S. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Spirulina platensis*. *Afr. J. Food Sci.*, **2011**, *5*, 799-805.
33. Lupatini, A. L.; Colla, L. M.; Canana, C.; Colla, E. Potential application of microalgae *spirulina platensis* as a protein source. *J. Sci. Food Agricult.*, **2017**, *97*, 724-732.
34. Safi, C.; Charton, M.; Pignolet, O.; Silvestre, F.; Vaca-Garcia, C.; Pontalier, P. Y. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *J. Appl. Phycol.*, **2013**, *25*, 523–529.
35. Santiago-Santos, M. C.; Ponce-Noyola, T.; Olvera-Ramírez, R.; Ortega-López, J.; Cañizares-Villanueva, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. *Process Biochem.*, **2004**, *39*, 2047–2052.
36. Zheng, J.; Inoguchi, T.; Sasaki, S.; Maeda, Y.; McCarty, M. F.; Fujii, M.; Ikeda, N.; Kobayashi, K.; Sonoda, N.; Takayanagi, R. Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2013**, *304*, 110–120.

37. McCarty, M. F. Clinical potential of Spirulina as a source of phycocyanobilin. *J. Med. Food.* **2007**, *10*, 566-570.
38. Begum, H., Yusoff, F. M.; Banerjee, S.; Khatoon, H.; Shariff, M. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2016**, *56*, 2209-2222.
39. Markou, G.; Angelidaki, I.; Georgakakis, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2012**, *96*, 631-645.
40. Balaji, S.; Gopi, K.; Muthuvelan, B. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Res.*, **2013**, *2*, 278–285.
41. Yang, F.; Tang, Q.; Zhong, X.; Bai, Y.; Chen, T.; Zhang, Y.; Li, Y.; Zheng, W. Surface decoration by Spirulina polysaccharide enhances the cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*, **2012**, *7*, 835-844.
42. Kurd, F.; Samavati, V. Water soluble polysaccharides from Spirulina platensis: Extraction and in vitro anti-cancer activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2015**, *74*, 498-506.
43. Wang, F.; Ma, Y.; Liu, Y.; Cui, Z.; Ying, X.; Zhang, F.; Linhardt, J. R. A simple strategy for the separation and purification of water-soluble polysaccharides from the fresh Spirulina platensis. *Sep. Sci. Tech.*, **2017**, *12*, 1-12.
44. Mader, J.; Gallo, A.; Schommartz, T.; Handke, W.; Nagel, C. H.; Günther, P.; Brune, W.; Reich, K. Calcium spirulan derived from Spirulina platensis inhibits herpes simplex virus 1 attachment to human keratinocytes and protects against herpes labialis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2016**, *137*, 197-203.
45. Vaz, B. S.; Moreira, J. B.; Morais, M. G.; Costa, J. A. V. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements . *Curr. Opin. Food Sci.*, **2016**, *7*, 73–77.
46. Lee, J. B.; Hayashi, T.; Hayashi, K.; Sankawa, U.; Maeda, M.; Nemoto, T.; Nakanishi, H. Further purification and structural analysis of calcium spirulan from Spirulina platensis. *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 1101-1104.
47. Pugh, N.; Ross, S. A.; ElSohly, H. N.; ElSohly, M. A.; Pasco, D. S. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from Spirulina platensis, aphanizomenon flos-aquae and Chlorella pyrenoidosa. *Planta Med.*, **2001**, *67*, 737-742.
48. Balachandran, P.; Pugh, N. D.; Ma, G.; Pasco, D. S. Toll-like receptor 2-dependent activation of monocytes by Spirulina polysaccharide and its immune enhancing action in mice. *Int. Immunopharmacol.*, **2006**, *6*, 1808-1814.

