

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS MAĢISTRA STUDIJU PROGRAMMA

FERULSKĀBES NOTEIKŠANA
***CENTAURIUM ERYTHRAEA*,**
IZMANTOJOT ŠĶIDRUMU HROMATOGRĀFIJAS-
MASSPEKTROMETRIJAS METODI

MAĢISTRA DARBS

Autore: **Agneta Lindmane**

Studenta apliecības Nr.: al10125

Darba vadītāja: Dr. chem. Ilva Nakurte

RĪGA 2015

ANOTĀCIJA

Maģistra darba mērķis bija veikt čemura augstiņa (*Centaurium erythraea*) ķīmiskā sastāva un bioloģiskās aktivitātes izvērtēšanu. Analizēti tika in vitro augu, in vitro augu audu, kallusa kultūru un drogas paraugi. Rezultātā tika atrasti divi savienojumi-izoferulskābe (izo-FS) un dihidroferulskābe (dihidro-FS). Veicot ķīmisko izvērtējumu, secināts, ka izo-FS labāk šķīst 96% etanolā, bet dihidro-FS-0% etanolā; abi savienojumi no visām kultūrām lielākā daudzumā atrodami in vitro augu kultūrā. Čemura augstiņa kopējais fenolu daudzums un antiradikālā aktivitāte vislielākā ir in vitro audu augu kultūrā.

Atslēgas vārdi: čemuru augstiņš, izoferulskābe, dihidroferulskābe, augu kultūra, augu audu kultūra, kallusa kultūra

ABSTRACT

The aim of research was determination of chemical composition and biological activity in centaury (*Centaureum erythraea*). Research materials were samples of in vitro plant, in vitro plant cell, calli cultures and herbal tea. As a result we found two compounds-isoferulic acid (iso-FA) and dihydroferulic acid (dihydro-FA). As found after chemical assessment iso-FA is better soluble in 96% ethanol but dihydro-FA-in 0% ethanol; both compounds were found in greater quantities in samples of in vitro plant culture. Total phenolic content and antiradical activity were higher in samples of in vitro plant cell culture.

Key words: centaury, isoferulic acid, dihydroferulic acid, plant culture, plant cell culture, calli culture

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

FS — ferulskābe

Izo-FS — izoferulskābe

Dihidro-FS — dihidroferulskābe

Trans-FS — transferulskābe

Di-FS — diferulskābe

PAL — fenilalanīna amonija liāze

SAM — S-adenozilmetionīns

PGP — progresējošas glikozilēšanās gala produkti

PEPCK — fosfoenolpiruvāta karboksikināze

AAK — augu audu kultūras

DFPH — 2,2-difenil-1-pikrilhidrazils

ABTS — 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolīna-6 sulfonskābe

ŠH-AIMS — šķidrums hromatogrāfija-augstas izšķirtspējas masspektrometrija

GSE — galluskābes ekvivalents

ASE — askorbīnskābes ekvivalents

IEVADS

Dabiskas izcelsmes produkti vienmēr ir izraisījuši lielu interesi. Aptuveni 80% visu pasaules iedzīvotāju lieto augu un dzīvnieku izcelsmes produktus medicīnā. Ārstniecības augi ir izmantoti kopš seniem laikiem, un to pieprasījums pieaug katru dienu (Verma and Singh, 2008). Kosmētikas līdzekļos tiek lietoti dažādi augu izcelsmes materiāli-kultivēti augi, savvaļā audzēti augi, augu tējas, medicīniskie augi, aļģes, sēnes, sūnas u.c. Lai kādu ārstniecības augu varētu izmantot, tas ir jāidentificē, jāizvēlas, kuru auga daļu lietot, izvērtējot kur ir vairāk aktīvo un mazāk toksisko savienojumu, kā arī jāveic auga izpēte (Antignac *et al.*, 2011).

Čemuru augstiņš ir ārstniecības augs, kas parasti tiek izmantots kā apetīti uzlabojošs līdzeklis. Tā sastāvā ir dažādu klašu savienojumi-skābes, alkaloīdi, terpenoīdi, ksantāni u.c. Viens no šiem savienojumiem ir ferulskābe (Barnes *et al.*, 2007). Ferulskābe ir fenolskābe, kam piemīt antioksidanta īpašības (Srinivasan *et al.*, 2007).

Maģistra darba mērķis ir veikt čemura augstiņa ķīmiskā sastāva un bioloģiskās aktivitātes izvērtēšanu.

Darba uzdevumi ir:

1. Noteikt ferulskābes daudzumu čemuru augstiņā ar šķidrums hromatogrāfijas metodi.
2. Novērtēt ekstrakcijas šķīdinātāja ietekmi uz ferulskābes daudzumu.
3. Novērtēt elicitoru ietekmi uz savienojumu uzkrāšanos *in vitro* kultivētu augu paraugos.
4. Noteikt un salīdzināt kopējo fenolu daudzumu un antiradikālo aktivitāti dažādās augu kultūrās.
5. Noteikt un salīdzināt ferulskābes daudzumu dažādās augu kultūrās.

Darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes Hromatogrāfijas laboratorijā un Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes Bioanalītisko un biodozimetrisko analīžu laboratorijā.

SATURS

ANOTĀCIJA.....	2
ABSTRACT	3
APZĪMĒJUMU SARAKSTS	4
IEVADS	5
1.LITERATŪRAS SARAKSTS	8
1.1. Ķemuru augstiņš	8
1.1.1. Ķemuru augstiņa farmakoloģiskie efekti.....	8
1.1.2. Ķemuru augstiņa pielietoņjums	9
1.1.3. Ķemuru augstiņa fitoķīmiskais sastāvs.....	11
1.2. Ferulskābe.....	13
1.2.1. Ferulskābes biosintēze.....	14
1.2.2. Ferulskābes farmakokinētika.....	14
1.2.3. Ferulskābes izmantošana, iedarbība	15
1.3. Izoferulskābe	17
1.4. Dihidroferulskābe	19
1.5. Biotehnoloģija	20
1.5.1. Biotehnoloģijas izmantošana.....	20
1.5.2. Elicitori	21
1.6. Augu bioloģiskās aktivitātes noteikšanas metodes.....	22
1.6.1. Kopējo fenolu noteikšana	22
1.6.2. Antioksidantu aktivitātes noteikšana	22
1.6.3. Mikroplašu izmantošana.....	23
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	24
2.1. Analizētie paraugi.....	24
2.2. Ķīmiskais izvērtējums, izmantojot ŠH-AIMS.....	24
2.2.1. Parauga sagatavošana	24
2.2.2. Reāģenti un palīģvielas.....	24
2.2.3. Aparatūra	24
2.2.4. Masspektrometrijas apstākļi	25
2.2.5. Savienojumu kvantitatīvā noteikšana analizējamā paraugā	26
2.3. Kopējā fenolu daudzuma noteikšana.....	26
2.3.1. Reāģenti, palīģvielas, iekārtas	26
2.3.2. Darba gaita.....	27

2.4. Antiradikālās aktivitātes noteikšana	28
2.4.1. Reāģenti, palīgvielas, iekārtas	28
2.4.2. Darba gaita.....	28
2.5. Statistiskā analīze	29
3. REZULTĀTI	30
3.1. Ķīmiskais izvērtējums, izmantojot ŠH-AIMS.....	30
3.2. Šķīdinātāja ietekme uz izdalīto savienojumu koncentrāciju.....	32
3.3. Elicitoru ietekme uz izdalīto savienojumu koncentrāciju.....	34
3.4. Kopējā fenolu daudzuma noteikšana	36
3.5. Antiradikālās aktivitātes noteikšana	36
3.6. Izo-FS un dihidro-FS noteikšana dažādās kultūrās	38
4. DISKUSIJA	39
5. SECINĀJUMI	43
6. PATEICĪBAS	44
7. PUBLICITĀTE	45
8. IZMANTOTĀ LITERATŪRA	46

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Ķemuru augstiņš

Ķemuru augstiņš (*Centaurium erythraea*) ir viengadīgs vai pārziemojošs ģenciānu dzimtas lakstaugs (1.1.att.). Tā stumbrs ir 10-45 cm augsts, ķetršķautņains, parasti augšdaļā dihotomiski zarojas.

Lapas ir sēdošas, pretējas, ar piecām dzīslām un gludu malu, strupu vai asu galu. Stumbra vidū tās ir iegareni eliptiskas. Lapu ģarums ir 1-2,5 cm, platums-0,3-0,8 cm. Ziedu nav daudz, tie sakārtoti divžuburoņos. Ziedi atveras tikai sausā, saulainā laikā. Zied no jūlija līdz septembrim. Auglis ir viencirkņa pogaļa ar sēklām.



1.1.att.Ķemuru augstiņš (Hillewaert, 2006).

Ķemuru augstiņš aug nelielās ģrupās pļāvās, norās, krūmājos, pakalnos. To var kultivēt. Kā droģu izmanto lakstus. Tos ievāc auga ziedēšanas periodā, žāvē ēnainā vietā (Pētersone, 1968; Rubine un Eniņa, 2004)

1.1.1. Ķemuru augstiņa farmakoloģiskie efekti

Ķemura augstiņam piemīt plaša spektra farmakoloģiskie efekti, tādi kā antiedēmisks, pretiekaisuma, pretmalārijas, antipirētisks, sedatīvs, tonizējošs, insulīna izdalīšanās stimulējošs, gremošanu veicinošs efekts.

Ķemuru augstiņam piemīt arī diabētu ārstējošs efekts. Žurkām, kurām tika dots gan streptozotocīns, gan ķemura augstiņa ekstrakts, salīdzinot ar žurkām, kurām tika dots tikai streptozotocīns, tika novērts cukura līmeņa samazinājums asinīs par 63%, savukārt insulīna izdalīšanās palielinājās par 78%, visbeidzot triglicerīdu un kopējā holesterīna daudzums serumā ievērojami samazinājās. Histoloģiski tika novērota neliela Langerhansa saliņu hipertrofija, palielināts diametrs un skaits, kas norāda uz ķemura augstiņa spēģu aizsargāt aizkuņģa dziedzera šūnas (Sefi *et al.*, 2011). Citā pētījumā tika salīdzinātas glikozes līmeņa izmaiņas asinīs, lietoģot dažādu devu ķemura augstiņa ekstraktus kopā ar ģlibenklamīdu. Ķemuru augstiņa ekstrakts ar devu 125 mg/kg samazināja glikozes līmeni par 74% seģu dienu

laikā, kas bija tikai par 6% mazāk nekā lietojot glibenklamīdu. Bet pēc deviņām dienām kopš eksperimenta sākuma, visu devu čemura augstiņa ekstrakti (125 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg) uzrādīja labāku efektu glikozes līmeņa samazināšanai asinīs, salīdzinājumā ar glibenklamīdu (Stefkov *et al.*, 2014). Literatūrā tiek aprakstīts, ka čemuru augstiņam nepiemīt toksicitāte. Pārbaudot čemura augstiņa ūdens ekstraktus uz žurkām, toksiska iedarbība netika pierādīta, ievadot ekstraktus orāli, bet, ievadot ekstraktus intraperitoneāli, letalitāte parādījās pie lielām to devām-žurku mātītēm 10 g/kg, tēviņiem 12 g/kg (Tahraoui *et al.*, 2010).

Čemura augstiņš uzrāda hepatoprotektīvu efektu. Pārbaudot acetoaminofēna (paracetamola) izraisītus aknu bojājumus, tika atklāts, ka lietojot čemura augstiņa metanola ekstraktu (300 mg/kg) sešu dienu laikā samazinājās enzīmu seruma glutamāta oksaloacetāta transamināzes, glutamāta piruvāta transamināzes unlaktāta dehidrogenāzes līmenis. Histoloģiskie pētījumi parādīja, ka pēc ekstrakta lietošanas aknās ir mazāk nekrozes, savukārt hepatocītos mazāk triglicerīdu (Mroueh *et al.*, 2004).

Gastroprotektīvais efekts tika pārbaudīts žurkām ar aspirīna izraisītiem kuņģa bojājumiem. Lietojot aspirīnu kopā ar čemuru augstiņu par 77% samazinājās ievainojumu laukuma un kopējā kuņģa laukuma attiecība (čūlu indekss). Kā arī samazinājās mieloperoksidāzes (enzīms, kas norāda uz neitrofilu infiltrāciju kuņģa gļotādā) līmenis, salīdzinājumā ar aspirīna monoterapiju (Tuluze *et al.*, 2011).

1.1.2. Čemuru augstiņa pielietojums

Čemuru augstiņu galvenokārt lieto žāvētā (tējas) veidā. Dienā ieteicams lietot 2-4g auga trīs reizes dienā. To var lietot arī šķīduma veidā, piemēram, 2-4 ml šķīduma (1:1 ar 25% etilspirtu) trīs reizes dienā. Kā kontraindikācijas tiek minēta grūtniecība, barošana ar krūti, lietošana bērniem datu trūkuma dēļ, kā arī kuņģa čūlas slimniekiem, lai netiktu papildus kairināta kuņģa gļotāda (Duke *et al.*, 2002). Čemuru augstiņš ir pieejams kā tinktūra (1:5 ar 70% etanolu), ko iesaka lietot pa 30 pilieniem 3 reizes dienā un kā ekstrakts ar ūdeni (1:10), ieteikts lietot pa 0,2g līdz 5 reizēm dienā, un visbeidzot pulvera veidā tas ieteicams 1-2g 3 reizes dienā (EMA, 2009). Čemuru augstiņš atrodams arī jau iestrādātos uztura bagātinātājos, medikamentos (1.1. tabula).

Ķemuru augstiņu saturošie Latvijā reģistrētie uztura bagātinātāji, bezrecepšu medikamenti

Uztura bagātinātāji (PVD, 2015)		Bezrecepšu medikamenti (ZVA, 2015)	
Nosaukums	Pielietojums	Nosaukums	Pielietojums
<ul style="list-style-type: none"> • Narkofit • Pari-Evalar • Pari Evalar 	Atkarību pārvarēšana	<ul style="list-style-type: none"> • Canephron apvalkotās tabletes 	Vieglai urīnceļu iekaisuma slimību ārstēšana, profilaktiska nierakmeņu veidošanās novēršana
<ul style="list-style-type: none"> • Bittner Balzāms kapsulas • Zviedru rūgtā balzams Arlberger Schwedenbitter 	Gremošanas, apetītes veicināšana	<ul style="list-style-type: none"> • Original Grosser Bittner Balsam šķīdums iekšķīgai un ārīgai lietošanai 	Kuņģa-zarnu trakta darbības traucējumu novēršana, locītavu un mīksto audu sāpju novēršana u.c.
<ul style="list-style-type: none"> • Folium-UD 	Organisma stiprināšana		
<ul style="list-style-type: none"> • Nefrostens 	Nieru veselības veicināšana		

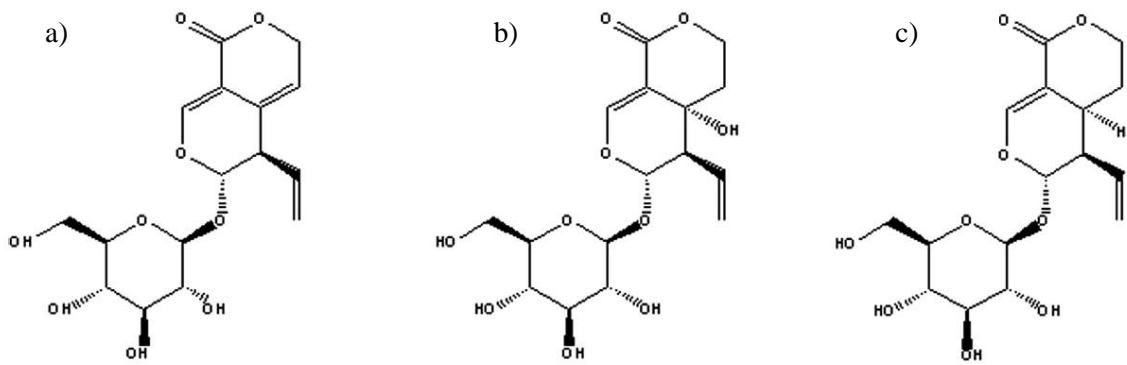
Ķemuru augstiņu izmanto arī Baha terapijā. Baha ziedu terapijas pamatā ir savvaļas augu esenču izmantošana, lai neitralizētu kādu negatīvu emocionālo stāvokli. Ķemuru augstiņa augšanas īpatnības, piemēram, nelielais stublāju augstums, kas padara tos mazāk ievērojamus, tiek pielīdzinātas cilvēku īpašībām. To izmanto, kad emocionālais stāvoklis ir jūtīgs uz citu ietekmi, idejām. Šī esence palīdz klusiem, izpalīdzīgiem cilvēkiem, kuri nespēj atteikt savu palīdzību citiem un pārvērtē savas spējas. Esenci gatavo ar saules metodi-ūdens virsmu noklāj ar svaigi noplūktiem ziediem, ziedus izņem, ūdeni pilda pudelēs, kur pievieno tādu pašu daudzuma brendija, kas kalpo kā konservants (Barnards, 2010).