49. Løbner, M.; Walsted, A.; Larsen, R.; Bendtzen, K.; Nielsen, C. H. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Med. Food.*, **2008**, *11*, 313-322.
50. Immulina Plus. Polish Roots of Immulina. Pieejams internetā: <http://immulina.co.uk/index.php?page=about-the-product> (skatīts 12.12.2017)
51. Pagnussatt, F. A.; Medeiros Del Ponte, E.; Garda-Buffon, J.; Badiale-Furlong, E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. *Pest. Biochem. Physiol.*, **2014**, *108*, 21–26.
52. Kepekçi, R. A.; Saygideger, S. D. Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. *J. Appl. Phycol.*, **2012**, *24*, 897–905.
53. El-Baky, H. H. A.; El Baz, F. K.; El-Baroty, G. S. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. *Afr. J. Biotech.*, **2009**, *8*, 7059-7067.
54. Sajilata, M. G.; Singhal, R. S.; Kamat. M. Y. The Carotenoid Pigment Zeaxanthin—A Review. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2008**, *7*, 29-49.
55. Yu, B.; Wang, J.; Suter, P. M.; Russell, R. M.; Grusak, M. A.; Wang, Y.; Wang, Z.; Yin, S.; Tang, G. *Spirulina* is an effective dietary source of zeaxanthin to humans. *British J. Nutr.*, **2012**, *108*, 611–619.
56. Chauhan, U. K.; Pathak, N. Effect of different conditions on the production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *J. Algal Biomass Utln.*, **2010**, *1*, 89 – 99.
57. Suparmi, S.; Sampurna, S.; Nur, A. C. S.; Ednisari, A. M.; Urfani, G. D.; Laila, I.; Saintika, H. R. Anti-anemia Effect of Chlorophyll from Katuk (*Sauropus androgynus*) Leaves on Female Mice Induced Sodium Nitrite. *Pharmco. J.*, **2016**, *8*, 375-379.
58. Xu, X. F.; Hu, J. P.; Cheng, X.; Yu, G. J.; Luo, F.; Zhang, G. S.; Yang, N.; Shen, P. Effects of sodium ferrous chlorophyll treatment on anemia of hemodialysis patients and relevant biochemical parameters. *J. Biol. Reg. Homeo. Agents*, **2016**, *30*, 135-140.
59. Koru, E. Earth Food *Spirulina* (*Arthrospira*): Production and Quality Standarts. *Food Add.*, **2012**, *11*, 191-203.
60. Robertsii, L; Oates, J; Linton, M; Fazio, S; Meador, B; Gross, M; Shyr, Y; Morrow, J. The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. *Free Rad. Biol. Med.*, **2007**, *43*, 37–46.
61. Karl-Heinz, W.; Kamal-Eldin, A.; Elmadfa, I. Gamma-tocopherol--an underestimated vitamin? *Ann. Nutr. Met.*, **2004**, *48*, 169–188.

62. Bationo, F.; Savadogo, A.; Kabore, D.; Ouattara – Songre, L.; Ouedraogo, H. G.; Savadogo, B.; Traore, A. Storage influence on beta-carotene and alpha-tocopherol contents of solar-dried *Spirulina platensis* (*Spirulina*). *Food Sci.*, **2015**, *9*, 546-554.
63. Dey, S.; Rathod, V. K. Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrasonics Sonochem.*, **2013**, *20*, 271-276.
64. Oglu, O. T.; Ünal, M. K. Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Food chem. Toxic.*, **2003**, *68*, 1144-1148.
65. Baicus, C.; Baicus, A. *Spirulina* did not ameliorate idiopathic chronic fatigue in four N-of-1 randomized controlled trials. *Phyto. Res.*, **2007**, *21*, 570–573.
66. Misbahuddin, M.; Islam, A. Z.; Khandker, S.; Al-Mahmud, I.; Islam, N.; Anjumanara. Efficacy of spirulina extract plus zinc in patients of chronic arsenic poisoning: a randomized placebo-controlled study. *Clin. Tox.*, **2006**, *44*, 135–141.
67. Ismail, V.; Hossain, M. F.; Tanu, A. R.; Shekhar, H. U. Effect of spirulina intervention on oxidative stress, antioxidant status, and lipid profile in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Biomed. Res. Int.*, **2015**, *2015*, 1-7.
68. Serban, M. C.; Sahebkar, A.; Dragan, S.; Stoichescu-Hogea, G.; Ursoniu, S.; Andrica, F.; Banach, M. A systematic review and meta-analysis of the impact of *Spirulina* supplementation on plasma lipid concentrations. *Clin Nutr.*, **2016**, *35*, 842-851.
69. Torres-Duran, P. V.; Ferreira-Hermosillo, A.; Juarez-Oropeza, M. A. Antihyperlipidemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of Mexican population: a preliminary report. *Lipids Health Dis*, **2007**, *26*, 6–33.
70. Seyidoglu, N.; Inan, S.; Aydin, C. A Prominent Superfood: *Spirulina platensis*. In: *Agricultural and Biological Sciences. Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine*; Ed.; Naofumi Shiomi and Viduranga Waisundara; 2017; pp. 1-29.
71. Toughan, H.; Khalil, S. R.; El-Ghoneimy, A. A.; Awad, A.; Seddek, A. S. Effect of dietary supplementation with *Spirulina platensis* on Atrazine-induced oxidative stress-mediated hepatic damage and inflammation in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2017**, *149*, 135-142.
72. Reddy, M. C.; Subhashini, J.; Mahipal, S. V.; Bhat, V. B.; Srinivas Reddy, P.; Kiranmai, G.; Madyastha, K. M.; Reddanna, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **2003**, *304*, 385–392.

73. Finamore, A.; Palmery, M.; Bensehaila, S.; Peluso, I. Antioxidant, Immunomodulating, and Microbial-Modulating Activities of the Sustainable and Ecofriendly Spirulina. *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2017**, 1-15.
74. Panigrahi, B. B.P; Panda, P. K.; Patro, V. J. Wound healing activity of spirulina extracts. *Intern. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **2011**, 6, 132–135.
75. Loke, M. F.; Lui, S. Y.; Ng, B. L.; Gong, M.; Ho, B. Antiadhesive property of microalgal polysaccharide extract on the binding of Helicobacter pylori to gastric mucin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **2007**, 50, 231–238.
76. Mao, T. K.; van de Water, J.; Gershwin, M. E. Effects of a Spirulina-based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. *J. Med. Food*, **2005**, 8, 27–30.
77. Ishii, K.; Katoch, T.; Okuwaki, Y.; Hayashi, O. Influence of dietary Spirulina platensis on IgA level in human saliva. *J. Kagawa Nutr. Univ.*, **1999**, 30, 27–33.
78. Hirahashi, T.; Matsumoto, M.; Hazeki, K.; Saeki, Y.; Ui, M.; Seya, T. Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of Spirulina platensis. *Inter. Immunopharm.*, **2002**, 2, 423–434.
79. Nichols, B.; Wood, B. The occurrence and biosynthesis of gamma linolenic acid in Spirulina platensis. *Lipids*, **1986**, 3, 46–50.
80. Daoud, H. M.; Soliman, E. M. Evaluation of *Spirulina platensis* extract as natural antiviral against foot and mouth disease virus strains (A, O, SAT2). *Vet. World*, **2015**, 8, 1260-1265.
81. Chen, Y. H.; Chang, G. K.; Kuo, S. M. Well-tolerated Spirulina extract inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced mortality. *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 1-11.
82. El Shanshory, M. R.; Awad, M. A.; El Shafey, R. A.; Soliman, H. H.; Alsharkawy, A. A. Evaluation of Liver Iron Concentrations in Children with Beta Thalassemia Infected with Hepatitis C Virus Before and After Spirulina Therapy by Magnetic Resonance Imaging. *Arch. Blood Transfus. Disord.*, **2017**, 1-9.
83. Hernandez, F. Y. F.; Khandual, S.; López, I. G. R. Cytotoxic effect of *Spirulina platensis* extracts on human acute leukemia Kasumi-1 and chronic myelogenous leukemia K-562 cell lines. *Asian Pacific J. Trop. Biomed.*, **2017**, 7, 14-19.
84. Koničková, R.; Vaňková, K.; Vaníková, J.; Váňová, K.; Muchová, L.; Subhanová, I.; Zadinová, M.; Zelenka, J.; Dvořák, A.; Kolár, M.; Strnad, H.; Rimpelová, S.; Ruml, T.; J Wong, R.; Vitek, L. Anti-cancer effects of blue-green alga Spirulina platensis, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Ann. Hepatol.*, **2014**, 13, 273-83.

85. Abed E.; Ihab, A. N.; Suliman, E.; Mahmoud A. Impact of Spirulina on Nutritional Status, Haematological Profile and Anaemia Status in Malnourished Children in the Gaza Strip: Randomized Clinical Trial. *Matern. Pediatr. Nutr.*, **2016**, *2*, 1-6.
86. James, R.; Sampath, K.; Thangarathinam, R.; Vasudevan, I. Effect of dietary Spirulina level on growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *xiphophorus helleri*. *Israeli J. Aquaculture*, **2006**, *58*, 97–104.
87. Kistanova, E.; Marchev, Y.; Nedeva, R.; Kacheva, D.; Shumkov, K.; Georgiev, B.; Shimkus, A. Effect of the Spirulina *pl atensis* included in the main diet on the boar sperm quality. *Biotech. Animal Husbandry*, **2009**, *25*, 547–557.
88. Campanella, L.; Crescentini, G.; Avino, P. Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on Spirulina. *Analisis*, **1999**, *27*, 533-540.
89. Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., Jurikova, T. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Mol.*, **2015**, *20*, 1118-1133.
90. Mendiola, J.A., Marín, F. R., Hernández, S. F., Arredondo, B. O., Señoráns, F. J., Ibañez, E., Reglero, G. Characterization via liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry of supercritical fluid antioxidant extracts of *Spirulina platensis* microalga. *J Sep Sci.*, **2005**, *28*, 1031-1038.
91. Al-Dhabi, N. A., Arasu, V. M. Quantification of Phytochemicals from Commercial Spirulina Products and Their Antioxidant Activities. *Send Evid Based Complement Alternat Med.*, **2016**, *2016*, 1-13.
92. Pohndorf, R. S., Camara, A. S., Larrosa, A. P. Q., Pinheiro, C. P., Strieder, M. M., Pinto, L. A. A. Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. *Biomass and Bioenergy*, **2016**, *93*, 25 - 32.
93. Campanella, L., Russo, M. V., Avino, P. Free and total amino acid composition in blue-green algae. *Ann Chim.*, **2002**, *92*, 343-352.
94. Jākobsone, I. *Pārtikas produktu uzturvērtības noteikšana*. Rīga; LU Akadēmiskais apgāds; 2008; 65.—66. lpp.
95. Kjeldahl method [tiešsaiste]. Science @ a distance: Quantitative analysis [sk. 27.11.2017]. Pieejams internetā:
http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/SDKC/Chem/SD_KjeldahlMethod.html.
96. Intrada Amino Acid. Amino Acids Separation Column for LC-MS. Imact technical report. Pieejams internetā: <http://www.imtakt.com/Brochure/TR06AE.pdf> (13.03.2018)