1.1.3. Ķemuru augstina fitoķimiskais sastavs

Ķemuru augstina sastavā ir sastopama virkne savienojumu no daķādām to klasēm:

- Fenolsķābes-hidroksibenzosķābe, vanilīnskķābe, ceriņskķābe (*syringic acid*), p-kumarīnskķābe, ferulskķābe, sinapīnskķābe (*sinapinic acid*), kafijskķābe, hidroksitereftalātsķābe, 2,5-dihidroksitereftalātsķābe, o-hidroksifeniletijksķābe, u.c.;
- Alkaloidi-gencianīns, gencianidīns, gentioflavīns;
- Iridoīdi-gentiopikrozīds, centapikrīns, gentioflavozīds, sverozīds un tā esteri, svertiamarīns, katapikrīns, deacetylcentapikrīns, centaurozīds, sekologanīns, 6'-m-hidroksibenzoilloganīns, dihidrokornīns, gentioflavozīds;
- Triterpenoidi-alfa, beta-amirīns, eritrodīols, krategolsķābe, oleanolsķābe, sitosterols, stigmasterols, kampesterols (EMA, 2009; Barnes *et al.*, 2007).
- Ksantāni-eustomīns, 8-demetileustomīns, dekusatīns, metilbellidifolīns, mangiferīns (Šiler *et al.*, 2014; Barnes *et al.*, 2007).
- Citas vielas-kumarīni, flavanoidi, tauksķābes, alkāni, vaski (Barnes *et al.*, 2007).

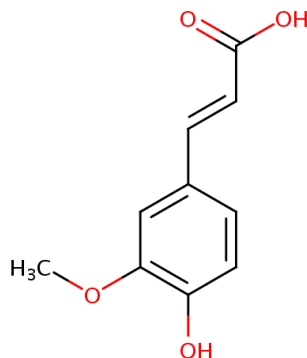
Svertiamarīns (2.att.b) un sverozīds (2.att.c) ir sekoiridoīdie glikozīdi, kam piemīt antibakteriālās īpašības pret *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*. Svertiamarīns kavē arī *Proteus mirabilis*, *Serratia marcesens*, bet sverozīds-*Staphylococcus epidermidis*. Abiem šiem savienojumiem piemīt arī toksicitāte; LD50 vērtības ir 8,0 µg/ml (svertiamarīns) un 34 µg/ml (sverozīds) (Kumarasamy *et al.*, 2003 a). Arī gentiopikrozīdam (1.2.att.a) tika pārbaudīta antibakteriālā iedarbība. Kopumā tas inhibēja 11 patogēnisku baktēriju augšanu-*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcesens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis*. Šim savienojumam piemīt vājas antioksidantu īpašības, bet svertiamarīnam un svertiozīdam šādu efektu nenovēro vispār (Kumarasamy *et al.*, 2003 b). Citā pētījumā šiem savienojumiem tika pierādīta antibakteriāla iedarbība arīdzan uz *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus flavus*; kā arī pret sēnīšu iedarbība uz 8 sēnītēm-*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrocloron*, *Trichoderma viride*, *Candida albicans* (Šiler *et al.*, 2014).



1.2.att. Ķīmiskās struktūras čemura augstīnā atrodamajiem iridoīdiem: a) gentiopikrozīds; b) svertiamīns; c) sverozīds

1.2. Ferulskābe

Viens no visvairāk izolētajiem un aprakstītajiem savienojumiem čemuru augstīnā ir ferulskābe (1.3.att.). Ferulskābes (FS) nosaukums ir radies no auga *Ferula foetida*, kurā 1866. gadā pirmo reizi tika atrasta FS (Draeos *et al.*,2008). Vēlāk 1925. gadā tā tika ķīmiski sintezēta.



1.3.att.Ferulskābes ķīmiskā struktūra

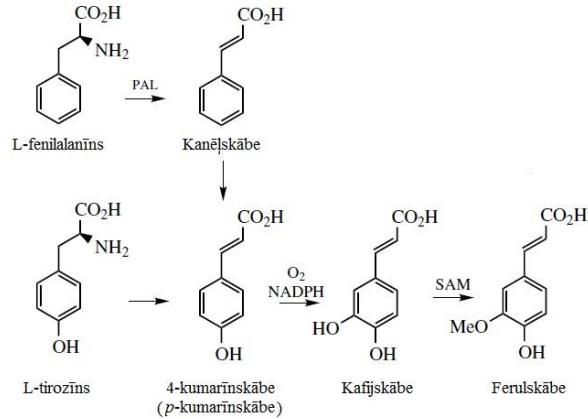
FS jeb 4-hidroksi-3-metoksikanēļskābe ir satopama gan *cis*-, gan *trans*-formā. Izomēru nosaka sānu ķēdē esošā dubultsaite. Augos lielākā daudzumā atrodama tieši *trans*-FS. FS augos parasti ir atrodama saistītā veidākā esteri, piemēram, ar ogļhidrātiem, amīdiem (Kumar and Pruthi, 2014). Augļos, dārzeņos FS atrodama saistīta ar hinskābi (*quinic acid*; kafija, kāposti, selerijas, burkāni), ar saharīnskābi (citrusaugļi), ar ābolskābi (redīsi), ar glikozi (āboli, kāposti), ar digalaktosi (spināti). Sakņaugos, graudaugos FS bieži atrodama kā dimērs (di-FS), saistīta ar polisaharīdiem vai esterificēta ar arabinozi, galaktozi. Graudaugos FS irsaistītā veidā ar steroliem, piemēram, ar orizanolu (Zhao and Moghadasian, 2008). Augušu apvalkos FS lielā daudzumā atrodama kā dihidro-FS saistītā veidā ar polisaharīdiem, proteīniem (Ou and Kwok, 2004).

FS piemīt maza toksicitāte. Žurkām tās LD50 vērtība ir 2445 mg/kg tēviņiem un 2113 mg/kg mātītēm (Ou and Kwok, 2004).

FS ir atrodama dažādos augos, piemēram, graudaugos (rīsi, kvieši, auzas), dārzeņos (bietes, sarkanie kāposti, tomāti, burkāni), augļos (apelsīni, banāni, āboli), pākšaugos (sojas pupiņas), riekstos (zemesrieksti), kā arī kafijas pupiņās, ārstniecības augos (diždadzis). Liels FS daudzums ir cukurbietēs (800 mg/100g), popkornā (313 mg/100g), bambusa dzinumos (243,6 mg/100g), ūdens padillēs (7,3-34 mg/100g), baklažānos (7,3-35 mg/100g), bietēs (25 mg/100g) (Kumar and Pruthi, 2014).

1.2.1. Ferulskābes biosintēze

FS veidojas šikimskābes ceļā. Vispirms no D-eritrozēs 4-fosfāta vairāku reakciju rezultātā veidojas šikimskābe, kas pēc tam tiek pārvērsta aminoskābēs – L-tirozīnā, L-fenilalanīnā un L-triptofānā. FS biosintēzē iesaistīts L-tirozīns un L-fenilalanīns.



1.4.att. Ferulskābes biosintēzes shēma

Vispirms ar enzīma fenilalanīna amonija liāzes (PAL) palīdzību no fenilalanīna tiek atdalīta aminogrupa, veidojot kanēļskābi (1.4.att.). 4-Kumarīnskābe veidojas vai no kanēļskābes hidroksilēšanās reakcijas veidā, vai deaminējot tirozīnu ar tirozīna amonija liāzi. Pēc tam hidroksilēšanās reakcijas veidā rodas kafijskābe, kas metilēšanas reakcijas ceļā ar S-adenozilmetionīna (SAM) palīdzību tiek pārvērsta ferulskābē (Dewick, 2009).

Augā metilēšanas un oksidēšanas reakciju rezultātā FS un arī citi aromātiskie savienojumi (kafijskābe, p-kumarīnskābe, sinapīnskābe) veido kanēļskābes atvasinājumus, piemēram, dihydroferulskābi, kuratiek izmantota lignīna (auga šūnu aizsargājoša polimēra) un lignocelulozes veidošanā (Kumar and Pruthi, 2014; Dewick, 2009).

1.2.2. Ferulskābes farmakokinētika

Saistītā veidā esošā FS nevar tikt absorbēta uzreiz-uz to jāiedarbojas enzīmam, kas atbrīvo FS, un tā var tikt absorbēta zarnās (Ou and Kwok, 2004). Zarnās uz saistīto FS iedarbojas dažādi enzīmi-cinnamoilesterāze, ksilanāze, FS esterāze, pēc tam galvenokārt pasīvās difūzijas veidā (90%) un nedaudz aktīvā transporta ceļā tiek absorbēta. Jo sarežģītāks savienojums, jo mazāka ir maksimālā koncentrācija plazmā un lielāks maksimālās koncentrācijas sasniegšanas laiks un pusizvades laiks (Mancuso and Santangelo, 2014). Tomēr absorbētās FS koncentrācija ir maza, kas varētu būt viens no iemesliem mazākam farmakoloģiskam efektam, ja salīdzina *in vivo* ar *in vitro*. Šis process lielākoties notiek resnajā zarnā (>95%), retāk kuņģī, tievajā zarnā (Ou and Kwok, 2004).

FS metabolisms galvenokārt notiek konjugācijas reakciju rezultātā ar glikuronskābi un/vai sulfātu, veidojot FS-glikuronīdu, FS-sulfātu, FS-diglikuronīdu, FS-sulfoglikuronīdu; citi metabolīti, kas veidojas, ir m-hidroksifenilpropionskābe, feruloilglicīns, dihidro-FS, vanilīnskābe, vaniloilglicīns. Šīs reakcijas pārsvarā notiek aknās, darbojoties sulfotransferāzēm, uridīna difosfāta glikuronoziltransferāzēm (1A1 un 2B7 izoformas). Mazākā daudzumā FS metabolizējas zarnu gļotādā, nierēs. Ja FS ir nesaistītā veidā, tad ir iespējama β -oksidēšanās aknās, kā arī FS izdalīšanās ar izelpoto CO₂ (Mancuso and Santangelo, 2014; Kumar and Pruthi, 2014; Zhao and Moghadasian, 2008). Žurkām FS izdalīšanās notiek ātri, sasniedzot plato fāzi 1,5 stundu laikā pēc ievadīšanas, bet cilvēkiem – 7-9 stundu laikā (Mancuso and Santangelo, 2014). FS izdalās ar urīnu, žulti (Ou and Kwok, 2004). FS izvadīšana no organisma ar urīnu ir 15 reizes lēnāka, ja FS uzņemta graudaugu veidā, piemēram, kliju, nekā tīras molekulas veidā (Mancuso and Santangelo, 2014).

FS biopieejamība ir 0,4-98%. Tā ir atkarīga no uzņemšanas avota. Mazāka FS biopieejamība ir graudaugos-cilvēkiem 3%; 2,5-5% žurkām vai pat 0,4-0,5% žurkām, ja lietota tiek kukurūza. Lielāka biopieejamība ir tomātos (11-25%), rudzu maizē (28%), alū (19-98%). Pētījumā tika salīdzināta FS biopieejamība kviešu miltos, klijās, aleuronā un maizē ar aleuronu gastrointestinālā modelī. Biopieejamība bijazema-no 0,55 % līdz 0,57%, bet miltos FS biopieejamība bija pārāk zema, lai noteiktu. Lielākā biopieejamība tika sasniegta laikā posmā no 1 līdz 2 stundām. Šajos paraugos FS lielākoties bija saistītā veidā, kas arī izskaidro zemo biopieejamību, jo alū FS ir galvenokārt brīvā veidā un biopieejamība ievērojami augstāka (Anson *et al.*, 2009).

1.2.3. Ferulskābes izmantošana, iedarbība

FS piemīt antioksidanta īpašības kā atbilde pret brīvajiem radikāļiem, atdodot ūdeņraža atomu no hidroksilgrupas (Kumar and Pruthi, 2014). FS spēj saistīt ūdeņraža peroksīda, superoksīda, hidroksilradikāļus un slāpekļa dioksīda brīvos radikāļus. FS piemīt spēcīga tirozināzes inhibējošā aktivitāte, superoksīda dismutāzes līdzīga darbība. γ -orizanols ir FS un sterolu, triterpēnu esteri (Ou and Kwok, 2004).

Antioksidantu iedarbība tiek novērota arī aizkuņģa dziedzerī, kur FS neitralizē brīvos radikāļus, kas radušies streptozotocīna darbības rezultātā. FS arī palīdz kontrolēt cukura līmeni asinīs dzīvniekiem, kuriem ir streptozotocīna izraisīts diabēts. Oksidatīvā stresa samazināšana palīdz beta šūnām izplatīties un radīt insulīnu (Kumar and Pruthi, 2014). FS piemīt insulīna izdalīšanos veicinošs, glikozes atpakaļuzņemšanas nomācošs efekts. Pie koncentrācijas 100 μ g/ml FS ir spēja samazināt glikoneoģenēzi (Azay-Milhau *et al.*, 2013).

FS izmanto kā konservantu tās antioksidantu un pretmikrobu iedarbības dēļ. Japānā jau 1975. gadā to izmantoja linsēklu eļļas, cūku tauku, sojas pupiņu eļļas oksidēšanās novēršanai (Ou and Kwok, 2004). FS arī novērš ēdiena krāsas maiņu, piemēram, zaļo zirnīšu, zaļās tējas, banānu krāsas maiņu. FS un γ -orizanols aizkavē luteīna, astaksantīna fotooksidēšanos, kas iegūti no auga *Pagrus major*.

FS tiek izmantota dabīgā vanilīna biosintēzē. To izmanto gan ēdienu, dzērienu, gan zāļu, smaržu gatavošanā. FS tiek pārvērsta reducētā feruloilkoenzīmā A, kas savukārt tiek pārvērsts vanilīnā.

FS ir spēcīga viela, kas absorbē ultravioleto starojumu. Uzskata, ka FS kavē melanīna veidošanos kā konkurējošais inhibitors ar tirozīnu. FS atsevišķi vai kopā ar vitamīnu C un E aizsargā pret ultravioletā starojuma izraisītu bojājumiem. *In vivo* pētījumā efektīvi pret šādiem bojājumiem aizsargāja šķīdums, kas saturēja FS (0,5%), vitamīnu E (1%) un vitamīnu C (15%) (Kumar and Pruthi, 2014).

FS piemīt holesterīnu samazinošas īpašības. Tā spēj samazināt zema blīvuma lipoproteīnu un zema blīvuma lipoproteīnu koncentrāciju plazmā, palielināt augsta blīvuma lipoproteīnu koncentrāciju. Uzskata, ka FS inhibē holesterīna sintēzi, konkurējoši inhibējot hidroksimetilglutarilkoenzīma A reduktāzi aknās.