97. To, T. Q., Procter, K., Simmons, B. A., Subashchandrabose, S., Atkin, R. Low cost ionic liquid-water mixtures for effective extraction of carbohydrate and lipid from algae. *Faraday discuss*, **2017**, *206*, 93-112.
98. Zhang, P., Wang, Z., Xie, M., Nie, W., Huang, L. Detection of carbohydrates using a pre-column derivatization reagent 1-(4-isopropyl) phenyl-3-methyl-5-pyrazolone by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2010, *878*, 1135-1144.
99. Hadiyanto, H.; Marsya, M. A.; Fatkhiyatul, P. Improved yield of β -carotene from microalgae spirulina platensis using ultrasound assisted extraction. *J. Tech.*, **2015**, *77*, 219–222.
100. Dere, S.; Gunes, T.; Sivaci, R. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *Tr. J. of Botany*, **1998**, *22*, 13-17.
101. Hynstova, V., Sterbova, D., Klejdus, B., Hedbavny, J., Huska, D., Adam, V. Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing Chlorella vulgaris and Spirulina platensis using High Performance Thin Layer Chromatography. *J Pharm Biomed Anal.*, **2018**, *148*, 108-118.
102. Moraes, C. C.; Sala, L.; Cerveira, G. P.; Kalil, S. J. C-PHYCOCYANIN EXTRACTION FROM Spirulina platensis WET BIOMASS. *Brazilian J. Chem. Engin.*, **2011**, *28*, 45-49.
103. Sarada, R.; Pillai, G. M.; Ravishankar, G.A.. Phycocyanin from Spirulina sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochem.*, **1999**, *34*, 795–801.
104. Kissoudi, M., Sarakatsianos, I., Samanidou, V. Isolation and purification of food-grade C-phycocyanin from Arthrospira platensis and its determination in confectionery by HPLC with diode array detection. *J Sep Sci.*, **2018**, *41*, 975-981.
105. Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A. S., Raghavarao, K. S. M. S. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *J Chromatography A*, **2006**, *1127*, 76–81.
106. Minkova, K. M., Tchernov, A. A., Tchorbadjieva, M. I., Fournadjieva, S. T., Antova, R. E., Busheva, M. C. Purification of C-phycocyanin from Spirulina (Arthrospira) fusiformis. *J Biotech.*, **2003**, *102*, 55-59.
107. Santiago-Santos, M. C., Ponce-Noyola, T., Olvera-Ramírez, R., Ortega-López, J., Cañizares-Villanueva, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from Calothrix sp. *Process Biochem.*, **2004**, *39*, 2047–2052.