Ķīnā FS saturošus augus lieto trombozes ārstēšanā. FS inhibē tromboksāna A2 sintēzes aktivitāti, trombocītu agregāciju. Uzskata, ka FS varētu kavēt eikozānskābes (tromboksāna A2 prekursors) izdalīšanu, inhibējot fosfolipāzi A2. (Ou and Kwok, 2004).

FS spēj samazināt asinsspiedienu. FS devā 50mg/kg sasniedza tādu pašu efektu kā angiotenzīna konvertējošā enzīma inhibitors kaptoprils (10mg/kg). Vazodilatējošais efekts notiek, inhibējot angiotenzīna konvertējošo enzīmu, palielinot slāpekļa oksīda sintēzi un samazinot superoksīda anjona veidošanos (Mancuso and Santangelo, 2014).

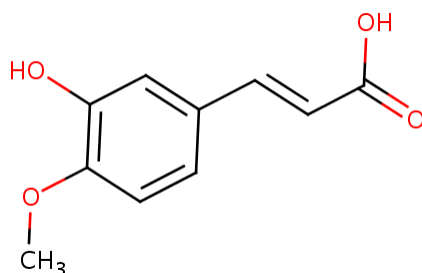
FS un izo-FS piemīt pretvīrusu efekts. Šie savienojumi spēj samazināt interleikīna-8 daudzumu, makrofāgu iekaisuma proteīna-2 izdalīšanos. FS iedarbojas arī uz baktērijām-gan Grampozitīvām, gan Gramnegatīvām baktērijām. Spēcīgu inhibējošo efektu var novērot uz kuņģa-zarnu trakta mikrofloru-*Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Enterobacter aerogenes* u.c. Antibakteriālais efekts balstās uz arilamīna N-acetiltransferāzes inhibēšanu baktērijās (Ou and Kwok, 2004).

FS piemīt pretvēža efekts. FS spēj regulēt šūnas augšanu, proliferāciju, saistīt brīvos radikāļus, stimulēt šūnu aizsargājošo enzīmu (superoksīda dismutāze, katalāze) darbību. FS arī dzemdes kakla vēža šūnu līnijā HeLa un eritroleikēmiskajā šūnu līnijā K562.

Lai gan pētījumos ar FS ir uzrādīti ievērojami efekti, tomēr pašlaik šo vielu nav iespējams lietot klīniski. Tas galvenokārt ir zemās biopieejamības dēļ, kā arī tādēļ, ka pētījumos bieži tiek izmantoti augu ekstrakti, kurus lietojot nevar precīzi noteikt lietojamo devu. Biopieejamību varētu uzlabot, iestrādājot FS nanodaļiņās (stearilferulāta nanodaļiņas), niosomās vai izstrādāt priekšzāles. (Mancuso and Santangelo, 2014).

1.3. Izoferulskābe

Izoferulskābe (Izo-FS) ir FS izomērs (1.5.att.). Abi savienojumi atšķiras ar to, ka šim savienojumam pievienota hidroksilgrupa pie trešā oglekļa atoma, bet FS pie ceturtā oglekļa atoma. Tās molmasa ir 194,184 g/mol (Rothwell *et al.*, 2015). Visbiežāk literatūrā šis savienojums tiek minēts kā augs *Cimicifuga racemosa* viena no aktīvajām vielām. Šajā augā atrodama arī FS (Barnes *et al.*, 2007).



1.5.att. Izoferulskābes ķīmiskā struktūra

Izo-FS tāpat kā FS piemīt antioksidantu īpašības. Salīdzinot auga *Cimicifugae* saknē esošos FS un izo-FS efektus, var secināt, ka izo-FS piemīt nedaudz lielākas hidroksilradikāļa un superoksīda anjona radikāļa saistīšanas spējas, tomēr kopumā iedarbība ir līdzīga (Xican *et al.*, 2012).

Proteīnu glikolizēšanas procesā rodas progresējošas glikozilēšanās gala produkti (PGP; *advanced glycation end products*), kas spēj modificēt citus proteīnus un veidot oksidējošus starpproduktus, tādā veidā ierosinot oksidatīvo stresu. Šo PGP veidošanās un uzkrāšanās tiek saistīta ar diabēta komplikāciju (retinopātija, nefropātija, neiropātija), deģeneratīvu slimību (Alcheimera slimība) patoģenēzi. Izo-FS spēj samazināt PGP veidošanos. Pētījumā pēc četrām nedēļām izo-FS koncentrācijā 5mM spēja samazināt PGP par 71,4% (teļa seruma albumīna/fruktozes sistēmā) vai 73% (teļa seruma albumīna/glikozes sistēmā). Ja pievienoja aminoguanidīnu, kas ir glikolizēšanas bloķētājs, PGP samazinājums bija 87,3% un 73,1%. Samazināta tika arī N-(karboksimetil)lizīna veidošanās, kas ir viens no glikolizēšanās marķieriem. Izmantojot tioflavīna T testu, tika noskaidrots, ka izo-FA spēj samazināt arī β -amiloīda daudzumu (Meeprom *et al.*, 2013).

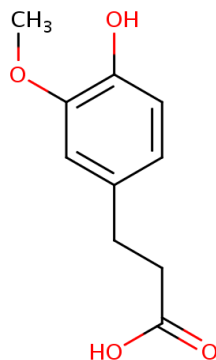
Tāpat kā FS, arī tās izomēram piemīt antihiperglikēmisks efekts. Izo-FS veicina glikogēna sintēzi, samazina glikozes līmeni plazmā, glikoneoģenēzi aknās diabētiskām žurkām (Liu *et al.*, 2000). Citā pētījumā antihiperglikēmiskais efekts tika saistīts ar izo-FS spēju stimulēt α -1 adrenoreceptorus virsnieru serdē, kas ierosinātu endogēnā β -endorfīna sekrēciju no virsnieru dziedera diabētiskām žurkām. β -endorfīns caur opioīdu μ -receptoru aktivāciju panāktu GLUT 4 (kodē insulīna regulēta glikozes transportētāja veidošanos) gēnu ekspresiju un/vai mainītu PEPCK (enzīms, kas iesaistīts glikoneoģenēzē) gēna ekspresiju (Liu *et al.*, 2003).

Izo-FS pretvīrusu iedarbība tika pētīta pelēm, kas inficētas ar H1N1 subtīpa gripas vīrusu. Lietojot izo-FS, samazinājās makrofāgu iekaisuma proteīna-2 veidošanās, līdz ar to arī samazinājās neitrofilu uzkrāšanās, kas var radīt brīvo radikāļu veidošanos; pelēm samazinājās mirstības rādītāji (Sakai *et al.*, 2001).

Transizo-FS spēj inhibēt lipopolisaharīda inducētu slāpekļa oksīda un prostaglandīna E2 veidošanos, supresējot inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes un ciklooksigenāzes gēnus BV2 mikroglijas šūnās, kas savukārt tiek panākts supresējot lipopolisaharīda inducētu fosfoinozitīda 3 kināzes/proteīnkināzes B atkarīgu nukleārā faktora- κ B aktivēšanu. Uzskata, ka šajā procesā iesaistīts ir arī nukleārais faktors 2, caur kuru tiek regulēta hēma oksigenāzes aktivācija. Šis enzīms ir spēcīgs detoksificējošs enzīms, kas sašķeļ hēmu, novēršot asinīs oksidatīvo stresu. Panākot slāpekļa oksīda un prostaglandīna E2 nomākšanu, var novērst iekaisumu, audzēja šūnu augšanu (Dilshara *et al.*, 2014).

1.4. Dihidroferulskābe

Dihidroferulskābe (dihidro-FS) (1.6.att.) veidojas FS sānu ķēdes reducēšanas rezultātā. Tā ir viena no vanilīna veidošanās starpproduktiem (Batista, 2015). No FS tā atšķiras ar to, ka sānu ķēdē trūkst dubultsaites. Šī savienojuma molmasa ir 196,2 g/mol (Rothwell *et al.*, 2015).



1.6.att. Dihidroferulskābes ķīmiskā struktūra

Dihidro-FS piemīt prettrombu efekts. Uzska, ka tas varētu notikt dažādu kināžu (fosfoinozītīda 3 kināze, proteīnkināze C, mitogēnaktivētā proteīnkināze) ietekmē uz trombocītu aktivāciju (Rechner and Kroner, 2005).

Sintezētiem dihidro-FS alkilesteriem piemīt pretsēnīšu iedarbība. Augšanas inhibīcija tika pierādīta izmantojot *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*. Iedarbīgāki bija esteri ar īsāku sānu ķēdi-dihidro-FS metilesteris, dihidro-FS etilesteris, dihidro-FS propilesteris (Beck *et al.*, 2007).

1.5. Biotehnoloģija

1.5.1. Biotehnoloģijas izmantošana

Biotehnoloģija ir nozare, kas pēta dzīvu organismu, vielu izmantošanu bioloģiski nozīmīgu vielu iegūšanai, iegūšanas metožu, procesu izstrādei. Biotehnoloģiju izmanto medicīnā, agronomijā, pārtikas ražošanā u.c. (Gossett and Kähler, 2014).

Biotehnoloģijas bieži izmanto, savienojumu iegūšanai no augiem, kam ne vienmēr ir komerciāli panākumi. Tomēr ir savienojumi, kurus veiksmīgi iegūst bioreaktoros- berberīns no *Coptis japonica*, *Thalictrum minus*, paklitaksels no *Taxus brevifolia*, *Taxus chinensis* (Arora et al., 2010).

Augu audu kultūras (AAK) ir viens no augu biotehnoloģijas pamatrīkiem. Tās ir *in vitro* veiktas manipulācijas ar augu šūnām un audiem. AAK izmanto augu pavairošanā, augu hormonu pētījumos, transgēno augu iegūšanā (Cardoza, 2008).

In vitro AAK izmantošanas galvenais mīnuss ir lielas izmaksas, tomēr ir vairāk priekšrocību izmantošanai pētījumos:

- relatīvi īsā laika periodā tiek iegūts pietiekams daudzums augu;
- vajadzīgs neliels daudzums augu audu, lai radītu jaunus augus;
- parasti nepieciešams īsāks laiks nekā kultivēt dabā;
- kultivāciju var veikt visu gadu;
- mazs infekciju risks;
- iespējams pavairot augus, kas dabā ir reti sastopami vai aizsargājami.

Kosmētikas līdzekļu sastāvdaļu datu bāzē CosIng atrodamas 64 AAK, kas tiek izmantotas kosmētikas līdzekļu izgatavošanā. Piemēram, tiek izmantotas AAK no *Echinacea Angustifolia*-meristēmas šūnu kultūra un saknes šūnu kultūra. Šīs AAK tiek lietotas ādas stāvokļa uzlabošanai (EC, 2015).

Izšķir organizētu augšanu (veidos konkrētas struktūras) un neorganizētu augšanu (veidojas nediferencēti audi, galvenokārt *in vitro*). Viens no neorganizētu audu kultūru veidiem ir kallusa kultūras. Kalluss ir neregulāras parenhīmas audu masa. Kalluss bieži rodas tieši vai blakus ievainojuma vietām, kā arī stresa apstākļu, insektu, mikroorganismu ietekmē. Endogēno vai ķīmisku augšanas regulatoru ietekmē sākas šūnu dalīšanās, diferenciācija (Bhojwani and Dantu, 2013; George, 2008).

1.5.2. Elicitori

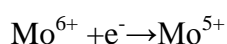
Elicitori ir vielas, kas spēj ierosināt reakcijas auga šūnās. Tā tiek aktivizēts sekundārais metabolisms, uzlabota sekundāro metabolītu uzkrāšanās. Elicitorus bieži izmanto, lai ārstnieciskos augos iegūtu pēc iespējas lielāku daudzumu vēlamo savienojumu (Gaosheng and Jingming, 2012). Metabolītu veidošanos veicina tādi elicitori kā jasmonāti, salicilskābe, hitozāns, smagie metāli, biotiskie elicitori (baktēriālie, sēnīšu). Elicitorus iedala biotiskos un abiotiskos elicitoros. Biotiskie elicitori ir sēņu polisaharīdi, proteīni, šūnu atliekas. Šādus, no sēnēm veidotus elicitorus, lieto, piemēram, alkaloīdu (iegūts no parastas celmenes), fenolu (*Verticillium dahliae*), terpenoīdu (*Botrytis* suga), flavanoīdu (raugs) lielākai daudzuma iegūšanai. Abiotiskie elicitori ir smago metālu joni, UV starojums, osmotiskais stress. Biotisko elicitoru priekšrocības ir zemās izmaksas, maz blakusefektu, spēcīgs efekts. Jasmonāti spēj veicināt alkalaloīdu, terpenoīdu, flavanoīdu, antrakvinonu biosintēzi (Gaosheng and Jingming, 2012; Häkkinen and Ritala, 2010).

Lietojot elicitorus, ir svarīgi noteikt to lietošanas ilgumu, koncentrāciju. Pārāk liela koncentrācija var samazināt biomasas daudzumu, metabolīta daudzumu (Häkkinen and Ritala, 2010).

1.6. Augu bioloģiskās aktivitātes noteikšanas metodes

1.6.1. Kopējo fenolu noteikšana

Kopējo fenolu noteikšana tiek veikta ar Folin-Ciocalteu reaģentu. Šī ir kolorimetriska metode, kurā kopējos fenolus nosaka pie to absorbcijas maksimuma-765 nm. Sākotnēji šī metode tika paredzēta tikai proteīnu kopējā daudzuma noteikšanai, tomēr vēlāk ar to noteica fenolu daudzumu vīnā, un metodi sāka pielietot arī citur. Ar reaģenta palīdzību tiek parādīta parauga spēja reducēt-fenolu klātbūtnē reaģents iekrāsojas zilā krāsā. Reaģents sastāv no fosforvolframskābes un molibdāta heteropolimēra. Zilā krāsa rodas $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^4$ klātbūtnē. Uzskata, ka molibdēnu vieglāk var reducēt, kad tas ir kompleksa sastāvā. Tad notiek reakcija:



Šī metode nav specifiska tikai fenoliem, iespējams, ka reaģentu reducē citi savienojumi, piemēram, vitamīns C, Cu^{+} . Tomēr kopējo fenolu noteikšanā Folin-Ciocalteu reaģentu izmanto bieži, jo metode ir viegli un ērti pielietojama, atkārtojama (Huang *et al.*, 2005; Sánchez-Rangel *et al.*, 2013).

1.6.2. Antioksidantu aktivitātes noteikšana

Antioksidantu aktivitātes noteikšanas metodes var iedalīt ar lipīdu peroksidāciju saistītās un radikāļu, elektronu saistošo antioksidantu metodēs.

- Kā ar lipīdu peroksidāciju saistītās metodes var minēt malonaldehīda un tiobarbitūrskābes savienojuma metodi, beta-karotēna balināšanas metodi. Tās bieži izmanto eļļās esošo antioksidantu efekta noteikšanai.
- Radikāļu, elektronu saistošo antioksidantu metodes
 - Viena no populārākajām antioksidantu izpētes metodēm ir 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DFPH) tests. Šī metode ir vienkārša, augsti jutīga. Tās pamatā ir $\text{DFPH}\cdot$ pievieno ūdeņradi no antioksidanta, šīs reakcijas gaitā DFPH atkrāsojas no violeta uz iedzeltenu. Antioksidanta efekts ir proporcionāls reducētajam $\text{DFPH}\cdot$ daudzumam. Anti-radikālās aktivitātes noteikšanai pēc tam $\text{DFPH}\cdot$ daudzumu nosaka ar spektrofotometru.
 - Vēl antioksidantu daudzumu var noteikt ar 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolīna-6 sulfonskābes) testu (ABTS). ABTS metodi bieži izmanto ēdienu, dzērienu sastāvā esošo antioksidantu noteikšanai. Krāsas maiņa notiek no zilās uz bezkrāsainu, absorbcijas maksimums ir 734 nm.

- Kombinācijā ar citām metodēm izmanto arī dažādas metodes, kuru pamatā ir dzelzs jonu reducēšanās-ar Fe³⁺-tripiridiltriazīna kompleksu, ar ksilenola oranžā reaģentu, dzelzs tiocianātu (Moon and Shibamoto, 2009).

1.6.3. Mikroplašu izmantošana

Folin-Ciocalteu metodē, lai noteiktu kopējo fenolu daudzumu, antiradikālo aktivitāti, tiek mērīta absorbcija. Mērot ar tradicionālām metodēm (kivetēs ar spektrofotometru), šis process ir laikietilpīgs, jo vienlaikus iespējams apstrādāt tikai vienu paraugu, tiek izmantots lielāks reaģentu daudzums, kā arī nepieciešams lielāks analizējamā parauga daudzums. Lai novērstu šos trūkumus, tiek izstrādātas uz mikroplatēm balstītas metodes, kurās reakcija tiek veikta 96 lauciņu mikroplatēs un rezultāts nolasīts ar mikroplašu lasītāju. Tas jau tiek darīts jūraszāļu, sorgo, ogu paraugu pētījumos (Zhang *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2005; Herald *et al.*, 2012.).

Noteiktā antiradikālā aktivitāte, kopējais fenolu daudzums statistiski neatšķiras ($p > 0,05$) starp tradicionālajām un mikroplašu metodēm; atgūstamība ir 88-100%. Mikroplašu izmantošana ievērojami neietekmē rezultātus, ietaupa laiku un resursus. Tā tiek taupīti ne tikai reaģenti, bet arī augu paraugi, kas ir būtiski, analizējot *in vitro* augus, kas pieejami ierobežotā daudzumā. Izmantojot mikroplates, ir ērtāk arī pētīt lielu skaitu paraugu vienlaikus (Bobo-García *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2006).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Analizētie paraugi

Darbā tika analizēts in vitro audzēts augs čemuru augstiņš, kas iegūts no Latvijas Universitātes Botāniskā dārza. Paraugs žāvēts žāvskapī 25^oC septiņas dienas.

2.2. Ķīmiskais izvērtējums, izmantojot ŠH-AIMS

2.2.1. Parauga sagatavošana

Paraugus lika piestā un berza līdz viendabīgai masai. 15 mg parauga kvantitatīvi pārnesa un ekstrahēja ar 1,5 mL etanola. Paraugs tika maisīts vienu minūti 2200 apgriezieni/minūtē, pēc tam centrifugēts 10 minūtes 12000 apgriezieni/minūtē 20^oC un filtrēts caur 0,45 μm filtru. Iegūts dzidrs, zaļš šķīdums.

2.2.2. Reāģenti un palīgvielas

1. Dejonizēts ūdens, H₂O (Millipore MilliQ-plus; 18.2 MΩ);
2. Acetonitrils, C₂H₃N (LiChrosolv – Merck, 99,9%);
3. Etanols, C₂H₅OH (96 %);
3. Ferulskābe, C₁₀H₁₀O₄, trans-ferulic acid, 99%, (Aldrich).

2.2.3. Aparatūra

1. UPLC iekārta Agilent 1290 ar kolonnas un parauga termostatu, nepārtrauktu kustīgās fāze degazēšanas iekārtu, automātisko paraugu injicēšanas iekārtu;
2. Augstas izšķirtspējas masas spektrometrs Agilent 6230 TOF LC/MS;
3. Apgrieztās fāzes kolonna XTerra MS C18, 2,1 x 150 mm, 3 μm (Waters);
4. Parauga injekcijas tilpums – 0,5 μL;
5. Kustīgā fāze A – 0,1% skudrskābes ūdens šķīdums, B – 0,1 % skudrskābes acetonitrila šķīdums sekojošā gradienta režīmā:

Kustīgās fāzes gradienta režīms

Laiks, min	Kustīgā fāze A, %	Kustīgā fāze B, %
2	98	2
15	5	95
30	5	95
33	98	2

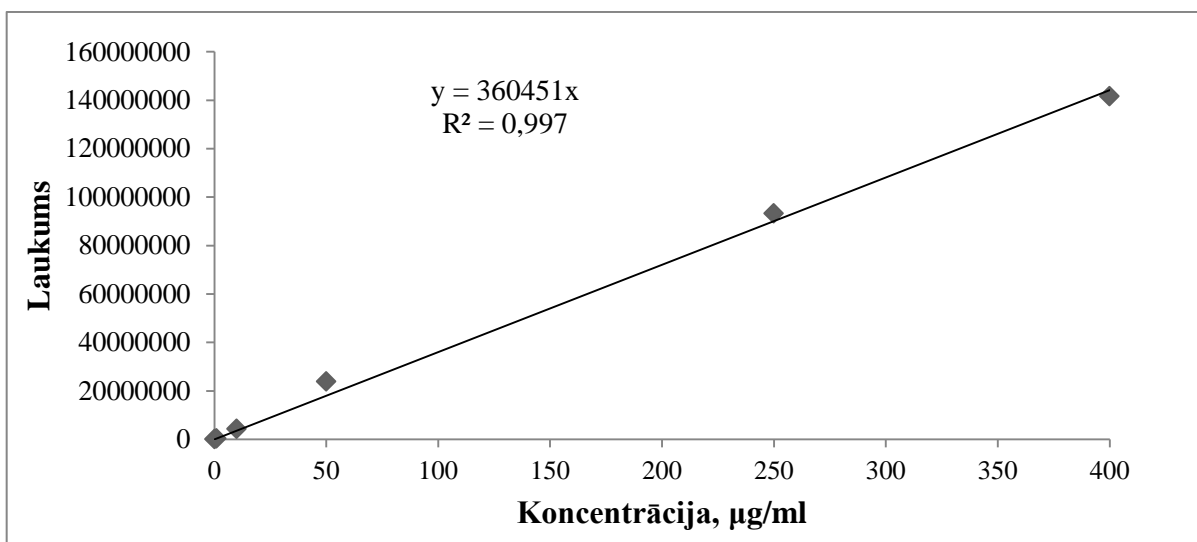
6. Kustīgās fāzes plūsmas ātrums – 0,30 mL/min;
7. MassHunterQualitativeAnalyses B.05.00 datu apstrādes sistēma;
8. Žāvētājs BINDER (Vācija);
9. Centrifūga, Mikro 200R, HettichZentrifugen, sērijas Nr. D – 78532;
10. Vortex maisītājs, YellowLine TTS 2, sērijas Nr. 03.169241;
11. Filtri paraugi filtrēšanai (0,45 μm, MS NylonSyringeFilters);
12. Automātiskā mikropipete (100 – 1000 μL, SmartAcumax, HI 209035);
13. Pipešu uzgaļi, Sarstedt, Vācija;
14. Analītiskie svāri Precisa XB 120 A, Max 120 g, e – 0,001 g, Min 0,01 g, d – 0,0001 g. SERIES 320 XB D99 – D9 – 030.

2.2.4. Masspektrometrijas apstākļi

1. Elektronu izsmidzināšana pozitīvajā režīmā (ESI+);
2. Detektēšanas diapazons $-m/z$ 65 – 1000 ;
3. Žāvējošās gāzes plūsma –10 L/min;
4. Žāvējošās gāzes temperatūra – 325 °C;
5. Fragmentēšanas spriegums – 130 V.

2.2.5. Savienojumu kvantitatīvā noteikšana analizējamā paraugā

Lai noteiktu atrasto savienojumu kvantitatīvo sastāvu, tika veidots ferulskābes kalibrēšanas grafiks no 6 dažādām koncentrācijām – 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 250 µg/ml, 400 µg/ml (2.1.att.). Katra individuālā savienojuma koncentrāciju etanola ekstraktos noteica pēc iegūtā kalibrēšanas grafika datiem, iekļaujot pārrēķinu uz vienu gramu sausas masas.



2.1.att. Ferulskābes kalibrēšanas grafiks savienojumu kvantitatīvai analīzei

2.3. Kopējā fenolu daudzuma noteikšana

2.3.1. Reāģenti, palīgvielas, iekārtas

1. Galluskābe, $C_6H_2(OH)_3COOH$, Sigma-Aldrich, Amerikas Savienotās valstis;
2. Folin-Ciocalteu reaģents, Scharlau, Vācija;
3. Nātrija karbonāts, Na_2CO_3 , Hempur;
4. 96 lauciņu plates, Sarstedt, Vācija;
5. Čemuru augstiņu lakstu tēja, Z/S Skradeļi (sēr.nr.05, der.term.06.2016), Latvija;
6. Automātiskās mikropipetes (10 – 1000 µL; 100 – 1000 µL, SmartAcumax, Indija);
7. Etanols, C_2H_5OH (50%);
8. Dejonizēts ūdens, H_2O (MilliporeMilliQ-plus; 18.2 MΩ);
9. Mikroplašu spektrofotometrs ASYS Expert Plus, Biochrom LTD, Lielbritānija.

2.3.2. Darba gaita

Kopējais fenolu daudzums tika noteikts četros paraugos – *in vitro* augu kultūras, *in vitro* augu šūnu kultūras, kallusa kultūras un aptiekā iegādātas čemura augstiņa lakstu (drogas)

ekstraktos. *In vitro* augu šūnu kultūras, kallusa kultūras paraugi tika iegūti no Bioanalītisko un biodozimetrijas metožu laboratorijas.

Lai sagatavotu paraugus, tie tika nosvērti (*in vitro* augu šūnu kultūras, kallusa kultūras- 60 mg, *in vitro* augu kultūras, droga- 15 mg), ekstrahēti ar 1,5 mL 50% etanola, maisīti vienu minūti 2200 apgriezieni/minūtē, centrifugēti 10 minūtes 12000 apgriezieni/minūtē 20°C un filtrēti caur 0,45 μm filtru. No ekstraktiem ar 50% etanolu tiek pagatavoti 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% šķīdumi.

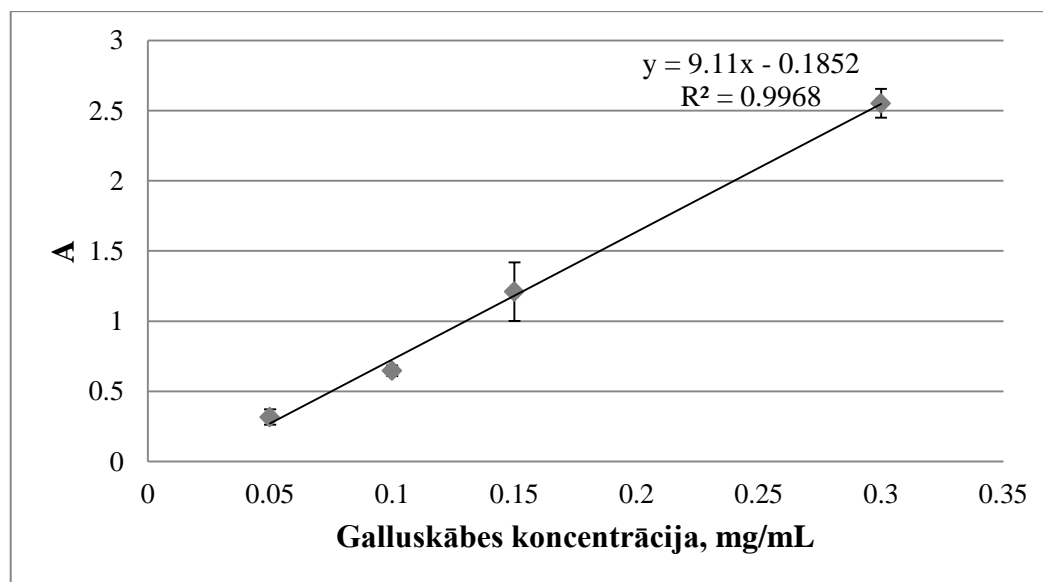
Tika sagatavoti galluskābes standartšķīdumi koncentrācijās 0,0125 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml.

96 lauciņu platē pievieno 25 μL parauga, galluskābes standartšķīduma un kontrolšķīduma (50% etanols). Pēc tam pievieno 75 μL H₂O un 25 μL Folin-Ciocalteu reaģenta (attiecībā 1:1), samaisa un sešas minūtes inkubē tumšā vietā.

Pievieno 100 μL 7% Na₂CO₃, samaisa un 90 minūtes inkubē tumšā vietā.

Plati krata 60 sekundes un nolasa absorbciju 620 nm.

No iegūtajiem absorbcijas mērījumiem tika iegūts galluskābes kalibrēšanas grafiks (2.2.att.), atliekot uz y ass izmērītās absorbcijas vērtības un uz x ass - galluskābes koncentrāciju. Kopējo fenolu daudzumu noteica pēc iegūtā kalibrēšanas grafika datiem, iekļaujot pārrēķinu uz vienu gramu sausas masas galluskābes ekvivalentos.



2.2.att. Galluskābes kalibrēšanas grafiks

2.4. Antiradikālās aktivitātes noteikšana

2.4.1. Reāģenti, palīgvielas, iekārtas

1. L-askorbīnskābe 99%, C₆H₈O₆, Sigma-Aldrich, Amerikas Savienotās valstis;
2. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazils (DFPH), Sigma-Aldrich, Amerikas Savienotās valstis;

3. Čemuru augstiņu lakstu tēja, Z/S Skradeļi (sēr.nr.05, der.term.06.2016), Latvija;
4. Etanols, C₂H₅OH (50%, 96%) ;
5. Dejonizēts ūdens, H₂O (MilliporeMilliQ-plus;18.2 MΩ);
6. Mikroplašu spektrofotometrs ASYS Expert Plus, Biochrom LTD, Lielbritānija.

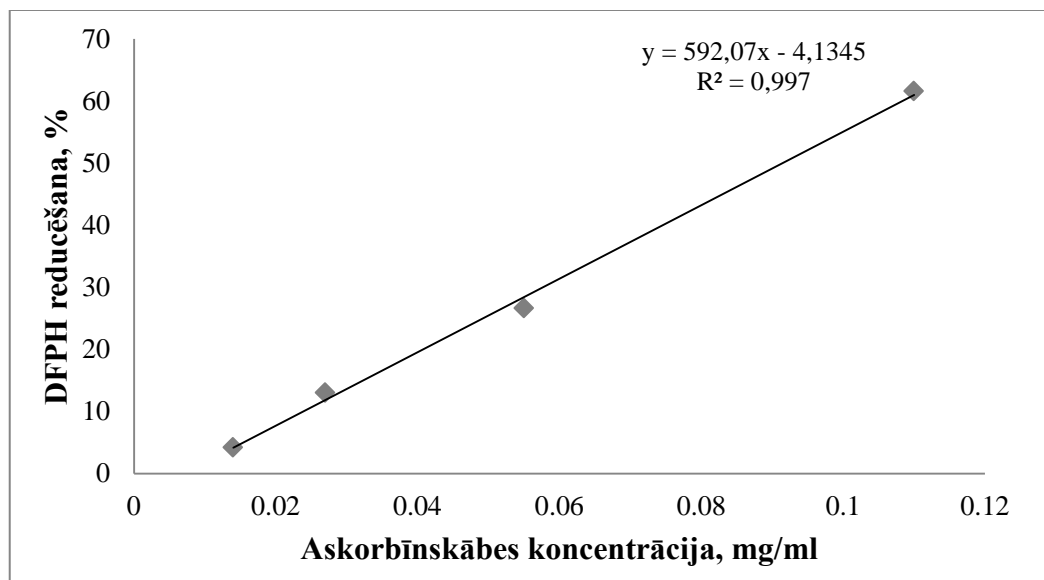
2.4.2. Darba gaita

Arī antiradikālā aktivitāte tika noteikta četros paraugos – *in vitro* augu kultūras, *in vitro* augu šūnu kultūras, kallusa kultūras un drogas ekstraktos. Paraugi tika sagatavoti tāpat kā kopējo fenolu daudzuma noteikšanas metodē.