108. Yan, S. G., Zhu, L. P., Su, H. N., Zhang, X. Y., Chen, X. L., Zhou, B. C., Zhang, Y. Z. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoyanin and allophycoyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *J Appl Phycol*, **2011**, *23*, 1–6.
109. Boussiba, S., Richmond, A. E. Isolation and Characterization of Phycocyanins from the Blue-Green Alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.*, **1979**, *120*, 155-159.
110. Bermejo, R., Felipe, M. A., Talavera, E. M., Alvarez-Pez, J. M. Expanded Bed Adsorption Chromatography for Recovery of Phycocyanins from the Microalga *Spirulina Platensis*. *Chromatographia*, **2006**, *63*, 59-66.
111. Benedetti, S., Rinalducci, S., Benvenuti, F., Francogli, S., Pagliarani, S., Giorgi, L., Micheloni, M., D'Amici, G. M., Zolla, L., Canestrari, F. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *J Chromatography B*, **2006**, *833*, 12–18.
112. Minkova, K. M., Tchernov, A. A., Tchorbadjieva, M. I., Fournadjieva, S. T., Antova, R. E., Busheva, M. C. Purification of C-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *J Biotech.*, **2003**, *102*, 55-59.
113. Yan, S. G., Zhu, L. P., Su, H. N., Zhang, X. Y., Chen, X. L., Zhou, B. C., Zhang, Y. Z. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoyanin and allophycoyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *J Appl Phycol*, **2011**, *23*, 1–6.
114. Moor, V. J. A.; Pieme, C. A.; Biapa, P. C. N.; Matip, M. E. N.; Moukette, B. M.; Nzufo, F. T.; Nanfack, P.; Ngogang, J. Chemical composition of spirulina platensis of nomayos-yaounde (cameroon). *Annals. Food Sci. Tech.*, **2016**, *17*, 524-528.
115. Mahadev, D. J. J. An Improved and Efficient Method for the Extraction of Phycocyanin from *Spirulina* sp. *Intern J Food Engin.*, **2005**, *1*, 1-13.
116. Sobiechowska-Sasim, M., Stoń-Egiert, J., Kosakowska, A. Quantitative analysis of extracted phycobilin pigments in cyanobacteria—an assessment of spectrophotometric and spectrofluorometric methods. *J Appl Phycol.*, **2014**, *26*, 2065–2074.
117. Zhang, Y. M., Chen, F. A simple method for efficient separation and purification of c-phycoyanin and allophycoyanin from *Spirulina platensis*. *Biotech Techn.*, **1999**, *13*, 601–603.
118. Tirzitis, G.; Bartosz, G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, **2010**, *57*, 139-142
119. Shalaby, E. A.; Shanab, S. M. M. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*.

- Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J Geo-Marine Sci*, **2013**, *42*, 556-564.
120. Herald, T. J.; Gadgil, P.; Tilley, M. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *J. Sci. Food Agric.*, **2012**, *92*, 2326-2331.
121. *Phenol – Explorer*. <http://phenol-explorer.eu/downloads> (skatīts 12.05.2018).
122. *3 – D Lipid Data Bank*.
http://adan-embl.ibmc.umh.es/lipiddatabank/lipid_classview.asp?Id=236 (skatīts 13.05.2018).
123. Gutiérrez-Salmeán, G.; Fabila-Castillo, L.; Chamorro-Cevallos, G. Nutritional and toxicological aspects of spirulina (arthrospira). *Nutr Hosp*, **2015**, *1*, 34-40.
124. Falquet, J. The nutritional aspects of spirulina. Pieejams internetā: https://www.antenna.ch/wp-content/uploads/2017/03/AspectNut_UK.pdf (skatīts 20.05.2018)
125. Madhyastha, H. K.; Vatsala, T. M. Pigment production in *Spirulina fusciformis* in different photophysical conditions. *Biomol Eng*, **2007**, *3*, 301-305.
126. Raw living spirulina. Spray drying and storage of spirulina causes over 50% loss of beta-carotene. Pieejams internetā: <https://www.rawlivingspirulina.com/single-post/2017/02/22/Spray-drying-and-storage-of-spirulina-causes-over-50-loss-of-beta-carotene> (skatīts 19.05.2018).
127. Rocha-Parra, D. F.; Lanari, M. C.; Zamora, M. C.; Chirife, J. Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine. *LWT – food sci tech*, **2016**, *70*, 162 – 170.
128. Kumar, R. K.; Mahadevaswamy, M.; Venkataraman, L V. Z. Storage quality of powder cyanobacterium – *Spirulina platensis*. *Lebensm Unters Forch*, **1995**, *201*, 289 – 292.
129. Stetems, B. *Zini, ko tu pērc*; Zvaigzne ABC: Rīga, 2007; 1 – 375.

Maģistra darbs „Bioloģiski aktīvo vielu izvērtējums un salīdzinājums *spirulīnas* saturošos farmaceitiskajos produktos” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē.

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

Autors: _____ Zita Freiberga
(*personiskais paraksts*) (*paraksta atšifrējums*)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja docente, Dr. chem. Ilva Nakurte: _____
(*personiskais paraksts*) (*datums*)

Recenzents asoc. prof., Dr.chem. Kristaps Jaudzems: _____
(*personiskais paraksts*) (*datums*)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____ (*datums*)

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

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

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

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