Pagatavo DFPH standartšķīdumus koncentrācijās 6,25 μM, 12,5 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM, 100 μM un askorbīnskābes standartšķīdumus koncentrācijās 0,078 mM, 0,156 mM, 0,313 mM, 0,625 mM, 1,25 mM.

96 lauciņu platē pievieno 20 μL parauga, DFPH un askorbīnskābes standartšķīdumus. Kā kontrole tiek izmantoti DFPH/50% etanola šķīdums(DFPH CTR, 180 μL/20 μL) un 50%/96% etanola šķīdums(20 μL/180 μL). Pievieno 180 μL 150 μM DFPH, samaisa un inkubē 90 minūtes tumšā vietā. Pēc tam nolasa absorbciju pie 620 nm.

No absorbcijas mērījumiem aprēķina DFPH reducēšanu %. No iegūtajiem aprēķiniem izveido askorbīnskābes kalibrēšanas grafiku (izmantojot trīs paralēlos atkārtojumus katram askorbīnskābes atšķaidījumam), atliekot uz y ass aprēķinātās DFPH reducēšanas vērtības un uz x ass - askorbīnskābes koncentrāciju (2.3.att.).



2.3.att. Askorbīnskābes kalibrēšanas grafiks

2.5. Statistiskā analīze

Iegūto datu statistiskā analīze tika veikta programmās Microsoft Excel un GraphPad Prism. Statistiskās ticamības analīzei izmantots vienfaktora dispersijas analīzes tests (ANOVA) ar Kruskala-Vallisa (*Kruskal-Wallis*) analīzi un Dunna salīdzināšanas testu (*Dunn's multiple comparison*). Rezultāti izteikti ar standartkļūdu, statistiskā ticamība $p < 0,05$.

3. REZULTĀTI

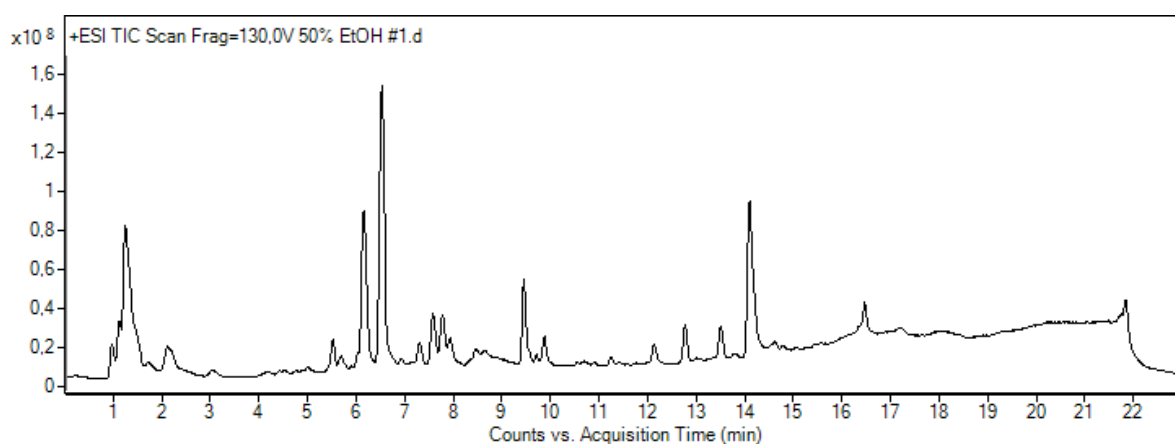
3.1. Ķīmiskais izvērtējums, izmantojot ŠH-AIMS

Viena no pēdējo gadu izmantotākajām metodēm ir šķidrums hromatogrāfija saistīta ar lidojuma laika masspektrometriju (liquid chromatography/time of flight massspectrometry, LC/TOF-MS). Joni tiek atdalīti reģionā, kurā nav magnētiskā un elektriskā lauka, un atkarībā no laika, kas nepieciešams, lai tie sasniegtu detektoru, lidojuma laika masspektrometros tiek radīti masas spektri. Lidojuma laika masspektrometrija ir jutīga bioloģisku matricu kompleksu, augu ekstraktu savienojumu identifikācijas metode. Savienojumu noteikšanas jutību nosaka trīs sekojošas iezīmes:

1. spēja sakopot datus lielā masu apgabalā, nezaudējot jutību;
2. spēja izkļaudēt traucējošos signālus no konkrētiem interesējošiem signāliem ar lielu izšķiršanu;
3. spēja identificēt savienojumu precīzās masas daltonos (četras zīmes aiz komata).

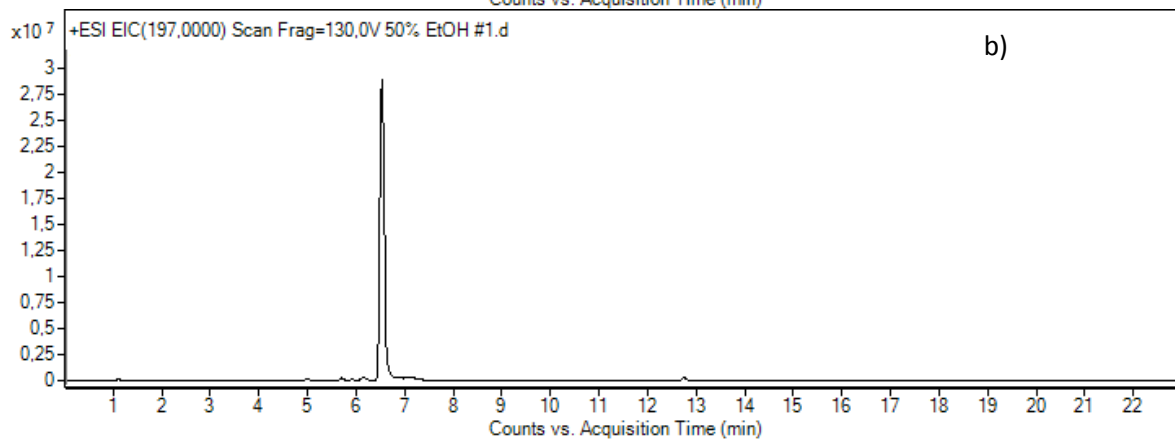
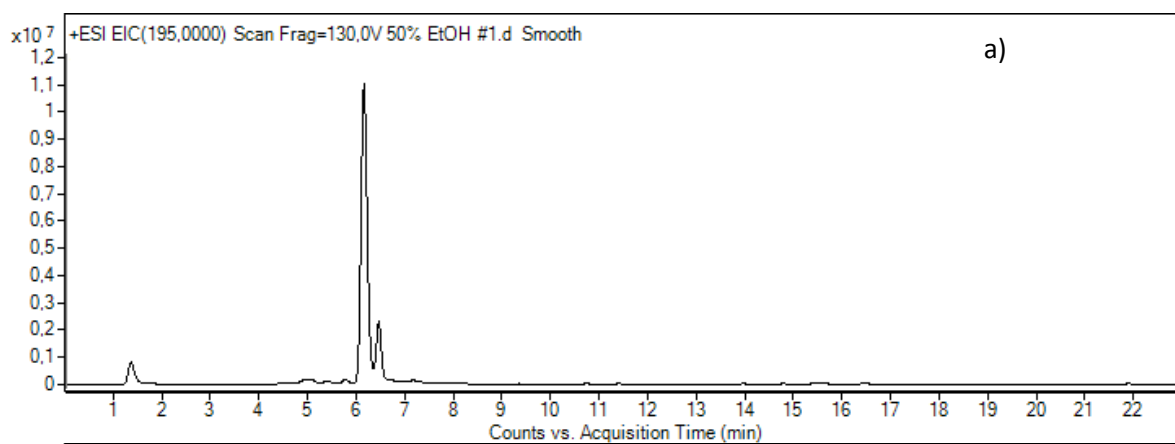
Otrs šīs metodes nosaukums ir augstas izšķirtspējas masspektrometrija (AIMS). Precīzi nosakot masas, analīzes gaitā, novērojot signālus, var noteikt dažādus elementu savienojumus (Ferrer and Thurman, 2003). Augstās jutības un precizitātes dēļ šī metode tika izvēlēta maģistra darba uzdevumu veikšanai – ferulskābes noteikšanai čemuru augstīnā.

Veicot analīzi pie 2.2.3. un 2.2.4. punktā norādītajiem apstākļiem, tika iegūta kopējās jonu strāvas (TIC-Total Ion Current) hromatogramma, kas atainota 3.1.attēlā.



3.1.att. Čemuru augstīnā 50% etanola ekstrakta iegūtā hromatogramma

Lai atrastu individuālo savienojumu, tika veikta interesējošo savienojumu izdalīšana pie savienojuma individuālās m/z vērtības.



3.2.att. Āemuru augstīņa 50% etanola ekstrakta hromatogrammas: a) izoferulskābe, b) dihidroferulskābe

3.2.attēls ataino pie m/z 195 izdalītā (EIC-extracted ion current) savienojuma izoferulskābes hromatogrammu un pie m/z 197 izdalītās dihidroferulskābes hromatogrammu. Atrastie savienojumi apkopoti 3.1.tabulā.

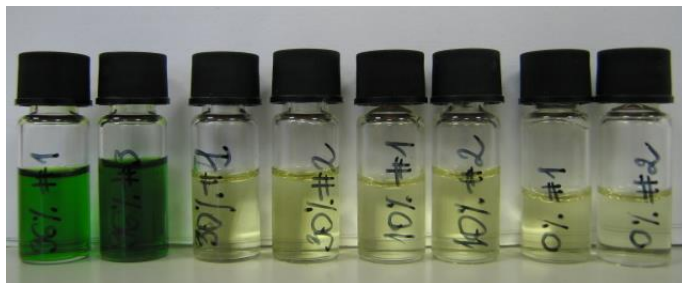
3.1.tabula

Analizētajos paraugos atrastie savienojumi

Savienojums	Molekulārformula	(M+H) ⁺
Izoferulskābe	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195,0652
Dihidroferulskābe	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	197,0808

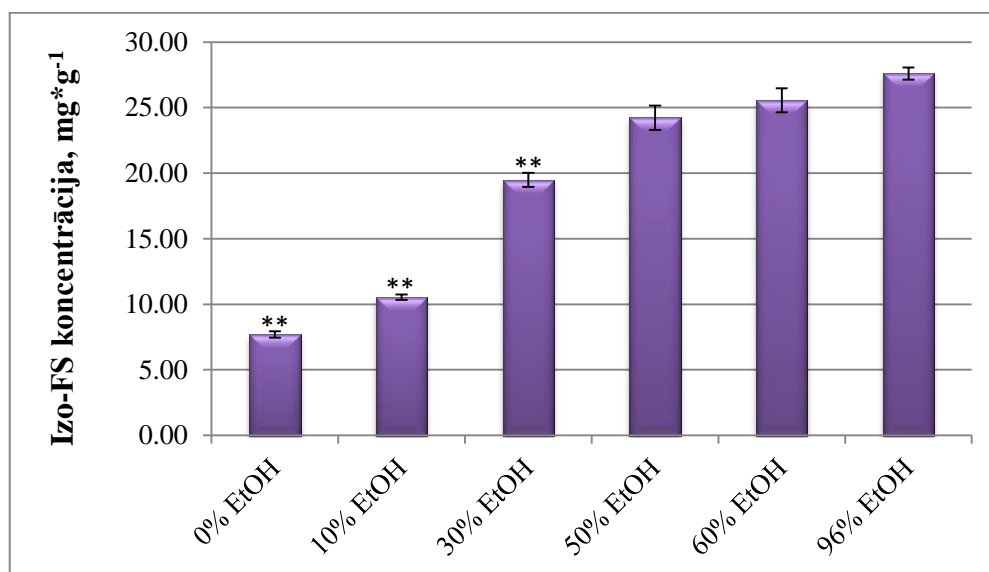
3.2. Šķīdinātāja ietekme uz izdalīto savienojumu koncentrāciju

Lai noteiktu kādā šķīdinātājā visvairāk varētu izdalīt izoferulskābi un dihidroferulskābi, tika veidoti in vitro augu paraugu ekstrakti ar dažādu koncentrāciju etanolu – 0% (ūdens), 10%, 30%, 50%, 60%, 96%. Tika iegūti ekstrakti zaļganos toņos (3.3.att.).

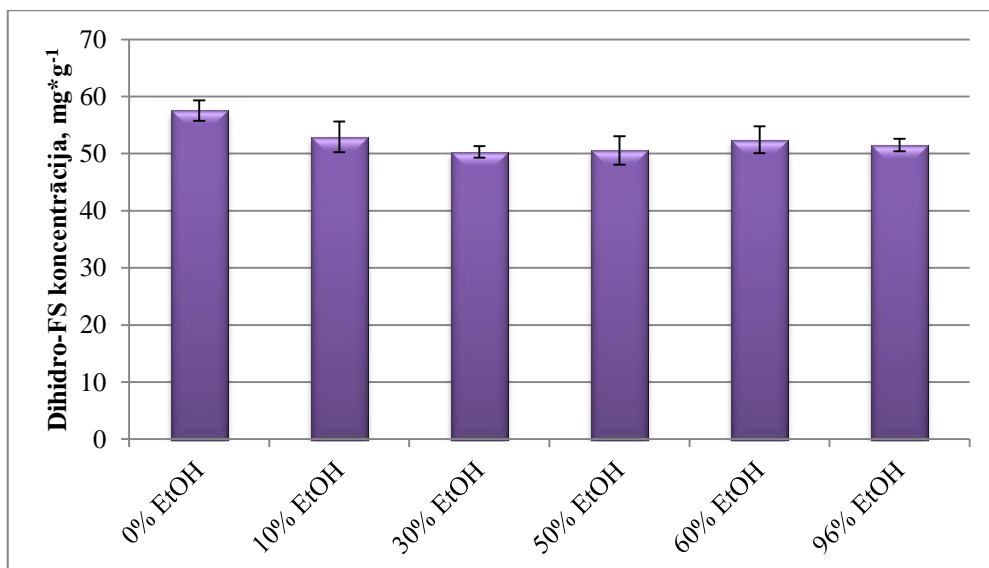


3.3.att. Ekstrakti ar 96%, 30%, 10%, 0% etanolu

Iegūtajos ekstraktos noteiktās izoferulskābes un dihidroferulskābes koncentrācijas dati apkopoti 3.4. un 3.5.attēlā. Vislielākā koncentrācija atrodama 96% etanola ekstraktos, tomēr statistiski ticamas atšķirības koncentrācijā starp 50%, 60% un 96% etanola ekstraktiem nav. Dihidro-FS koncentrāciju savukārt etanola koncentrācija īpaši neietekmē. Lielākā koncentrācija atrodama 0% etanola ekstraktos, mazākā- 30% etanola ekstraktos.



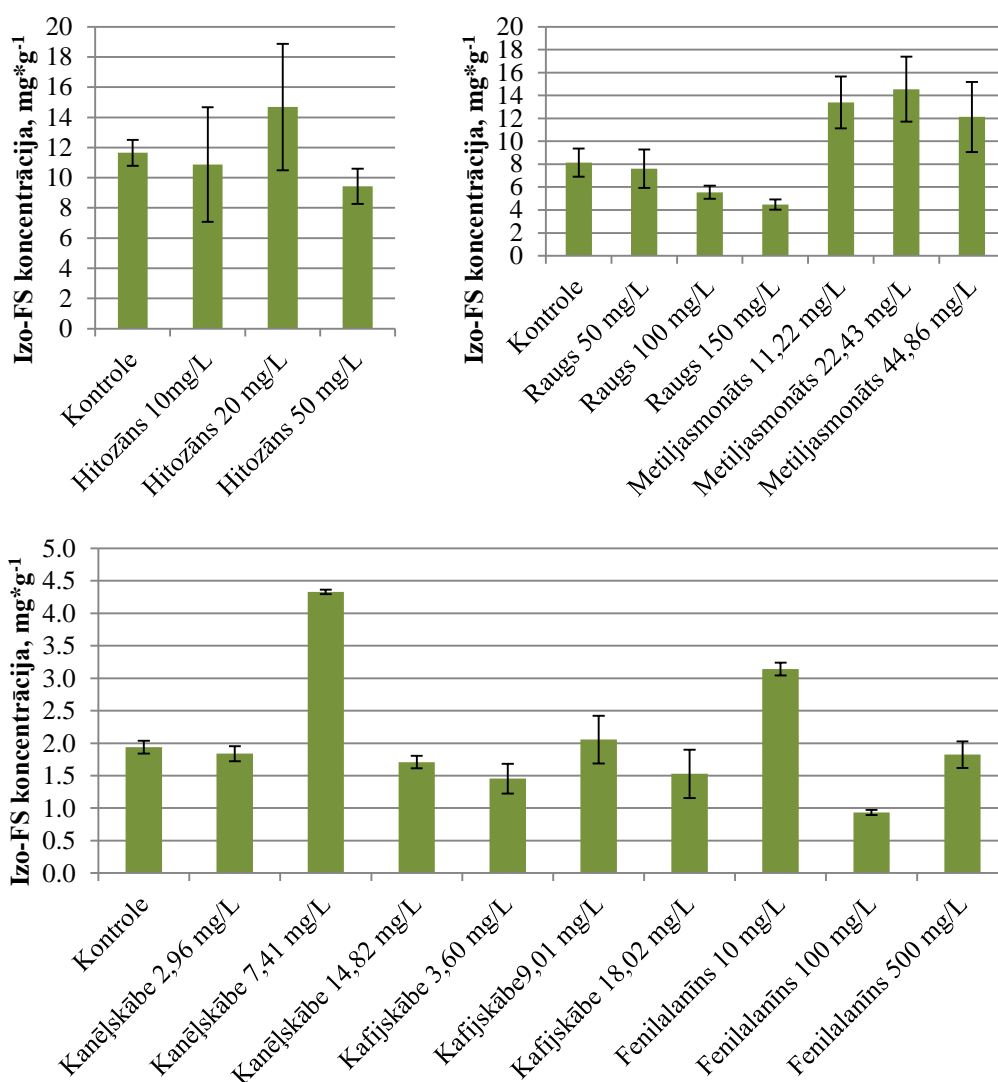
3.4.att. Etanola koncentrācijas ietekme uz izoferulskābes koncentrāciju (** vs. 96%EtOH p<0,01)



3.5.att. Etanola koncentrācijas ietekme uz dihidroferulskābes koncentrāciju

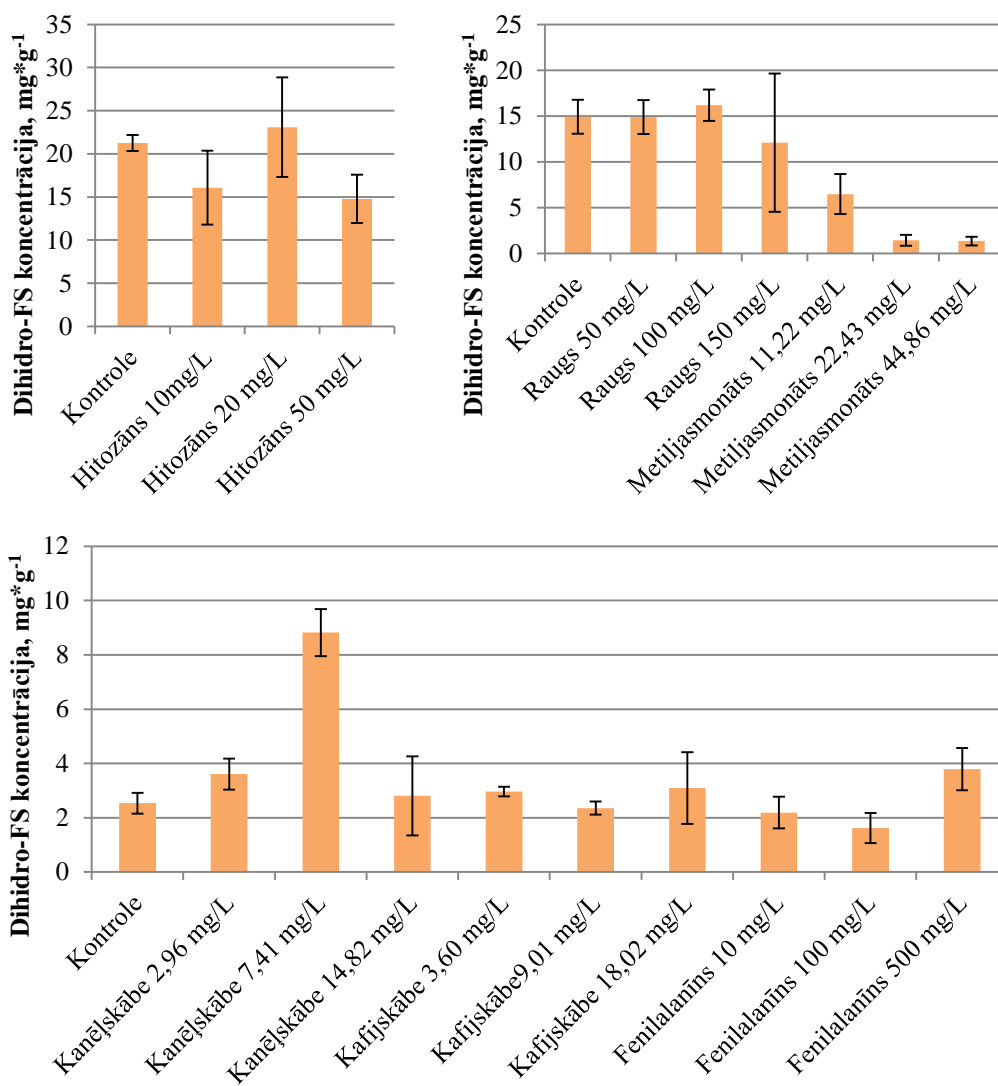
3.3. Elicitoru ietekme uz izdalīto savienojumu koncentrāciju

Elicitori tika pievienoti augu barotnēm to augšanas laikā, savukārt kontroles variantos pievienots attiecīgs daudzums šķīdinātāja, kādā šķīdināts elicitors. Iegūtie rezultāti izo-FS noteikšanai apkopoti 3.6.attēlā. Vislielākā izo-FS koncentrācija atrasta paraugos, kuriem barotnē pievienots 22,43 mg/L metiljasmonāts (14,55 mg·g⁻¹) un hitozāns 20 mg/L (14,68 mg·g⁻¹). Savukārt daži elicitori samazina izo-FS koncentrāciju-rauga ekstrakts 100 mg/L un 150 mg/L, kanēļskābe 14,82 mg/L, fenilalanīns 100 mg/L.



3.6.att.Izoferulskābes koncentrācijas maiņa atkarībā no izmantotā elicitora

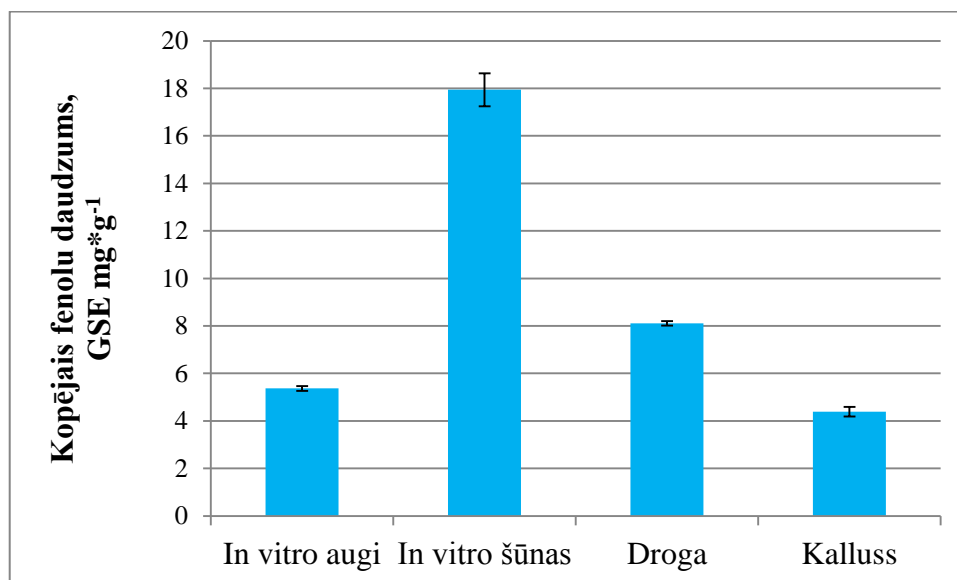
Iegūtie rezultāti dihidro-FS noteikšanai apkopoti 3.7.attēlā. Salīdzinot ar kontroli, vislielākā dihidro-FS koncentrācija bija paraugos, kuru barotnēs bija kanēļskābe 7,41 mg/L, fenilalanīns 10 mg/L. Lielākā daļa izmantoto elicitoru samazina dihidro-FS koncentrāciju. Ja izo-FS koncentrāciju metiljasmonāts palielināja, tad dihidro-FS-samazināja.



3.7.att. Dihidroferulskābes koncentrācijas maiņa atkarībā no izmantotā elicitora

3.4. Kopējā fenolu daudzuma noteikšana

Pēc iegūtā taisnes vienādojuma no kalibrēšanas grafika aprēķina kopējo fenolu daudzumu galluskābes ekvivalentos (GSE) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Linearitātes diapazonā esošās vērtības iekļautas salīdzinājumā vairākās kultūrās un apkopotas 3.8.attēlā.

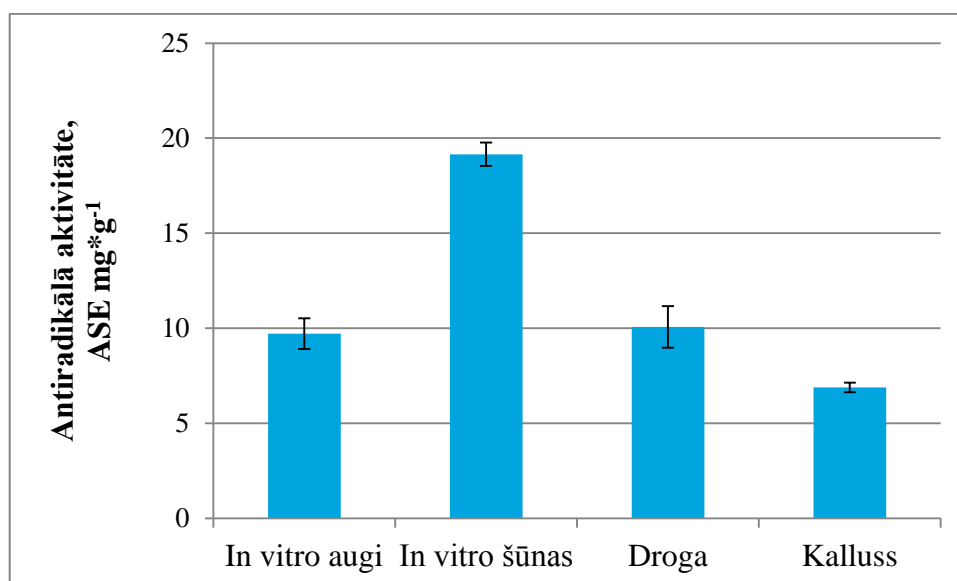


3.8.att. Kopējais fenolu daudzums

Vislielākais kopējo fenolu daudzums tika atrasts *in vitro* šūnās ($17,94 \text{ GSE mg}\cdot\text{g}^{-1}$), mazākais-kallusā ($4,39 \text{ GSE mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

3.5. Antiradikālās aktivitātes noteikšana

No iegūtā taisnes vienādojuma aprēķina antiradikālo aktivitāti askorbīnskābes ekvivalentos $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Linearitātes diapazonā esošās vērtības iekļautas salīdzinājumā vairākās kultūrās un apkopotas 3.9.attēlā.

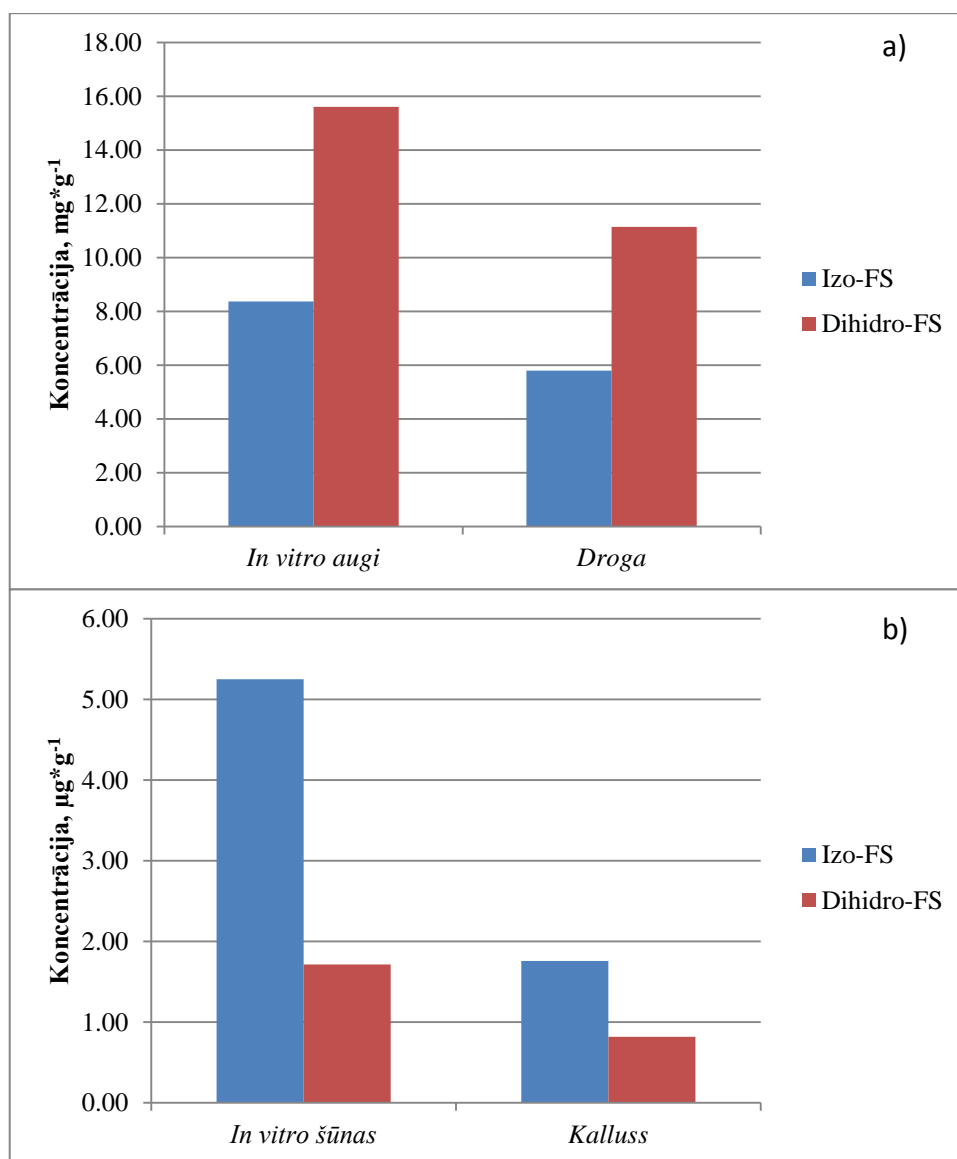


3.9.att. Antiradikālā aktivitāte

Tāpat kā kopējo fenolu daudzums, arī antiradikālā aktivitāte vislielākā ir *in vitro* šūnās (19,15 ASE mg*g⁻¹) un vismazākā-kallusā (6,88 ASE mg*g⁻¹).

3.6. Izo-FS un dihidro-FS noteikšana dažādās kultūrās

Tika salīdzināti arī atrasto savienojumu (izo-FS un dihidro-FS) koncentrācija *in vitro* augos, šūnās, drogā un kallusā (3.10.att.). Vislielākā izo-FS un dihidro-FS koncentrācija atrodama *in vitro* augos (attiecīgi 8,37 mg*g⁻¹ un 15,61 mg*g⁻¹), vismazākā kallusā (1,76 μg*g⁻¹ un 0,82 μg*g⁻¹). *In vitro* augos un drogā vairāk atrodama dihidro-FS nekā izo-FS, bet *in vitro* šūnās un kallusā-vairāk ir izo-FS.



3.10.att. Izo-FS un dihidro-FS koncentrācijas salīdzinājums dažādās kultūrās: a) izo-FS un dihidro-FS koncentrācija *in vitro* augos un drogā, mg*g⁻¹; b) izo-FS un dihidro-FS koncentrācija *in vitro* šūnās un kallusā, μg*g⁻¹

4. DISKUSIJA

Darbā tika noteikts FS daudzums dažādos apstākļos- dažādās šķīdinātāja koncentrācijās, augšanas apstākļos, kultūrās. Tādējādi tiek pētīti vislabākie apstākļi, lai iegūtu vairāk vēlamā savienojuma. Kā arī tika pārbaudīta bioloģiskā aktivitāte-antiradikālā aktivitāte, kopējais fenolu daudzums.

Ķīmiskā izvērtējuma gaitā tika atrasti divi ar FS saistīti savienojumi-izo-FS un dihidro-FS. FS izomēriem ir vienāda molekulārmasa, līdz ar to grūtības sagādāja īstā savienojuma atrašana. Agrākos pētījumos minēts, ka augos biežāk atrodama trans-FS. Tā kā standartviela tika izmantota trans-FS, tad, ņemot vērā izdalīšanas laiku, tika secināts, ka tā ir izo-FS.

Izo-FS tiek pieminēta dažādos pētījumos, tomēr tās daudzums augos noteikts ir reti. Zhang *et al.* Noteica izo-FS rīsos – daudzums svārstās no 6,30 µg/g līdz 44,49 µg/g. Etiķī atrodama izo-FS 40 µg/100 mL (Rothwell *et al.*, 2015). Tas, salīdzinot ar mūsu iegūtajiem rezultātiem, ir mazs daudzums. Izo-FS daudzums svārstās no 7,69 mg*g⁻¹ (0% etanolā) līdz 27,59 mg*g⁻¹(96% etanolā).

Dihidro-FS pētījumos pieminēta maz, tāpēc tās daudzumu grūti interpretēt. Mūsu rezultāti norāda, ka etanola koncentrācija neietekmē savienojuma koncentrāciju ekstraktā. Dihidro-FS daudzums svārstās no 50,31 mg*g⁻¹(30% etanola ekstraktā) līdz 57,51 mg*g⁻¹ (0% etanola ekstraktā), kas varētu liecināt, ka dihidro-FS labāk šķīst ūdenī nekā etanolā. Lielākoties šis savienojums minēts kā metabolīts urīnā, plazmā (Rothwell *et al.*, 2015). Mūsu iegūtie rezultāti liecina, ka analizētajos paraugos dihidro-FS ir vairāk nekā izo-FS. Biežāk pētījumos, kur analizēts fenolskābju daudzums gan savvaļas augos, gan *in vitro* kultūrās noteiktas tādas fenolskābes kā kanēļskābe, galluskābe, vanilīnskābe, prokatehīnskābe, kumārskābe, p-hidroksibenzoskābe, hlorogēnskābe, kafijskābe. Novērotie fenolskābju daudzumi, atkarībā no pētāmās augu sugas, audu kultūras tipa un fenolskābes veida, svārstās plašā diapazonā no dažiem simtiem nanogramu līdz dažiem simtiem mikrogramu gramā auga sausās masas (Szopa *et al.*, 2012, Aremu *et al.*, 2013, Moyo *et al.*, 2013, Moyo *et al.*, 2014).

Xican *et al.* ir salīdzinājuši vairākus šķīdinātājus-*Cimicifugae* saknes ekstrakti taisīti ar petrolēteri, etilacetātu, absolūtā etanolā, 95% etanolā, ūdenī. Rezultāti izteikti joslas laukumā, kas izo-FS vislielākais ir etilacetāta ekstraktā (33,24). Tas ir aptuveni četras reizes lielāks nekā 95% etanola ekstraktam (8,68). Šāds efekts, iespējams, būtu novērojams arī ar čemura augstiņu. Mūsu paraugi tika gatavoti ar etanolu. Pārbaudot etanola koncentrācijas ietekmi uz atrasto savienojumu daudzumu, tika secināts, ka, jo lielāka etanola koncentrācija, jo lielāks izo-FS daudzums izekstragēts, kā jau bija paredzēts. Tomēr statistiski ticama atšķirība, ja salīdzina 96% etanola ekstraktu ar pārējiem, ir tikai ar zemākas koncentrācijas etanola

ekstraktiem (0%, 10%, 30%). Tas liecina, ka izmantot ekstraktu pagatavošanai varētu arī 50% un 60% etanolu, kas varētu būt svarīgi, ja ekstrakts tiek lietots kosmētikas pagatavošanai. Savukārt dihidro-FS ekstrahēšanai varētu izmantot ūdeni.

Elicitoru ietekme var gan stimulēt, gan mazināt savienojumu uzkrāšanos augā. Metiljasmonāts veicina fenolu, flavanoīdu un lignīna veidošanos (Sircar *et al.*, 2012). Tas tiek novērots izo-FS gadījumā, kad visās izmantotajās koncentrācijās 11,22; 22,43; 44,86 mg/L, salīdzinot ar kontroli, ir lielāks izo-FS daudzums. Tomēr šāds efekts netiek novērots dihidro-FS mērījumos. Tieši dihidro-FS ir viens no lignīna veidošanās blakusproduktiem, kam vajadzētu būt vēl vienam iemeslam lielākam dihidro-FS daudzumam. Dihidro-FS analizētajos paraugos metiljasmonāta klātbūtnē ir mazāk nekā kontroles mērījumā. Hitozāns veicina polifenolu oksidāzes un peroksidāzes aktivitāti, kā arī palielināt fenolu, lignīna, tā polimēru daudzumu. Lignīns stiprina šūnu sienas, līdz ar to augs tiek pasargāts no infekcijām (Mandal and Mitra, 2007). Iegūtie rezultāti liecina, ka hitozāns nedaudz ietekmē izo-FS un dihidro-FS daudzumu; palielināts daudzums ir koncentrācijā 20 mg/L. Kanēļskābe rada oksidatīvu stresu augā, kā rezultātā palielinās fenolu daudzums (Ye *et al.*, 2006). Gan izo-FS, gan dihidro-FS daudzums palielinājās kanēļskābes koncentrācijā 7,41 mg/L. Ja salīdzina visus elicitorus, tad vislielākais palielinājums ir tieši kanēļskābei (7,41 mg/L), kur izo-FS ir 2,2 reizes vairāk ($4,33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) nekā kontroles paraugam un dihidro-FS 3,4 reizes vairāk ($8,82 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Tomēr vislielākais daudzums abiem savienojumiem bija elicitora hitozāna 20 mg/L klātbūtnē – $14,68 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (izo-FS) un $23,09 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (dihidro-FS). No kā var secināt, ka, ja nepieciešams lielāks izo-FS daudzums, tad barotnei jāpievieno hitozānu (20 mg/L) vai metiljasmonātu (11,22; 22,43; 44,86 mg/L), bet ja dihidro-FS-tad hitozānu (20 mg/L) vai kanēļskābi (7,41 mg/L)

Augu audu, kallusa kultūras arvien biežāk sāk izmantot sekundāro metabolītu veidošanā un uzkrāšanā. Atsevišķi bioloģiski aktīvie metabolīti tajās var uzkrāties lielākā daudzumā nekā kultivētos augos. Tādā veidā ātrāk tiek paveikts augstvērtīgāks efekts, turklāt augšanas faktori ir vieglāk standartizējami un kontrolējami, kas ļauj samazināt iegūto ekstraktu mainību un nodrošināt nemainīgu produkta kvalitāti. Vislielākais savienojumu daudzums atrodams šūnu suspensijās. Augā *Arnebia hispidissima* savienojuma alkanīna daudzums kallusa kultūrā bija gandrīz divas reizes lielāks nekā savvaļas auga saknē (Shekhawat M.S. and Shekhawat N.S., 2011). Tas ir iemesls, kāpēc tika apskatītas *in vitro* augu, *in vitro* augu audu, kallusa kultūras un droga.

Antioksidantu īpašību noteikšanai tiek izmantotas tādas metodes kā kopējo fenolu noteikšana un antiradikālās aktivitātes noteikšana. Kopējais fenolu daudzums augā *Tulbaghia violacea* lielāks ir *in vitro* augu kultūrā nekā kultivētā augā, tas atšķiras gandrīz astoņas reizes (Ncube *et al.*, 2011). Literatūrā aprakstītais kopējo fenolu daudzums čemuru augstīnā atšķiras,

jo izmantotas dažādas standartvielas- 0,196-51,8 mmol/g GSE (Šiler *et al.*, 2013; Goncalves *et al.*, 2013), 24,77 mg/g pirokatehīna ekvivalentos (Dogan *et al.*, 2010), 66,8 mg/g hlorogēnskābes ekvivalentos, 32,99 mg/g kafijskābes ekvivalentos. Šajos pētījumos arīdzan aprakstīts, ka čemuru augstiņā nav lielākais kopējo fenolu daudzums. Mūsu rezultāti liecina, ka lielākais kopējais fenolu daudzums ir *in vitro* šūnās (17,94 mg*g⁻¹ GSE), tad drogā (8,10 mg*g⁻¹ GSE), un līdzīgi rezultāti *in vitro* augos (5,37 mg*g⁻¹ GSE) un kallusā (4,39 mg*g⁻¹ GSE). Līdzīga tendence, proti, ka kallusu kultūrās fenola tipa savienojumu ir ievērojami mazāk nekā savvaļas augos vai šūnu kultūrās, novērota arī citu autoru pētījumos. Piemēram, salīdzinot zemeņu (*Fragaria vesca*) *in vitro* dzinumumu kultūras, kallusus un savvaļas augus, kallusu kultūrā atrasts līdz pat 10 reizēm mazāks fenolskābju daudzums nekā savvaļas paraugos (Yildirim and Turker, 2014). Līdzīgi novērojumi publicēti arī pētījumos par *Larrea divaricata*, kur no šūnu kultūras iegūtais kopējais fenolu daudzums ievērojami pārsniedz kallusu kultūras rezultātus (Palacio *et al.*, 2012). Lai gan kallusu kultūra, gan arī šūnu kultūra pamatā sastāv no nediferencētām šūnām, šķidrās kultūrās kultivēšanas apstākļi nodrošina labāku barības vielu piekļuvi šūnām, nekā augot uz cietas, agarizētas barotnes. Šādi “labvēlīgāki” augšanas apstākļi varētu būt par iemeslu aktīvākam metabolismam un augstākai šūnu produktivitātei šķidrajā kultūrā. Turklāt, audzējot šķidrajā kultūrā, šūnas tiek pakļautas berzes radītam stresam (Donnez *et al.*, 2011), kas, iespējams, nosaka ar stresa reakcijām, šūnapvalka veidošanos un lignifikāciju saistītu fenolskābju tipa metabolītu paaugstinātu uzkrāšanos. Atšķirību starp šūnu kultūrām un drogu varētu skaidrot ar to, ka šūnu kultūra pamatā sastāv no jaunām, aktīvi dalošām šūnās, kam ir aktīvs metabolisms, kur pretī droga ievākta no pieauguša auga, kas sastāv no dažāda tipa diferencētām šūnām. Diferencētām šūnām, atkarībā no šūnu tipa un uzdevumiem, var būt atšķirīgs metaboliskais profils un aktivitāte, tādēļ drogā uz sausās masas vienību, iespējams bija mazāk šūnu, kas aktīvi producē sekundāros metabolītus, kas izskaidro salīdzinoši zemākus kopējo fenolu rādītājus nekā šūnu kultūrā. Iegūti rezultāti par drogas sastāvu, aktivitāti nav viennozīmīgi, jo tā sastāv no čemuru augstiņa lakstiem, kas ir lieli, stiebraini un samērā grūti saberžami; tas padara paraugu nevienmērīgu. Tāpat nav zināmi apstākļi, kā augs ticis iegūts, žāvēts. Droga izvēlēta kā salīdzināšanas rīks, jo līdz maijam vēl nav iespējams iegūt augu savvaļā.

Iegūtie antiradikālās aktivitātes rezultāti ir 19,15 ASE mg*g⁻¹ (*in vitro* šūnas), 10,07 ASE mg*g⁻¹ (droga), 9,72 ASE mg*g⁻¹ (*in vitro* augi), 6,88 ASE mg*g⁻¹ (kalluss). Tāpat kā kopējo fenolu daudzuma mērījumos arī šeit saglabājas tendence, ka lielākais daudzums ir *in vitro* šūnās, mazākais- kallusā. Tas varētu norādīt, ka antiradikālo efektu veic tieši fenoli. Fenoli tiek uzskatīti par savienojumu grupu, kam piemīt vienas no labākajām antiradikālajām īpašībām, kas skaidrojamas ar fenolu savienojumu hidroksilgrupu spēju apturēt radikāļu ķēdes

reakciju nododot H^+ atomu radikāla molekulai, tādējādi reducējot radikāļa molekulu un veidojot salīdzinoši stabili fenoksi-radikāļa starpproduktu, kam arī piemīt brīvo radikāļu reducēšanas spēja (Dai and Mumper, 2010). Antiradikālā aktivitāte parāda savienojuma reaģēšanas spēju ar brīvajiem radikāļiem, bet antioksidatīvā aktivitāte norāda spēju apturēt oksidēšanos. Ne vienmēr antiradikālā aktivitāte atbilst antioksidatīvajai aktivitātei (Tirzitis and Bartosz, 2010). Tas ir iemesls, kāpēc būtu nozīmīgi veikt papildus pētījumus čemuru augstiņa dažādās kultūrās.

Kopējo fenolu daudzuma un antiradikālās aktivitātes noteikšanas metodēs iegūtajos ekstraktos tika noteikts izo-FS un dihidro-FS daudzums. Vislielākais izo-FS daudzums atrasts *in vitro* augos ($8,37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), tad drogā ($5,80 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), *in vitro* šūnās ($5,25 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), kallusā ($1,76 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Savukārt Vislielākais dihidro-FS daudzums atrasts *in vitro* augos ($15,61 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), tad drogā ($11,14 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), *in vitro* šūnās ($1,71 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), kallusā ($0,82 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Tā kā abu savienojumu daudzums lielāks ir *in vitro* augos un drogā, tas liecina, ka kopējo fenolu daudzums, antiradikālā aktivitāte nav panākta tikai ar šiem savienojumiem. Kā jau visos augos arī čemuru augstiņā ir daudz savienojumu. Tātad, lai pilnībā izprastu šī auga bioloģisko aktivitāti, būtu jāidentificē visi ekstraktā atrodamie savienojumi.

5. SECINĀJUMI

1. Izmantojot šķidrums hromatogrāfiju – augstas izšķirtspējas masspektrometriju ir iespējams noteikt *in vitro* apstākļos auguša čemuru augstiņa ķīmisko sastāvu, balstoties uz nosakāmo savienojumu molu masu un m/z vērtībām. Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, tika secināts, ka pētāmais objekts satur divus dominējošos savienojumus – izo-FS un dihidro-FS.
2. Etanola koncentrācija parauga ekstrakcijas vidē maz ietekmē nosakāmo savienojumu koncentrāciju. Izo-FS vislielākajā koncentrācijā atrodama 96% etanolā ($27,59 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), vismazākajā-0% etanolā ($7,69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Dihidro-FS vislielākajā koncentrācijā atrodama 0% etanolā ($57,51 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), vismazākajā-30% etanolā ($50,31 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$).
3. Elicitoru ietekme *in vitro* kultivēta čemuru augstiņa barotnēs var gan stimulēt, gan mazināt izo-FS un dihidro-FS uzkrāšanos augā. Izo-FS daudzumu palielina hitozāns (20 mg/L), metiljasmonāts ($22,43 \text{ mg/L}$); samazina raugs (100 mg/L , 150 mg/L), hitozāns (50 mg/L), kafijskābe ($3,60 \text{ mg/L}$), fenilalanīns (100 mg/L). Dihidro-FS daudzumu palielina hitozāns (20 mg/L), kanēļskābe ($7,41 \text{ mg/L}$); samazina hitozāns (10 mg/L , 50 mg/L), raugs (150 mg/L), metiljasmonāts ($11,22 \text{ mg/L}$, $22,43 \text{ mg/L}$, $44,86 \text{ mg/L}$), fenilalanīns (100 mg/L).
4. Dažādās augu kultūrās atšķiras kopējo fenolu daudzums un antiradikālā aktivitāte. Vislielākais kopējo fenolu daudzums ir *in vitro* šūnās ($17,94 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), mazākais-kallusā ($17,94 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Vislielākā antiradikālā aktivitāte ir *in vitro* šūnās ($19,15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), mazākais-kallusā ($6,88 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$).
5. Izo-FS un dihidro-FS koncentrācija ir atkarīga no augu kultūras. Vislielākā izo-FS koncentrācija ir *in vitro* augos ($8,37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), vismazākā-kallusā ($1,76 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Vislielākā dihidro-FS koncentrācija ir *in vitro* augos ($15,61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), vismazākā-kallusā ($0,82 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).
6. Biotehnoloģiski *in vitro* audzēts čemuru augstiņš ir pietiekami vērtīgs ārstniecības augs, kam piemīt gan antiradikālās, gan antioksidatīvās īpašības, tāpēc no šādi kultivēta auga iegūtos ekstraktus ir perspektīva izmantot kā veselību uzlabojošu līdzekli gan medicīnā, gan citās ārstniecības nozarēs.

6. PATEICĪBAS

Paldies Latvijas Universitātes Botāniskā dārza pārstāvēm Signei Tomsonei, Madarai Lazdānei par *in vitro* augu materiāliem.

Īpaši lielu pateicību izsaku darba vadītājam Dr. ķīm. Ilvai Nakurtei par iespēju izstrādāt maģistra darbu šajā tēmā, kā arī par konsultācijām, ieteikumiem darba tapšanas procesā.

Ļoti lielu pateicību arī vēlos izteikt Dr. biol. Anetei Boroduškei palīdzību metožu apgūšanā, ieteikumiem un konsultācijām.

7. PUBLICITĀTE

1. **Lindmane, A., Boroduske, A., Tomsone, S., Lazdane, M., Boroduskis, M., Nakurte I.** "Effect of Extraction Solvent on Determination of Ferulic Acid in *Centaurium erythraea* using HPLC-MS-TOF". 58th Scientific Conference for Students of Physics and Natural Sciences. March 24-27th, 2015, Vilnius, Lithuania.
2. **Boroduske, A., Nakurte, I., Lindmane, A., Lazdane, M., Tomsone, S.** "Growth Parameters Of *Centaurium Erythraea* Cell Culture In Relation To Its Chemical Composition And Antiradical Activity". International Scientific Conference "Vital Nature Sign". May 14-16th, 2015, Kaunas, Lithuania.

8. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. **Anson N.M., van den Berg R., Havenaar R., et al.** Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, 2009, 49 (2), p. 296-300.
2. **Antignac, E., Nohynek, G.J., Re, T., et al.** Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49 (2), p. 324-341.
3. **Aremu, A.O., Gruz, J., Šubrťová, M., et al.** Antioxidant and phenolic acid profiles of tissue cultured and acclimatized *Merwillia plumbea* plantlets in relation to the applied cytokinins. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170 (15), p. 1303-1308.
4. **Arora, R., Mathur, A., Mathur, A.K.** Emerging Trends in Medicinal Plant Biotechnology. **In:** *Medicinal plant biotechnology*. CAB International, 2010, p.1-12.
5. **Azay-Milhau, J., Ferrare, K., Leroy, J., et al.** Antihyperglycemic effect of a natural chicoric acid extract of chicory (*Cichorium intybus* L.): A comparative in vitro study with the effects of caffeic and ferulic acids. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 150, p. 755–760.
6. **Barnards, D.** *Baha ziedu terapija*. Rīga: Ziedu terapija, 2010. 389 lpp.
7. **Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D.** *Herbal medicines*. London: Pharmaceutical Press, 2007, 710 p.
8. **Batista R.** Uses and potential applications of ferulic acid. **In:** *Ferulic acid. Antioxidant properties, uses and potential health benefits*. Nova Science Publishers, 2015, p. 39-70.
9. **Beck, J.J., Kim, J.H., Campbell, B.C., et al.** Fungicidal Activities of Dihydroferulic Acid Alkyl Ester Analogues. *Journal of Natural Products*, 2007, 70 (5), p. 779-782.
10. **Bhojwani, S. S. and Dantu, P.K.** *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. New Delhi: Springer, 2013, p.309.
11. **Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., et al.** Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95 (1), p. 204-209.
12. **Cardoza V.** Tissue Culture: The Manipulation of Plant Development. **In:** *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques and applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008, p. 113-134.
13. **Dewick, P.M.** *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. 3rd edition*. Chichester: John Wiley&Sons, 2009, p.550.
14. **Dilshara, M.G., Lee, K.T., Jayasooriya, R.G.P.T., et al.** Downregulation of NO and PGE2 in LPS-stimulated BV2 microglial cells by trans-isoferulic acid via suppression of

- PI3K/Akt-dependent NF- κ B and activation of Nrf2-mediated HO-1. *International Immunopharmacology*, 2014, 18, p. 203–211.
15. **Dogan, S., Diken, M.E., Dogan, M.** Antioxidant, phenolic and protein contents of some medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, 4 (23), p. 2566-2573.
 16. **Donnez, D., Kim, K.-H., Antoine, S., et al.** Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochemistry*, 2011, 46 (5), p. 1056-1062.
 17. **Draelos, Z.D., Yatskayer, M., Oresajo, C., et al.** Efficacy of ferulic acid in improving the appearance of photoaged skin. *Cosmetic Dermatology*, 2008, 21 (4), p. 195-198.
 18. **European Commission (EC).** CosIng database. – [atsauce 06.05.2015.]. Pieejams internetā: <http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/>
 19. **European Medicines Agency (EMA).** 2009. Assessment report on *Centaurium erythraea* Rafn. s.l. including *C. majus* (H. et L.) Zeltner and *C. suffruticosum* (Griseb.) Ronn., herba, for the development of a community herbal monograph, 2009 – [atsauce 18.04.2015.]. Pieejams internetā: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPA_assessment_report/2009/12/WC500018163.pdf
 20. **Ferrer, I. and Thurman, E.M.** Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003, 22 (10), p. 750-756.
 21. **Gaosheng, H. and Jingming, J.** Production of Useful Secondary Metabolites Through Regulation of Biosynthetic Pathway in Cell and Tissue Suspension Culture of Medicinal Plants. **In: *Recent Advances in Plant in vitro Culture***. Rijeka: InTech, 2012, p. 197-210.
 22. **George, E.F.** Plant Tissue Culture Procedure - Background. **In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition***. Dordrecht: Springer, 2008, p.1-28.
 23. **Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P., et al.** The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 2013, 43 (1), p. 465-471.
 24. **Gossett, D. R. and Kähler N.D.** Biotechnology And Genetic Engineering. **In: *Salem Press Encyclopedia***. 2014.
 25. **Häkkinen, S.T. and Ritala A.** Medicinal Compounds Produced in Plant Cell Factories. **In: *Medicinal plant biotechnology***. CAB International, 2010, p.13-35.
 26. **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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, 92 (11), p. 2326-2331.

27. **Hillewaert, H.** *Centaurium erythraea*. 2006. Ankerstraat, Oostende, Belgium. – [atsauce 10.05.2015.]. Pieejams internetā:
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1e/Centaurium_erythraea_%28flowers%29.jpg
<http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.results>
28. **Kumar, N. and Pruthi, V.** Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 2014, 21(4), p. 86-93.
29. **Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P.J.**, et al. Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaurium erythraea*. *Phytomedicine*, 2003,10(4), p. 344–347.
30. **Liu I.M., Hsu F.L., Chen C.F., Cheng J.T.** Antihyperglycemic action of isoferulic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. *British Journal of Pharmacology*, 2000, 129, p. 631-636.
31. **Loizzo, M.R., Saab, A.M., Tundis, R.**, et al. In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 119 (1), pp. 109-116.
32. **Mancuso C. and Santangelo R.** Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 65, p. 185–195.
33. **Mandal, S. and Mitra, A.** Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2007, 71 (4-6), p. 201-209.
34. **Meeprom, A., Sompong, W., Chan, C.B.**, et al. Isoferulic Acid, a New Anti-Glycation Agent, Inhibits Fructose- and Glucose-Mediated Protein Glycation in Vitro. *Molecules*, 2013, 18, p. 6439-6454.
35. **Moyo, M., Amoo, S.O., Aremu A.O.**, et al. Plant regeneration and biochemical accumulation of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in *Hypoxis hemerocallidea* organ and callus cultures. *Plant Science*, 2014, 227, p. 157-164.
36. **Moyo, M., Aremu, A.O., Gruz, J.**, et al. Conservation strategy for *Pelargonium sidoides* DC: Phenolic profile and pharmacological activity of acclimatized plants derived from tissue culture. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 149 (2), p. 557-561.
37. **Mroueh, M., Saab, Y., Rizkallah, R.** Hepatoprotective Activity of *Centaurium erythraea* on Acetaminophen-induced Hepatotoxicity in Rats. *Phytotherapy Research*, 2004,18, p. 431–433.

38. **Ncube, B., Ngunge, V.N.P., Finnie, J.F., et al.** A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micropropagated *Tulbaghia violacea* Harv. Plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 134 (3), pp. 775-780.
39. **Ou Sh. and Kwok K.** Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, 84(11), p. 1261–1269.
40. **Palacio, L., Cantero, J.J., Cusidó, R.M., et al.** Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). *Plant Science*, 2012, 193-194, p. 1-7.
41. **Pārtikas un veterinārais dienests (PVD).** Uztura bagātinātāju reģistrs – [atsauce 18.04.2015.]. Pieejams internetā:
http://www.pvd.gov.lv/lat/lab_izvlne/registri/uztura_bagatinataji/uztura_bagatinataju_registrs
42. **Pētersone, A.** *Savvaļas ārstniecības augi. 2.izdevums.* Rīga: Liesma, 1968, 480 lpp.
43. **Rechner, A.R. and Kroner, C.** Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis Research*, 2005, 116 (4), p. 327-334.
44. **Rothwell, J.A., Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., et al.** Phenol-Explorer 3.0 database. – [atsauce 07.04.2015.]. Pieejams internetā: <http://phenol-explorer.eu/>
45. **Rubine H. un Eniņa V.** *Ārstniecības augi.* Rīga: Zvaigzne ABC, 2004, 344 lpp.
46. **Sakai, S., Ochiai, H., Mantani, N., et al.** Administration of isoferulic acid improved the survival rate of lethal influenza virus pneumonia in mice. *Mediators of Inflammation*, 2001, 10 (2), p. 93-96.
47. **Schmidt, B.M., Erdman Jr., J.W., Lila, M.A.** Effects of food processing on blueberry antiproliferation and antioxidant activity. *Journal of Food Science*, 2005, 70 (6), p. S389-S394.
48. **Sefi, M., Fetoui, H., Lachkar, N., et al.** Centaurium erythraea (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 135, p. 243–250.
49. **Shekhawat, M.S., Shekhawat, N.S.** Micropropagation of *Arnebia hispidissima* (Lehm). DC. and production of alkannin from callus and cell suspension culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33 (4), p. 1445-1450.
50. **Sircar, D., Cardoso, H.G., Mukherjee, C., et al.** Alternative oxidase (AOX) and phenolic metabolism in methyl jasmonate-treated hairy root cultures of *Daucus carota* L. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169 (7), p. 657-663.

51. **Srinivasan, M., Sudheer, A.R., Menon, V.P.** Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2007, 40(2), p. 92–100.
52. **Stefkov, G., Miova, B., Dinevska-Kjovkarovska, S., et al.** Chemical characterization of *Centaurium erythraea* L. and its effects on carbohydrate and lipid metabolism in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 152, p. 71–77.
53. **Szopa, A., Ekiert, H., Szewczyk, A., et al.** Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in in vitro cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultures*, 2012, 110 (3), p. 329-336.
54. **Šiler, B., Živković, S., Banjanac, T., et al.** Centauries as underestimated food additives: Antioxidant and antimicrobial potential. *Food Chemistry*, 2014, 147, p. 367-376.
55. **Tahraoui, A., Israili, Z.H., Lyoussi, B.** Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010,132, p. 48–55.
56. **Tirzitis, G. and Bartosz, G.** Determination of antiradical and antioxidant activity: Basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 2010, 57 (2), p. 139-142.
57. **Tuluçe, Y., Ozkol, H., Koyuncu, I., et al.** Gastroprotective effect of small centaury (*Centaurium erythraea* L) on aspirin-induced gastric damage in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 2011, 27(8), p. 760–768.
58. **Verma, S. and Singh, S.P.** Current and future status of herbal medicines. *Veterinary World*, 2008, 1 (11), p. 347-350.
59. **Xican, L., Lin, J., Gao, Y., et al.** Antioxidant activity and mechanism of *Rhizoma Cimicifugae*. *Chemistry Central Journal*, 2012, 6 (1), 140.
60. **Ye, S.F., Zhou, Y.H., Sun, Y., et al.** Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of *Fusarium* wilt. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 56 (3), p. 255-262.
61. **Yildirim, A.B. and Turker, A.U.** Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and phenolic content comparison of field-grown and in vitro-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *Scientia Horticulturae*, 2014, 169, p. 169-178.
62. **Zāļu valsts aģentūra (ZVA).** Latvijas Republikas Zāļu reģistrs. – [atsauce 18.04.2015.]. Pieejams internetā: <http://www.zva.gov.lv/zalu-registrs/?iss=1&lang=lv&q=centaurii+herba&ON=&SN=&NAC=on&RN=&ESC=on&AK=&SAT=on&RA=&DEC=on&LB=&PIM=on&MFR=&MDO=>

63. **Zhang, H., Shao, Y., Bao, J., et al.** Phenolic compounds and antioxidant properties of breeding lines between the white and black rice. *Food Chemistry*, 2015, 172, p. 630-639.
64. **Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., et al.** A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds (2006) *Journal of Applied Phycology*, 18 (3-5), pp. 445-450.
65. **Zhao, Z. and Moghadasian, M.H.** Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 2008, 109 (4), p. 691-702.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs „Ferulskābes noteikšana *Centaurium erythraea*, izmantojot šķīdrumu hromatogrāfijas-masspektrometrijas metodi” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

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

Autore: Agneta Lindmane _____
(vārds, uzvārds) (paraksts)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Dr.chem. Ilva Nakurte _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Recenzente: Dr.med. Jolanta Pupure _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Maģistra darbs aizstāvēts maģistra studiju programmas „Farmācija” Maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____2015., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts)