



Erinevate madaraliikide (*Rubiaceae*) üldfenoolide, flavonoidide ja iridoidide kogusisalduste võrdlus värvusreaktsioonide alusel

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Regina Drošnova

Juhendaja: Piret Saar-Reismaa, PhD

Keemia ja biotehnoloogia instituut, teadur

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Regina Drošnova

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Piret Saar-Reismaa

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Vello Tõugu

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Lühendite loetelu	4
Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1. Madarad	6
1.1.1. Eestis kasvavad madarad	6
1.1.2. Madarate kasutamine rahvameditsiinis.....	6
1.1.3. Madarates leiduvad ühendid	6
1.2. Fütokemikaalid.....	8
1.2.1. Polüfenoolid	8
1.2.2. Iridoidid ja sekoiridoidid.....	10
1.2.3. Flavonoidid	10
1.3. Analüüsimeetodid	11
1.3.1. Bioaktiivide analüüsi meetodid.....	11
1.3.2. Värvusreaktsioonid.....	12
1.3.3. Spektrofotomeetria.....	12
2. Töö eesmärk.....	14
3. Eksperimentaalne osa	15
3.1. Kasutatud kemikaalid	15
3.2. Kasutatud aparatuur	15
3.3. Standardlahuste valmistamine.....	15
3.4. Taimne materjal ja proovi ettevalmistamine.....	16
3.5. Värvusreaktsioonide läbiviimine	17
4. Tulemused ja arutelu.....	19
4.1. Üldfenoolide sisaldus	19
4.2. Flavonoidide kogusisaldus.....	20
4.3. Iridoidide üldsisaldus.....	22
4.4. Liikide vaheline võrdlus	24
Kokkuvõte.....	26
Abstract	27
Tänavauldused	28
Kasutatud kirjandus.....	29

Lühendite loetelu

Lühend	Eesti keeles	Inglise keeles
AE	Asperulosiidi ekvivalent	<i>Asperuloside equivalent</i>
Ats	Atsetoon	<i>Acetone</i>
C	Kontsentratsioon	<i>Concentration</i>
Ekv	Ekvivalent	<i>Equivalent</i>
EtOH	Etanool	<i>Ethanol</i>
F-C	Folin-Ciocalteu	<i>Folin-Ciocalteu</i>
GAE	Gallushappe ekvivalent	<i>Gallic acid equivalent</i>
HPLC	Kõrgsurvevedelikkromatograafia	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IR	Infrapunakiirgus	<i>Infrared radiation</i>
MeOH	Metanool	<i>Methanol</i>
QE	Kvertsetiini ekvivalent	<i>Quercetin equivalent</i>
SD	Standardhälve	<i>Standard deviation</i>
RSD	Suhteline standardhälve	<i>Relative standard deviation</i>
UV-Vis	Ultraviolett-nähtav	<i>Ultraviolet-visible</i>

Sissejuhatus

Inimesed on aastatuhandete jooksul kasutanud ja siiani kasutavad erinevaid taimi, et ravida haigusi. Nendest ravimtaimedest valmistati tömmiseid, teesid, kompresso ja salve. Taimed aitasid ravida nendes sisalduvate bioaktiivsete ainete töttu, millede hulgas on näiteks fenoolid, flavonoidid ja iridoidid. Üheks perekonnaks taimedest, milles sisalduvad eelnimetatud bioaktiivsedainerühmad, on madarad ehk *Rubiaceae* perekond [1][2].

Viimastel aastakümnetel on tehtud palju uuringuid, mille eesmärgiks on määrata bioaktiivsete ainete sisaldust erinevates madara liikides, eriti polüfenoolide sisaldust nende antioksüdatiivse omaduse töttu [3]. Ka on madar levinud kogu maailmas, mistõttu saab seda potentsiaalselt kasvatada ja kasutada peaaegu igas maailma osas.

Bioaktiivsete ainete sisalduste määramiseks kasutatakse spektrofotomeetritlist meetodit värvusreaktsioonide alusel. Üldfenoolide määramiseks kasutatakse tavaliselt reaktsiooni Folin-Ciocalteu reaktiiviga, flavonoidide üldsisalduse hindamise jaoks kompleksi moodustumist AlCl_3 -ga ja iridoidide kogusisalduse määramiseks reaktsiooni Trim-Hill reagendiga [2]. Spektrofotomeetritline meetod värvusreaktsioonide alusel ei võta palju aega ja võimaldab kiiresti saada võrreldavaid tulemusi.

Käesoleva töö eesmärgiks on määrata nelja erineva madara ekstraktide üldfenoolide, flavonoidide ja iridoidide kogusisaldused värvusreaktsioonide alusel ja võrrelda neid omavahel. Lisaks hinnata ka solvendi mõju erinevate ühendigruppide ekstraheerimisvõimele.

Kõige rohkem uuritud ühendid leiti hobumadara õites. Kui võrrelda solvente, siis üldfenoolide ekstraheerimiseks sobib kõige rohkem 50% atsetoon, iridoidide ekstraheerimiseks 50% EtOH, kuid parimat lahustit flavonoidide ekstraheerimiseks ei olnud võimalik üheselt hinnata.

See töö koosneb 30 leheküljest: kirjanduse ülevaatest, kasutatud metoodikatest, tulemustest ja arutelust.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Madarad

Perekond *Galium* L. (*Rubiaceae*) on suur ja kosmopolitne perekond, kuhu kuulub enam kui 600 liiki madaraid[2].

1.1.1. Eestis kasvavad madarad

Üle Eesti levinud mitmed madarad. Nende hulgas on: Värv-varjulill (*Asperula tinctoria*), hobumadar (*Galium verum*), lõhnnav madar (*Galium odoratum*), värvmadar (*Galium boreale*), valge madar (*Galium album*), pöldmadar (*Galium spurium*), roomav madar (*Galium aparine*), ojamadar (*Asperula rivalis*), soomadar (*Galium palustre*) ja lodumadar (*Galium uliginosum*) [4].

1.1.2. Madarate kasutamine rahvameditsiinis

Madarad on rahvameditsiinis kasutatusel mitmete erinevate probleemide raviks ja leevendamiseks. Suurt hulka madaraid on tarvitatud nakkushaiguste ravimina [5]. Tavapäraselt tarvitatakse madaraid ka mao- ja peensoolepöletiku, haavandtöve ja palaviku puhul ning sapinõristuse suurendamiseks[6]. Roomav madar suurendab uriinieritust ja seda kasutatakse düsuuria (raskendatud urineerimine), kuseteede pöletiku, lümfisõlmepöletiku ja eriti lümfisõlmede suurenemise puhul. Sellel madaral on ka verdpuhastav, verejooksu tökestav ja kasvajatevastane toime. Vanasti on roomava madara ürdist valmistatud teed joodud väsimuse ja skorbuudi vastu[7].

Lähedase toimega on hobumadar ja lõhnnav madar [6]. Lisaks näitas *Hartwells'* uuring, et hobumadar oli traditsiooniliselt kasutatud Euroopas ja Põhja-Ameerikas vähihaavandite ja rinnavähi ravis. Hiinas oli seda kasutatud hepatiidi ravina [5]. Hobumadara maapealset osa kasutati traditsiooniliselt rahustina ning hobumadara mahlast ja rasvast valmistatud salvi on tarvitatud haavandite ja ekseemide raviks [7].

Pehme madar mõjub spasme löögastavalt ning seda on kasutatud hüsteeria ja langetöve korral [6], taime ürti on tarvitatud välispidiselt haavade, paisete ja ekseemide ravimisel [7]. Nii hobumadar kui ka pehme madar oli traditsioonilises meditsiinis kasutatud ka epilepsia ravis [5]. Värvmadara abil on püütud aborti teha, samuti mõjub see higi- ja uriinieritust soodustavalt. Kolmeöelist madarat kasutatakse uriinieritust suurendava vahendina kivitöve korral ning mõne neeruhaiguse leevendamiseks. Hiinas kasutatakse madarat *G. gracile* üldise pöletikuvastase toime jaoks [6].

1.1.3. Madarates leiduvad ühendid

Flavonoidid ja iridoidid leiduvad igas madaraliigis suuremal või väiksemal kontsentratsioonil (Tabel 1) [2]. Varasemad hobumadara ja pehme madara fütokeemilised uuringud kirjutasid iridoidglükosiidide, fenoolsete ühendite ja triterpeenide olemasolust, aga leiti ka väikeses koguses tanniine, saponiine, eeterlikke õlisid, vahasid, pigmente ja C-vitamiini [5]. Saponiine ja steroide ei

leitud mõnedes madarates nagu *G. corrudifolium* ja *G. lucidum*. Tanniinid ei leidu *G. lucidum* ja *G. mollugo*. Eelnevalt mainitud madarate liigid ei sisalduanud antrakinoone ja südameglükosiide [2].

Tabel 1. Fütokeemiliste ühendite olemasolu madarate liikides [2]

Liigid	Flavonoidid ^(a)	Tanniinid	Saponiinid	Iridoidid	Steroidid/ triterpeenid
<i>G. corrudifolium</i>	++	+	-	+/-	-
<i>G. cruciata</i>	++	+	+	+	+
<i>G. divaricatum</i>	++	++	+	++	++
<i>G. lucidum</i>	+	-	-	+	-
<i>G. mollugo</i>	+	-	+	+	+
<i>G. palustre</i>	++	++	++	++	++
<i>G. parisiense</i>	++	+	++	++	++
<i>G. verum</i>	++	++	+	++	++

(a) – negatiivne reaktsioon, +/- nõrk positiivne reaktsioon, + positiivne reaktsioon, ++ tugev positiivne reaktsioon.

On teada, et hobumadar ja pehme madar on rikkad iridoidide (Tabel 2) poolest [5]. Pehmes- ja hobumadaras on enimlevinud iridoidiks asperulosiid. Ka on levinud näiteks asperulosiidihape, monotropeiin ja loganiin. Vastupidi ei sisaldu hobumadaras galiosiid ja skandosiid metüülester, aga pehmes madaras sisalduvad.

Tabel 2. Iridoidide leidumine hobumadaras ja pehmes madaras [5]

Keemiline nimi	Hobumadar	Pehme madar
Asperulosiid	+	+
Monotropeiin	+	+
Asperulosiidihape	+	+
Loganiin	+	+
Galiosiid	-	+
Skandosiid metüülester	-	+

Samuti on leitud pehmes- ja hobumadaras mitmeid fenoolseid ühendeid (Tabel 3). Fenoolsetest ühenditest leiduvad madarates (näiteks hobumadaras, lõhnava madaras, pehmes madaras ja roomavas madaras) kõige rohkem kvartsetiin, rutiin ja p-kumaarhape. Pehmes- ja hobumadaras võivad sisalduda ka klorogeenhape ja kohvhape [8].

Roomava madara koostises on veel levinud bensüülisokinoliinalkoidid (protopiin), karboliinalkoidid (harmiin), kinasoliinalkoidid (1-hüdroksüdesoksüpeganiin, 8-hüdroksü-2,3-dehüdrodesoksüpeganiin), antratseenid, kumariinid, organisid happed, mineraalained (vask,

tsink, raud, mangaan, boor, titaan, strontsium, vanaadium, tallium, nikkel, molübdeen) ja rasvõlid [6].

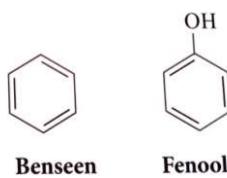
Tabel 3. Fenoolsed ühendid hobumadaras ja pehmes madaras [5]

Keemiline nimi	Hobumadar	Pehme madar
Isorhamnetiin	+	-
Kvertsetiin	+	+
Rutiin	+	+
Klorogeenhape	+	+

1.2. Fütokemikaalid

1.2.1. Polüfenoolid

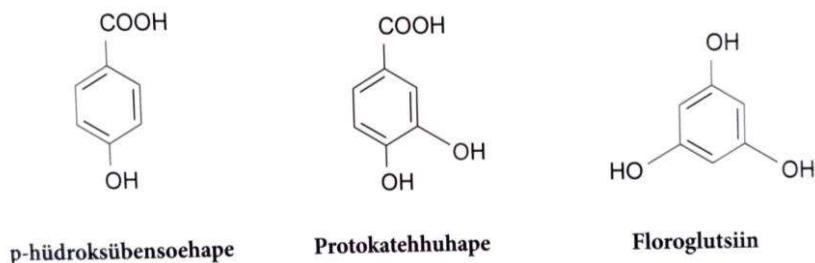
Fenoolideks nimetatakse aromaatseid hüdroksü-ühendeid, mille aromaatses tsüklis asendab vesinikuatomit hüdroksüülruhm või nende derivaate (Joonis 1). Kui aromaatses tuumas on rohkem kui üks hüdroksüülruhm, nimetatakse niisuguseid ühendeid polüfenoolideks [9].



Joonis 1. Aromaatne tsükkel (benseen) ja aromaatne tsükkel hüdroksüülruhmaga (fenool)

Enam levinud klassifikatsiooni kohaselt jagunevad nad aga OH-rühmade arvu järgi kolme rühma:

- Monofenoolid (ühealuselised)
- Difenoolid (kahealuselised)
- Polüfenoolid (kolme- ja enamaluselised) (Joonis 2) [9]



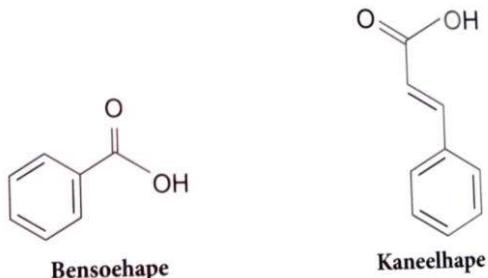
Joonis 2. Vasakult paremale: monofenool (p-hüdroksübensoehape), difenool (protokatehhuhape), polüfenooli (floroglutsiin) näidised

Paljud, koguni enamik polüfenoolidest on taimedes esindatud glükosiididena. Fenoolglükosiidid kujutavad endast ühendeid, milles fenoolne osa (aglükoon) on ühendatud ühe või mitme ühe ja sama või erineva sahhariidi molekuliga (glükooniga) [9].

Taimedes esinevad lihtfenoolid sageli aldehüüdide vüi karboksüülhapetena, näiteks fenoolne fenüülpropanoid eugenool, aldehüüd vanilliin, fenoolhapped salitsüül-, feerula-, kohvhape jt [9].

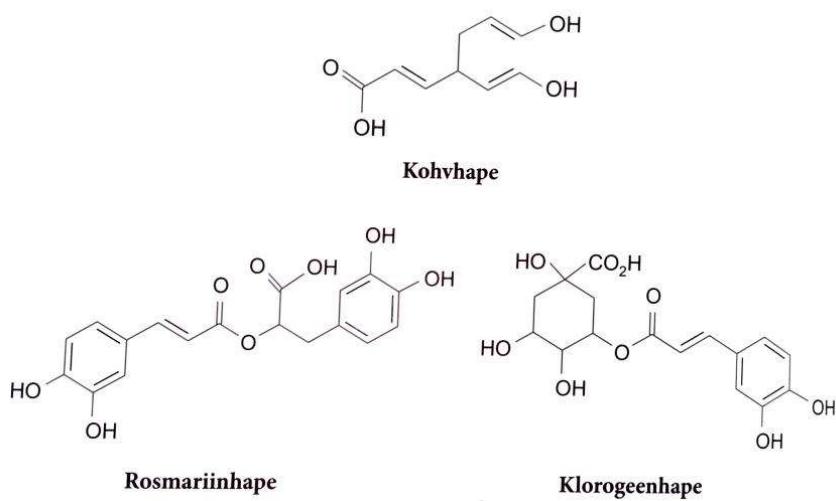
Fenoolhapeteks nimetatakse benseenituumma omavaid ühendeid, mille struktuuris on vähemalt üks karboksüülrühm ja vähemalt üks hüdroksüülrühm. Need ühendid jaotatakse kahte rühma:

- Bensoehappe derivaadid ($C_6 - C_1$)
- Kaneelhappe derivaadid ($C_6 - C_3$) (Joonis 3) [9]



Joonis 3. Bensoehape ja kaneelhappe derivaat

Bensoehappe derivaatide hulka kuuluvad fenoolsed happed on taimedes võrdlemisi levinud vabal kujul, aga samuti estrite või glükosiididena. Nende üheks esindajaks on gallushape. Esinevaks fenoolsete hapete estriks on näiteks vanilliin. Aniisaldehüüd esineb mitmete eeterlike ölide koostises[9]. Kaneelhappe derivaatide sekka kuuluvatest fenoolsetest hapetest on tuntumad p-kumaarhape, kohvhape (Joonis 4), feerulahape ja sinaaphape. Feerulahape ja p-kumaarhape leiduvad näiteks mõnedes Serbia ravimtaimedest [10]. Harva on neid taimedes vabal kujul, valdavalt esinevad nad estritena. Kiinahape estrites on taimedes levinud näiteks klorogeenhape, mis sisaldub õunades, pirnides, marjades ja kohvis [11], ja rosmariinhape (Joonis 4); harvem esineb alifaatsete alkohoolide estreid. Seda tüüpi fenoolhapped võivad esineda veel amiididena, samitu glükoosi estritena [9].

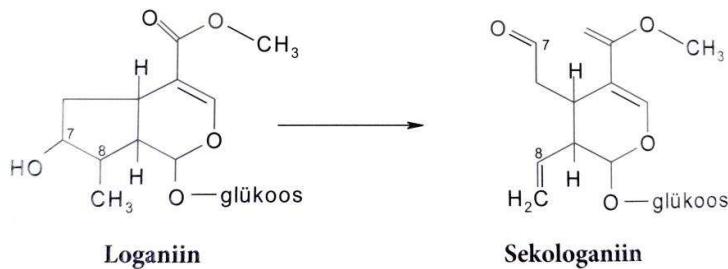


Joonis 4. Kohvhape, klorogeenhape ja rosmariinhape

Omaette fenoolsete ühendite rühma moodustavad hüdroksübensoehapped ja nende derivaadid, mida leidub peaaegu igas taimes: p-hüdroksübensoehape, protokateehhiinhape, vanilliinhape jt. Võrdlemisti tihti on taimedes ka selliseid happeid nagu gallushape ja sirelhape. Taimedes on nad kas vabal kujul või seotult. Viimasel juhul on erinevad hüdroksübensoehapped omavahel seotud ja moodustavad depsiide või esinevad glükosiididena [9].

1.2.2. Iridoidid ja sekoiridoidid

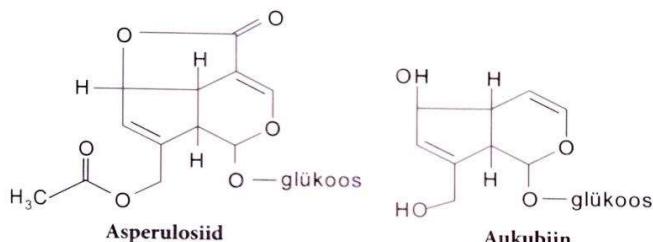
Iridoidid ehk pseudoindikaanid on C₁₀-ühendid, mille ehituse aluseks on tsüklopentanopüranoidne tsükkel [9]. Sekoiridoidid sünteesitakse iridoididest, mille käigus tsüklopentaantsükkel süsinikuaatomite C₇ ja C₈ vahel avaneb (Joonis 5) [9].



Joonis 5. Tsüklopentaantsükli avamine süsinikuaatomite C₇ ja C₈ vahel

Iridoidid ja sekoiridoidid liigitakse kolme rühma: mitteglükosiidsed iridoidid, iridoidglükosiigid ja sekoiridoidglükosiigid [9]:

- Mitteglükosiidsed iridoidid
 - Mitteglükosiidsete iridoidide näiteks on iridodiaal ja valtraat.
- Iridoidglükosiigid
 - Iridoidglükosiidide rühma kuuluvad näiteks asperuloosid, lamiid, aukubiin, loganiin jt (Joonis 6).

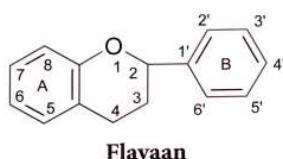


Joonis 6. Asperulosiidi ja aukubiini struktuuri skeemid

- Sekoiridoidglükosiigid
 - Sekoiridoidglükosiidide tähtsamateks esindajateks on sekologaniin ja gentiopikrosiid [9].

1.2.3. Flavonoidid

Flavonoidid kuuluvad taimedes väga laialt levinud fenoolsete ühendite ja nende glükosiidide rühma. Nende struktuuri aluseks on difenüülpropanituum C₆ – C₃ – C₆, täpsemalt 2-fenüülkromaan ehk flavaan (Joonis 7) [9].



Joonis 7. Flavonoidi struktuuri alus

Olenevalt omavahel kondenseerunud kolme tsüklise fragmendi ehitusest ja oksüdeerumisest jagatakse flavonoidid alarühmadesse:

- Katehhiinid (flavaan-3-oolid)
 - Katehhiiide struktuuris on kaks asümmeetrist süsinikuaatomit (C_2 ja C_3), mistõttu nad võivad esineda nelja isomeerina (D-katehhiiin, L-katehhiiin, D-epikatehhiiin, L-epikatehhiiin).
- Leukoantotsüanidiinid (proantotsüanidiinid, flavaan-3,4-dioolid)
 - Rühma tüüpiliseks esindajaks on leukotsüanidiin.
- Antotsüanidiinid
 - Enam levinud on tsüanidiini, pelargonidiini ja delfinidiini glükosiidid.
- Flavanoonid ja flavanonoolid
 - Flavanoonide esindajaks on naringeniin.
 - Flavanonoolide tüüpilisteks esindajateks on taksifoliin ja aromadendriin.
- Flavoonid ja flavonoolid
 - Tuntumad flavonoolid on kvertsetiin, kempferool, isoramnetiin, müritsetiin jt, glükosiididest eriti rutiiin (kvertsetiin-3-ramnoglükosiid), kvertsitriin (kvertsetiin-3-ramnosiid) jt.
 - Flavoonidest esineb taimedes sagedamini aglökoone apigeniini ja luteoliini, mis analoogoliselt flavonoolidega on taimedes esindatud paljude glükosiididena.
- Halkoonid ja dihydrohalkoonid
 - Tüüpilisteks halkoonideks on näiteks isolikviritigeniin.
 - Dihydrohalkoonidest on tuntumaid floretiin ja floridiini.
- Auroonid
- Isoflavoonid
 - Tuntumateks nendest on genistein ja daidseiin, samuti viimase metoksüleerunud derivaat formononetiin.
- Biflavanoidid [9]

Enamik flavonoide on tahked kristallilised ained, värvuselt kas kollased (flavoonid, flavonoolid, halkoonid, auroonid) või värvusetud (katehhiinid, leukoantotsüanidiinid, flavanoonid, isoflavoonid). Kollane värvus on intensiivsem suurema hüdroksülrühmade arvuga ühenditel [9].

1.3. Analüüsimeetodid

1.3.1. Bioaktiivide analüüsi meetodid

Bioaktiivsete ainete määramiseks kasutatakse erinevaid meetodeid. Tihti on kasutusel fotomeetria ja kromatograafia. Fotomeetria näited on fotoelektrokolorimeetria ja spektrofotomeetria. Fotoelektrokolorimeetria – meetod, mis määrab aine sisaldust optilise tiheduse alusel fotoelektrokolorimeetri abil [12][13]. Spektrofotomeetria – meetod, mis määrab aine sisaldust neeldumisspektri alusel [14][2]. Kromatograafia on ainete segu komponentideks lahustamise meetod. Kõige levinumad liigid on gaasi- (mobiilne faas on gaas) [15] ja kõrgsurvevedelikkromatograafia (mobiilne faas on vedelik) [16].

1.3.2. Värvusreaktsioonid

Värvusreaktsioone on mugav kasutada, kuna neid saab kiiresti ja lihtsalt teostada, lahused on stabiilsed ning on võimalik hinnata üld- ja kogusisalduseid. Vastavalt värvusreaktsioonile on võimalik hinnata mitmeid erinevaid ainerühmasid.

Iridoidide (täpsemalt iridoid-glükosiidide) määramiseks kasutatakse värvusreaktsiooni Trim-Hill reagendiga, mis annab lahusele sinise värvuse [2][17]. Trim-Hill reagent koosneb kontsentreeritud äädikhappest ja soolhappest, millele on lisatud väike hulk CuSO₄ vesilahust. Reaktsioon baseerub happe lagundamisel ja värviliste produktide moodustamisel. Iridoidide sisaldust määritati erinevatest taimedest näiteks Korea ravimtaimedest [18], India traditsioonilistes taimedest [19] ja *Plantago* liikides [20].

Polüfenoolide määramiseks kasutatakse värvusreaktsiooni Folin-Ciocalteu (F-C) reaktiiviga. Reaktiiv on fosfovolfrahmappe (H₃PW₁₂O₄₀) ja fosfomolibdeenhappe (H₃PMo₁₂O₄₀) segu, mis fenoolide oksüdeerimisel aluselistes tingimustes taandub ja moodustab sinise (PMoW₁₁O₄₀)⁴⁻ kompleksi [2][3]. Polüfenoolide sisalduse määramine F-C reagendiga on laialt levinud, seda on kasutatud hüdroksüürühmade hindamiseks erinevates viljades nagu paprika [21] ja granadill [22], erinevates jookides [23] ning ka ravimtaimedest [24].

Flavonoidide määramiseks kasutatakse näiteks värvusreaktsiooni AlCl₃ reagendiga, mis annab lahusele kollast värvust pärast [Al^{III}(flavonoid - H)₂]⁺ kompleksi moodustamist [2][25]. AlCl₃ reagendiga on määratud flavonoidide kogusisaldust erinevates ravimtaimedest [24] ja jookides nagu punane vein ja tee [26].

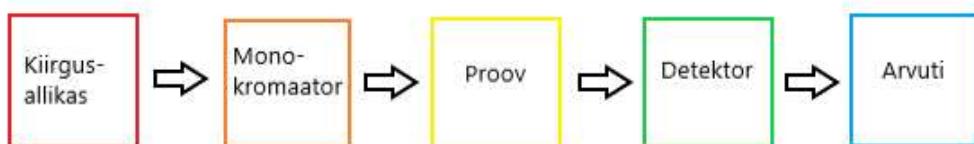
1.3.3. Spektrofotomeetria

Keemias on spektrofotomeetria füüsikalise-keemiline ainete uurimise meetod, mis tegeleb ainete neeldumisspektritega ultravioletti-, nähtava valguse ja infrapunktiirguse piirkonnas. Spektrofotomeetriliste mõõtmiste automatiseeritud instrumentide hulka kuuluvad spektrofotomeetrid, mis mõõdavad erinevate ühendite neelduvust ultravioletti-nähtavas (UV-Vis) või infrapunktiirguse (IR) vahemikus [27].

Käesolevas töös kasutati ühekiirelist UV-Vis spektrofotomeetrit, mis määrab vedeliku neelduvust ultravioletses (180-390 nm) ja nähtavas (390-780 nm) laineplikkuste vahemikus [28].

Spektrofotomeetri koostisosad (Joonis 8):

1. Kiirgusalikas (lamp või laser)
2. Monokromaator(id) või filter
3. Proov
4. Detektor



Joonis 8. Ühekiirelise UV-Vis spektrofotomeetri skeem

Meetod põhineb ultraviolett või nähtava elektromagnetkiirguse intensiivsuse muutumisel, kui see läbib lahust, mis on asetatud läbipaistvasse küvetti. Allikast väljuv valgus eraldatakse monokromaatoriga kitsasteks lainepekkusteks, lastakse proovi läbi ja mõõdetakse detektoriga[29]. Uuritava aine kontsentratsioon on lineaarses sõltuvuses neelduvusega. Neelduvuse määramine baseerub Beer' i (ka Bouguer-Lambert-Beer' i) seadusel [27].

$$A = \epsilon L c$$

Võrrand 1. Bouguer-Lambert- Beer' i seadus; A – neelduvus (ühikuta suurus), L – kihi paksus (cm), c – lahuse molaarne kontsentratsioon (mol L^{-1}), ϵ – neeldumistegur ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [27]

Kolorimeetrilisi reaktsioone kasutatakse laialdaselt UV-Vis spektrofotomeetrilise meetodiga, mida on lihtne ja kiire teostada ning rutiinses laborikasutuses kergesti rakendatav [14]. Peamised meetodi eelised ja puudused on toodud Tabelis 4.

Tabel 4. UV-Vis spektrofotomeetri eelised ja puudused

Eelised	Puudused
Mitte destruktiivne [30]	Ei ole selektiivne
On lihtne kasutada [30]	Valguse hajumine [30]
Suhteliselt odav [30]	Kalibreerimise vajadus
Mõõtmised saab teha kiiresti[30]	Sobiva lahjenduse leidmine võtab palju aega

2. Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärk oli erinevate madaraliikide üldfenoolide, flavonoidide ja iridoidide kogusisalduste võrdlus värvusreaktsioonide alusel.

Täpsemalt olid eesmärkideks:

- Määrrata üldfenoolide sisaldus neljas erinevas madaraliigis.
- Määrrata flavonoidide üldsisaldust neljas erinevas madaraliigis.
- Määrrata iridoidide kogusisaldust neljas erinevas madaraliigis.
- Määrrata ülalmainitud ainerühmade sisaldust erinevates lahustites.
- Võrrelda saadud tulemusi omavahel liigitri ning lahusti mõju.

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Kasutatud kemikaalid

Üldfenoolide sisalduse määramisel kasutati 2M Folin-Ciocalteu reagenti (fosfovölfraamhappe ($H_3PW_{12}O_{40}$) ja fosfomolibdeenhappe ($H_3PMo_{12}O_{40}$) segu, Sigma-Aldrich, Šveits), veevaba naatriumkarbonaati (Na_2CO_3 , Sigma-Aldrich, Saksamaa). Standardlahuste valmistamiseks kasutati gallushappe monohüdraati ($C_7H_6O_5 \cdot H_2O$, Sigma-Aldrich, Hiina) ja etanooli (EtOH, Sigma-Aldrich, Saksamaa, puhtus 96,7%) lahust.

Üldflavonoidide määramisel kasutati alumiiniumkloriidi ($AlCl_3$, Fluka, Šveits). Standardlahuste valmistamiseks kasutati kvartsetiini ($C_{15}H_{10}O_7$, Lachema/Chemapol, puhtus 99%) ja metanolli (MeOH, Honeywell, USA).

Iridoidide kogukontsentratsiooni määramiseks kasutati Trim-Hill reagenti, mis koosnes veevaba äädikhapet (CH_3COOH , Sigma-Aldrich, Saksamaa, puhtus 99,8%), 37%-st soolhapet (HCl, Honeywell/Fluka, Austria) ja vasksulfaat pentahüdraati ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, Sigma-Aldrich). Standardlahuste valmistamiseks kasutati asperulosiidi ($C_{18}H_{22}O_{11}$, MedChemExpress).

Lisaks kasutati ultrapuhast vett ($M\Omega \cdot cm \leq 18,2$, Millipore Corporation, USA) ning atsetooni (Honeywell, USA).

3.2. Kasutatud aparatuur

Proovide peenestamiseks kasutati kohviveskit (Bomann KSW 445 CB, Hiina). Proovide kaalumiseks oli kasutatud analüütiline kaal (Mettler Toledo AB207-S, Šveits) ning tehniline kaal (Mettler Toledo PB1502-S/FACT, Šveits). Ekstraheerimiseks kasutati ultrahelivanni (Bandelin Sonorex Digital 10 P, Saksamaa) ning loksutit (Orbital Shaker DOS-20M, Läti). Proovide tsentrifuugimiseks oli kasutusel tsentrifuug Hettich Zentrifugen EBA 200 S, Saksamaa.

Katsete läbiviimisel kasutati Varian Cary 50 Bio UV-Vis spektrofotomeetrit (Agilent Technologies, USA). Lisaks oli kasutatud 1,5 mL plastküvetid (NovaNatura, Itaalia) Folin-Ciocalteu reagendi jaoks, 1,5 mL plastküvetid (Plastibrand, Saksamaa) $AlCl_3$ reagendi jaoks ja 0,7 mL kvartsküvett (Hellma, Saksamaa) Trim-Hill reagendi jaoks.

3.3. Standardlahuste valmistamine

Üldfenoolide määramiseks kasutati standardlahustena gallushappe lahuseid erinevate kontsentratsioonidega. Selleks kaaluti analüütilise kaaluga mõõtekolbi vajalik kogus gallushappe monohüdraadi pulbrit ning lisati EtOH, et saadi kontsentratsioon 5000 mg/L. Edasi valmistati kalibratsiooniks 5000 mg/L gallushappe standardlahusest vajalikud 10; 25; 50; 75; 100 mg/L lahused EtOHs.

Flavonoidide määramiseks kasutati standardlahustena kvartsetiini lahuseid erinevate kontsentratsioonidega. Selleks kaaluti analüütilise kaaluga mõõtkolbi vajalik kogus kvartsetiini pulbrit ning lisati MeOH, et saada 2000 mg/L kontsentratsiooniga lahust. Edasi lajhendati seda

lahust 10 korda, et saada 200 mg/L kontsentratsiooniga lahus. Seejärel valmistati kalibratsiooniks 200 mg/L-sest kvartsetiini standardlahusest vajalikud 2; 5; 10; 20; 40 mg/L lahused MeOHs.

Iridoidide määramiseks kasutati standardlahustena asperulosiidi lahuseid erinevate kontsentratsioonidega. Kõigepealt pipeteeriti Eppendorfi vajalik kogus asperulosiidi lahust ning lisati sobivat lahustit, et oli kontsentratsioon 1000 mg/L. Edasi valmistati kalibratsiooniks 1000 mg/L standardlahusest vajalikud 100; 200; 400; 800; 1000 mg/L lahused proovile vastavas solvendis.

3.4. Taimne materjal ja proovi ettevalmistamine

Kasutusel oli nelja erineva madara kuivatatud taimne materjal (Joonis 9):

- Hobumadar (*Galium Verum*) (Kubja Ürditalu, Eesti) – terve taim
- Hobumadara ürt (*Galium Verum*) (OÜ NORMAN RAVIMTAIMED, Eesti) – õiene ürt
- Roomav madar (*Galium Aparine*) koduaiast (Saaremaa, Eesti)
- Tundmatu (Saaremaa) madar koduaiast (Saaremaa, Eestii)





Joonis 9. Erinevad töös kasutatud madarad, kus a – Saaremaa madar, b – roomav madar, c – hobumadara õiene ürt, d – hobumadara terve taim

Valmistati 50% (v/v) atsetooni, 50% (v/v) EtOH ja 80% (v/v) EtOH lahused taimse massi ekstraheerimiseks. Kõik madarad peenestati kohviveski abil ning kaaluti tehnilise kaaluga $1,00 \pm 0,05$ g. Seejärel lisati 20 ml sobivat lahustit (50% ats, 50% EtOH või 80% EtOH) ja asetati tops loksutile ning segati 30 minutit 250 rpm (põöret minutis) juures. Edasi töödeldi proovi ultrahelivannis 30 minutit (350 kHz), pärast tsentrifuugiti 10 minutit 8000 rpm juures ja eraldati supernatant uude topsi. Ekstraktsioonid taimsest materjalist tehti kolmes paralleelis, millest ühe valmistas töö autor.

Edasi valmistati proovid supernatandist sobiva lahjendusega, et tulemus jäeks kalibratsiooni vahemikku. Kui tulemus jäi vahemikust välja, siis valmistati uuesti vastavalt suurema või väiksema lahjendusega. Kui määriti üldfenoole, siis sobivad lahjendused olid: 15x (korda) 50% atsetooni ekstraktidel, 15x 50% EtOH ekstraktidel ning 10x 80% EtOH ekstraktide korral. Kui määriti üldflavonoide, siis sobivad lahjendused olid 10x iga lahusti kohta (ja kolme tüüpi *madara* kohta) ja 30x iga lahusti kohta (*G. Verum* õiese ürdi kohta). Kui määriti iridoide, siis sobivad lahjendused olid: 5x 50% ats ekstrakti puhul, 5x 50% EtOH ekstrakti korral ning 2x 80%EtOH ekstrakti korral.

3.5. Värvusreaktsioonide läbiviimine

Polüfenoolide määramiseks valmistati kümne kordne lahjendus (1:9 Folin-Ciocalteu reagent:ultrapuhas vesi, 1,2 M) ning 10% Na_2CO_3 (w/v) vesilahus, milleks kaaluti 10 g Na_2CO_3 , mis segati 100 mL destilleeritud veega ning kuumutati lahus keemiseni. Analüüsiks segati 1 ml lahjendatud Folin-Ciocalteu lahust ja 0,2 ml proovi/kalibratsioonilahust ja jäeti 5 min reageerima. Seejärel lisati 0,8 ml 10% Na_2CO_3 lahest ning jäeti reageerima toetemperatuuril 1 h pimedas, aegajalt segades. Tulemus mõõdeti spektrofotomeetriliselt 760 nm juures.

Valmistati 2% AlCl_3 lahus MeOHs tõmbekapi all. Flavonoidide määramiseks segati 2% AlCl_3 ja analüüsitav proov vahekorras 1:1, vastavalt 600 μL AlCl_3 ja 600 μL madarate ekstrakt/kalibratsioonilahus, jäeti 30 minutit reageerima toetemperatuuril pimedas. Tulemus mõõdeti spektrofotomeetriliselt 415 nm juures.

Iridoidide määramiseks valmistati Trim-Hilli reagent. Trim-Hilli reagendi koostises oli äädikhape, kontsentreeritud HCl ja 0,2% CuSO₄·5H₂O. Nimetatud ühendid segati vastavalt vahekorras 10:0.5:1. Analüüsiks segati valmistatud reagent ja analüüsitarv proov vahekorras 10:1 vastavalt (600 µL + 60 µL), asetati sooja veevanni ning jäeti 15 min reageerima. Tulemus mõõdeti spektrofotomeetriselt 609 nm juures.

Iga värvusreaktsiooni viidi läbi kolm korda (n=3) ning tulemused anti nende keskväärtusena (\bar{x}) ja arvutati standardhälve (SD) ja suhteline standardhälve (RSD) vastavalt valmitele:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n},$$

kus \bar{x} on keskmise väärustus, x_1 – esimese katse väärustus, x_2 – teise katse väärustus, n – katsete number

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_n - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} * 100\%$$

Lisaks arvutati tulemused ümber kasutatud kuivmassi peale vastavalt valemile:

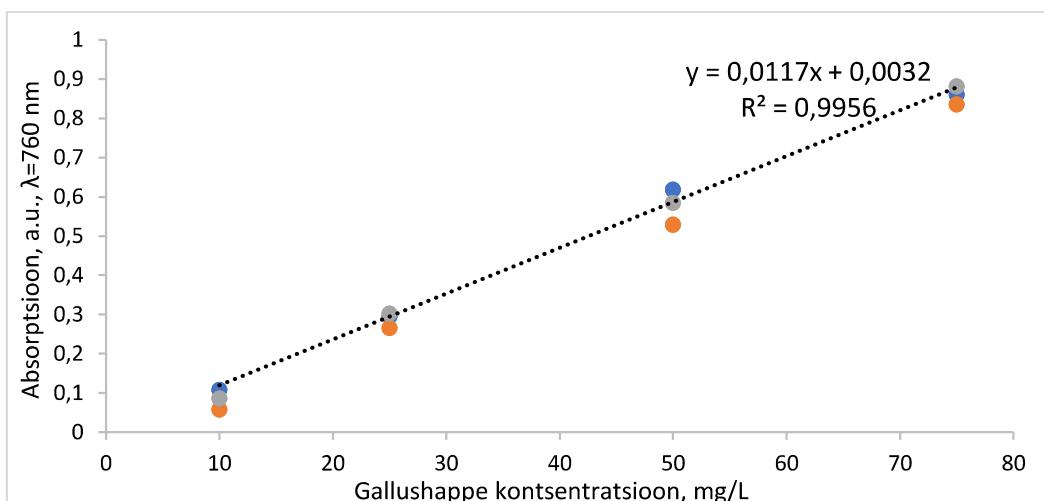
$$c \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{c \left(\frac{mg}{L} \right)}{0,02(L) * 1(g)},$$

kus c on kontsentratsioon.

4. Tulemused ja arutelu

4.1. Üldfenoolide sisaldus

Üldfenoolide määramiseks koostati kalibratsioonigraafikud F-C reaktsiooni alusel kasutades standardainena gallushapet. Üldfenoolide kalibratsioonigraafiku abil (Joonis 10) oli arvutatud üldfenoolide kogusisaldus erinevate madarate jaoks ja teisendatud mg GAE/g kuivaine peale.



Joonis 10. Kalibreerimisgraafik üldfenoolide jaoks

Tabelis 5 on toodud üldfenoolide sisaldus roomavas madaras erinevate lahustite jaoks. Roomavas madaras on fenoolide sisaldus 50% ats ja 50% EtOH ekstraktides sarnane – atsetoonis 16,0 mg GAE/g ja 50% EtOH 16,8 mg GAE/g. Lahustiga, milles etanolili kontsentratsioon oli suurem ehk 80% EtOH, oli ekstraheerimine halvem ning fenoolide sisaldus oli märgatavalalt väiksem.

Tabel 5. Üldfenoolide sisaldus roomavas madaras

Lahusti	Taim	Sisaldus, mg GAE/g	RSD, %
50% ats	Roomav madar	16,0 ± 1,3	7,8
50% EtOH		16,8 ± 1,3	7,4
80% EtOH		12,5 ± 0,7	5,7

Tabelis 6 on toodud Saaremaa tundmatu madara üldfenoolide sisaldus. Tabelist on näha, et Saaremaa madarale sobis köige rohkem 50% ats solvent, mis andis tulemuse 25,1 mg GAE/g. Teised solvendid andsid väiksemad tulemused, vastavalt 23,1 ja 17,6 mg GAE/g 50% EtOH ja 80% EtOH puhul.

Tabel 6. Üldfenoolide sisaldus Saaremaa madaras

Lahusti	Taim	Sisaldus, mg GAE/g	RSD, %
50% ats	Saaremaa madar	25,1 ± 0,8	3,0
50% EtOH		23,1 ± 0,5	2,1
80% EtOH		17,6 ± 0,5	3,0

Suurim üldfenoolide kogusisaldus oli terves hobumadaras (Tabel 7) 50% ats solvendi kasutamisel, mis oli 18,3 mg GAE/g, kuid samuti oli märgatav ka selle RSD 13%. Kui kasutati 50% EtOH, siis polüfenoolide sisaldus oli 16,8 mg GAE/g, aga ka selle RSD väärthus oli üle 12%. 80% EtOH sobis ekstraktsiooniks köige halvemini, kuna üldfenoolide sisalduseks saadi vähem kui 12 mg GAE/g.

Tabel 7. Üldfenoolide sisaldus terves hobumadaras

Lahusti	Taim	Sisaldus, mg GAE/g	RSD, %
50% ats	Hobumadar, terve	18,3 ± 2,3	12,5
50% EtOH		16,8 ± 2,0	12,1
80% EtOH		11,5 ± 0,6	4,9

Üldfenoolide ekstraktsioon hobumadara õitest (Tabel 8) on tundlik solventide suhtes. Sisalduse väärthus 50% ats korral oli 27,2 mg GAE/g, 50% EtOH puhul 20,7 mg GAE/g ning 14,8 mg GAE/g 80% EtOH kasutamisel. 80% EtOH andis mitte ainult väiksem sisaldus, vaid ka suurim RSD, mis oli suurem kui 20%.

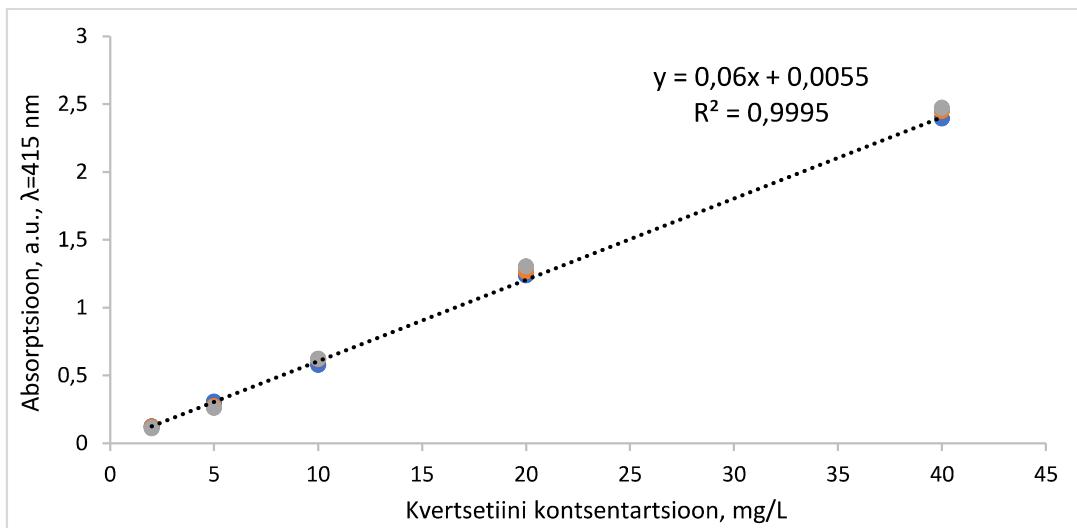
Tabel 8. Üldfenoolide sisaldus hobumadara õites

Lahusti	Taim	Sisaldus, mg GAE/g	RSD, %
50% ats	Hobumadar, õis	27,2 ± 1,5	5,5
50% EtOH		20,7 ± 1,4	6,7
80% EtOH		14,8 ± 3,4	22,9

Tulemuste põhjal saab järelleadata, et 50% atsetoon sobib rohkem üldfenoolide ekstraheerimiseks, sest katsed selle lahustiga andsid paremaid tulemusi. 80% etanooli lahustiga saadi halvimaid väärthusi. Võrreldes kõiki tulemusi, üldine sisaldus varieerub 11 ja 27 mg GAE/g vahel erinevates madarates. Kirjanduse alusel üldfenoolide sisaldus hobumadaras varieerub 2,44 mg ja 86 mg GAE/g vahel [2][31][1] ning 1,3 ja 111 mg GAE/g vahel võõrastes madarates [2][8], mis on väga suur vahemik. Sellest saab järelleadata, et on oluline mis madar see on, kus ta kasvatatakse ja millal oli kogutud.

4.2. Flavonoidide kogusisaldus

Flavonoidide määramiseks koostati kalibratsioonigraafikud AlCl_3 reaktsiooni alusel kasutades standardainena kvertsetiini. Flavoniodide kalibratsioonigraafiku abil (Joonis 11) oli arvutatud flavonoidide kogusisaldus erinevate madarate jaoks ja teisendatud mg QE/g kuivaine kohta.



Joonis 11. Kalibreerimisgraafik flavonoidide jaoks

Roomavas madaras (Tabel 9) ei ületanud flavonoidide kogusisaldus 3 mg QE/g ning kõige suurema kontsentraatsiooniga tulemisi saadi 80% EtOH lahustiga, milleks oli 2,6 mg QE/g. 50% ats ja 50% EtOH solventidega saadi ühesugused tulemused, milleks oli 2,1 mg QE/g.

Tabel 9. Flavonoidide kogusisaldus roomavas madaras

Lahusti	Taim	Sisaldus, mg QE/g	RSD, %
50% ats	Roomav madar	2,1 ± 0,2	9,4
50% EtOH		2,1 ± 0,03	1,6
80% EtOH		2,6 ± 0,1	3,5

Saaremaa madaras (Tabel 10) oli flavonoidide üldsisaldus umbes 3 mg QE/g iga lahusti korral. Sellest võib järelleda, et solvendil ei olnud erilist mõju flavonoidide ekstraheerimisel. Samuti oli RSD vääratus kõigil tulemustel alla 9%.

Tabel 10. Flavonoidide kogusisaldus Saaremaa madaras

Lahusti	Taim	Sisaldus, mg QE/g	RSD, %
50% ats	Saaremaa madar	2,9 ± 0,2	6,9
50% EtOH		3,0 ± 0,3	8,7
80% EtOH		3,0 ± 0,2	7,9

Tabelis 11 on toodud tulemused terve hobumadara kohta. Flavanoidide sisaldus oli suurim 50% ats lahustiga, mis andis tulemuseks 2,8 mg QE/g. 50% ja 80% EtOH korral saadi ühesugused tulemused (2,6 mg QE/g), aga 80% EtOH kasutamisel oli RSD üle 26%.

Tabel 11. Flavonoidide kogusisaldus terves hobumadaras

Lahusti	Taim	Sisaldus, mg QE/g	RSD, %
50% ats	Hobumadar, terve	2,8 ± 0,3	10,2
50% EtOH		2,6 ± 0,1	3,9
80% EtOH		2,6 ± 0,7	26,2

Tabelis 12 on toodud tulemused hobumadara õite kohta. 80% EtOH saadi väiksem flavonoidide sisaldus (4,6 mg QE/g) ja kõige suurem RSD, mis ületas 30%. Natuke suurem sisaldus oli 50% EtOH kasutamisel (5,6 mg QE/g) ja kõige parem tulemus saadi 50% ats korral, mis oli üle 7 mg QE/g.

Tabel 12. Flavonoidide kogusisaldus hobumadara õites

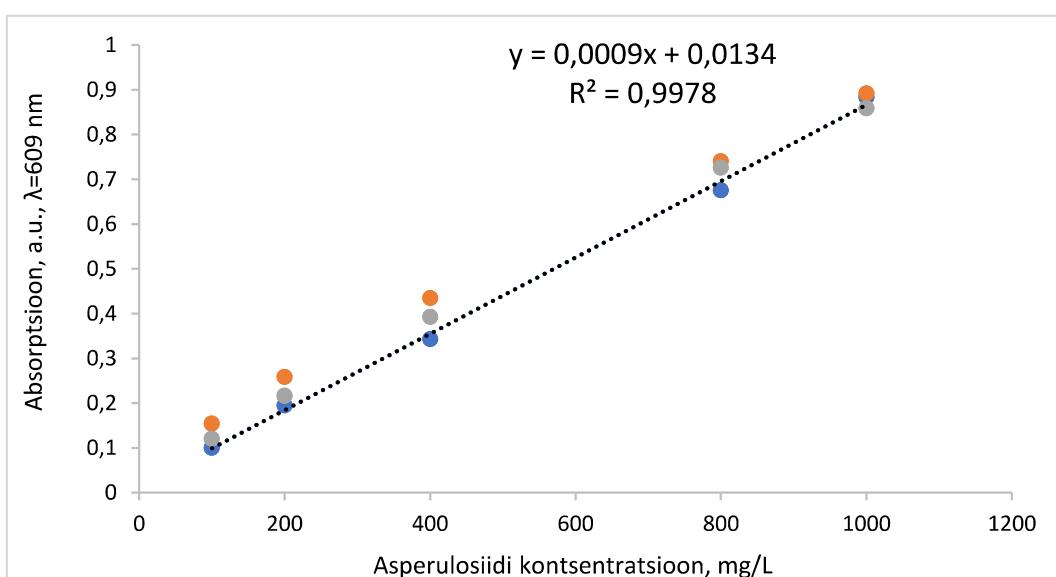
Lahusti	Taim	Sisaldus, mg QE/g	RSD, %
50% ats	Hobumadar, õis	7,3 ± 0,5	7,4
50% EtOH		5,6 ± 0,5	8,2
80% EtOH		4,6 ± 1,4	31,7

Tulemustest saab järelledaa, et kõikides kasutatud madarates välja arvatud hobumadara õites, kus oli flavonoidide kogusisaldus umbes 3 mg QE/g. Hobumadara õites varieerub kontsentratsioon 4 ja 7 mg QE/g vahel. Kirjanduses varieerub flavonoidide üldsisaldus erinevates madarates 2 ja 23 mg QE/g vahel [2] ning 20 ja 70 mg rutiini ekvivalentis/g kuivmassi kohta [8]. On näha, et sisaldus rutiini ekvivalentis on suurem kui QE, sellest järeltub, et erinevate ekvivalentide kasutamisel muutub ka sisalduse väärust.

Mis lahusti sobiks flavonoidide ekstraheerimiseks kõige paremini, ei saa üheselt öelda. Ekstraheerimiseks roomavast madarast sobib kõige rohkem 80% EtOH, Saaremaa madarast 50% EtOH ning hobumadarast 50% atsetoon.

4.3. Iridoidide üldsisaldus

Iridoidide määramiseks koostati kalibratsioonigraafikud Trim-Hill reaktsiooni alusel kasutades standardainena asperulosiidi. Iridoidide kalibratsioonigraafiku abil (Joonis 12) oli arvutatud iridoidide kogusisaldus erinevate madarate jaoks ja teisendatud mg AE/g kuivaine peale. Üldiselt kasutatakse ekvivalentina aukubiini, aga selles töös kasutati asperulosiidi, kuna see on madaratele omane iridoidglükosiid.



Joonis 12. Kalibreerimisgraafik iridoidide jaoks

Tabelist 13 on näha iridoidide kogusisaldust roomavas madaras, mille väärtsused varieeruvad 14-20 mg AE/g vahel. Kõige suurema ja väiksema kontsentratsiooniga tulemused saadi vastavalt 50% EtOH ja 50% ats lahustitega.

Tabel 13. Iridoidide kogusisaldus roomavas madaras

Lahusti	Taim	Sisaldus, mg AE/g	RSD, %
50% ats	Roomav madar	13,9 ± 1,2	8,7
50% EtOH		20,3 ± 0,4	1,9
80% EtOH		15,2 ± 0,2	1,4

Tabelis 14 on toodud iridoidide sisaldused Saaremaa madaras erinevate solventide korral, mille väärtsused varieeruvad 20-22 mg AE/g vahel. Kõige suurem iridoidide sisaldus saadi 50% EtOH lahustiga (21,8 mg QE/g). Kõige väiksem tulemus oli 80% EtOH kasutamisel, mis andis väärtsuseks 20,6 mg AE/g, samuti oli nimetatud solvendis suurim RSD, üle 15%.

Tabel 14. Iridoidide kogusisaldus madaras Saaremaalt

Lahusti	Taim	Sisaldus, mg AE/g	RSD, %
50% ats	Saaremaa madar	20,6 ± 0,7	3,2
50% EtOH		21,8 ± 0,9	4,3
80% EtOH		19,8 ± 3,0	15,1

Terve hobumadaraga katsete tulemused on toodud tabelis 15. Iridoidide kogusisaldus oli vahemikus 17-23 mg AE/g, kõige sobivam lahusti oli 50% EtOH. Väikseim tulemus (17,4 mg AE/g) saadi kasutades 80% EtOH, mille standardhälve oli üle 15%. 50% ats kasutamisel saadi keskmise tulemus ning ka selle RSD oli suurem kui 15%.

Tabel 15. Iridoidide kogusisaldus terves hobumadaras

Lahusti	Taim	Sisaldus, mg AE/g	RSD, %
50% ats	Hobumadar, terve	19,1 ± 3,0	15,6
50% EtOH		22,7 ± 1,6	7,2
80% EtOH		17,4 ± 2,6	15,2

Iridoidide sisaldus hobumadara õites (Tabel 16) oli kõigi solventidega suurem kui 20 mg AE/g. Kõige suurem sisaldus, mis oli 40,8 mg AE/g, saadi 50% ats kasutamisel. Kõige väiksem iridoidide kontsentratsioon, mis oli 27,2 mg AE/g, saadi 80% EtOH kasutamisel, kuid saadud tulemuse RSD oli suurem kui 20%.

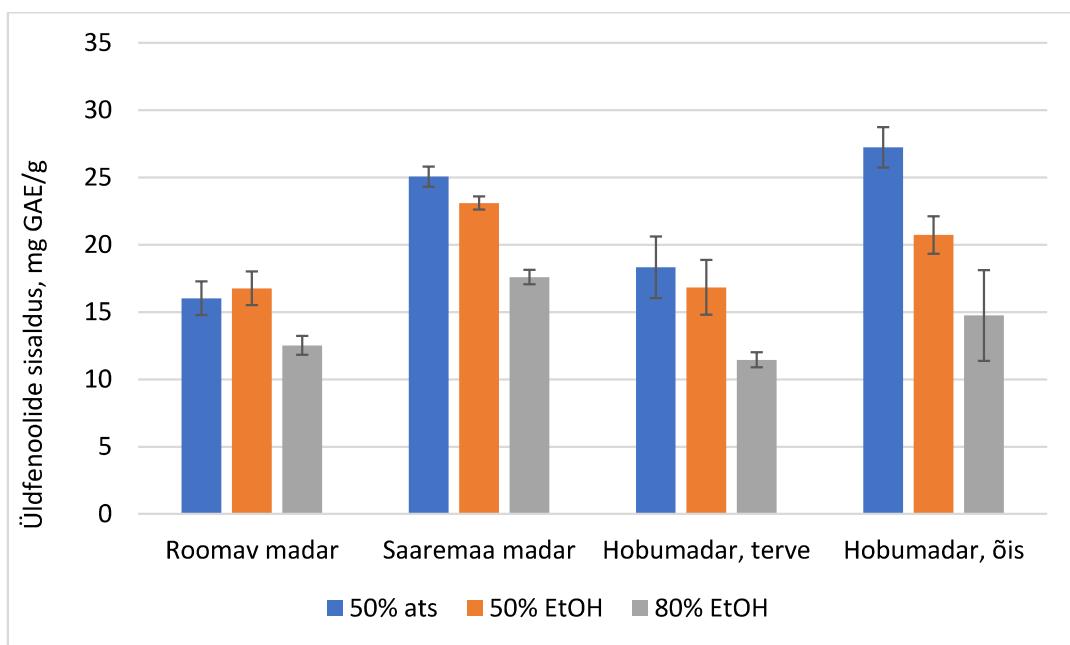
Tabel 16. Iridoidide kogusisaldus hobumadara õites

Lahusti	Taim	Sisaldus, mg AE/g	RSD, %
50% ats	Hobumadar, õis	40,8 ± 2,9	7,1
50% EtOH		36,6 ± 2,2	6,0
80% EtOH		27,2 ± 5,6	20,6

Tulemuste alusel saab öelda, et iridoidide sisaldus oli tervetes taimedes oli sarnane, umbes 20 mg AE/g. Õites saadud üldsisaldus varieerus 27-40 mg AE/g vahel. Katsed 80% EtOH lahustiga andsid suure suhtelise standardhälve, mis ületas 15% kolme taime korral, vihjates iridoidide ebaühtlasele ekstraheerimisele nimetatud solvendiga. Kirjanduses varieeruvad iridoidide sisalduse väärtsused 59 ja 461 mg aukubiini ekvivalenti/g vahel [2]. Sellest võib järelleada, et lõppsisalduste väärtsused muutuvad kui kasutada erinevaid ekvivalentainet ning neid omavahel võrrelda ei tasu.

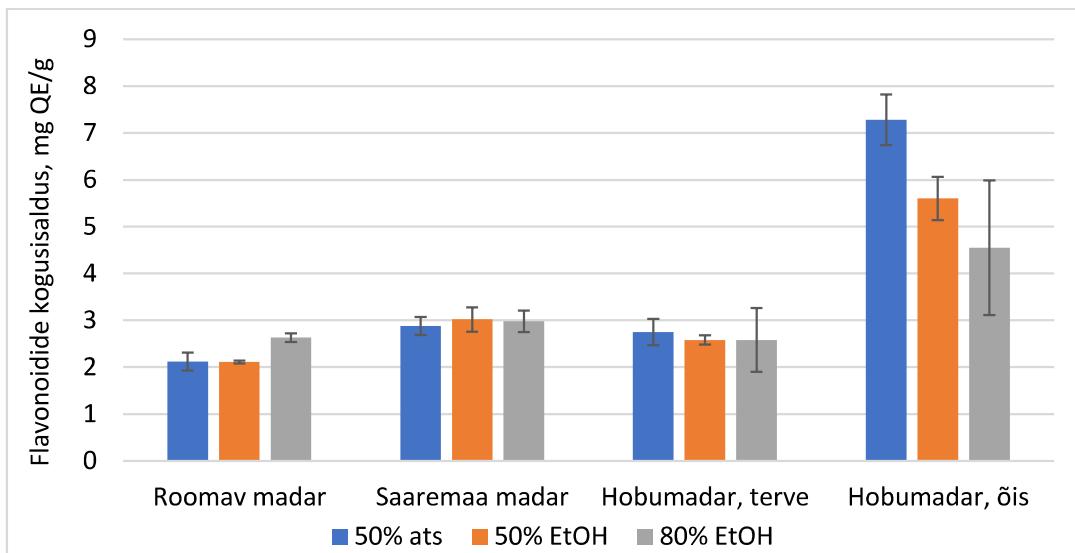
4.4. Liikide vaheline võrdlus

Kui võrrelda üldfenoolide sisaldust erinevates madarates (Joonis 13), siis on näha, et Saaremaa madar ja hobumadara õied on rikkama sisaldusega kui roomav ja terve hobumadar. Hobumadara õites on sisaldus 15-27 mg ja Saaremaa madaras 17-25 mg. Veel on märgata tendentsi, et üldfenoolid eelistavad 50% atsetooni lahustit ning kõige vähem ekstraheeruvad 80% EtOH kasutamisel. Kui vaadata hobumadarat, siis õites on suurem üldfenoolide sisaldus kui terves taimes. Sellest võib järelleada, et on hobumadar heterogeenne taim ja suurem osa üldfenoolidest asub õites.



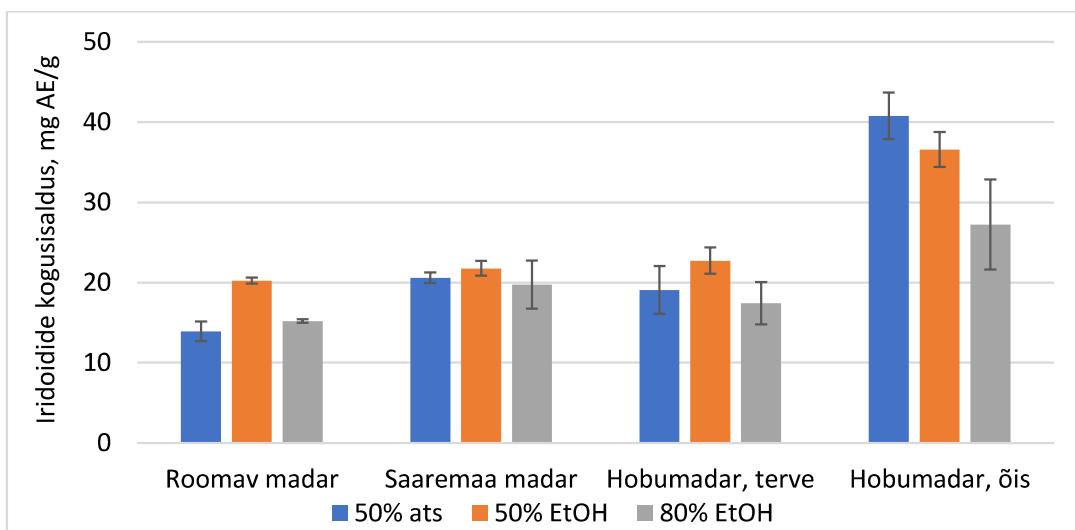
Joonis 13. Üldfenoolide sisalduse võrdlus erinevates madarates

Joonisel 14 on toodud flavonoidide kogusisalduse võrdlus. Jooniselt on hästi näha, et hobumadara õied sisaldavad kõige rohkem flavonoide. Roomava, Saaremaa ja hobumadara keskmise flavonoidide koguväärtus jäi 2-3 mg QE/g vahele, kuid hobumadara õites oli see kaks korda kõrgem, 4,6-7,3 mg QE/g. Roomav madar, Saaremaa madar ja terve hobumadar andsid enam-vähem samasuguselt tulemused kõikide solvendidga. Hobumadara õitest ekstraheerusid flavonoidid kõige paremini 50% atsetooniga, edasi 50% EtOH ja kõige vähem 80% EtOH kasutades. Võrreldes teiste madaratega oli ka RSD kõige suurem hobumadara õite ekstraheerimisel, kus suurimaks väärtsuseks oli üle 31%.



Joonis 14. Flavonoidide sisalduse võrdlus erinevates madarates

Sarnaselt flavonoidide sisaldusega, oli kõige suurem iridoidide kogusisaldus hobumadara õites ning sobivaim solvent oli 50% ats õite jaoks ja 50% EtOH tervete madarate jaoks (Joonis 15). Kõige iridoidide vaesem taim nende hulgast oli roomav madar, mille keskmne sisaldus jäi 16,5 mg AE/g solventide keskmisena, kui hobumadara õie korral oli see 34,8 mg AE/g.



Joonis 15. Iridoidide sisalduse võrdlus erinevates madarates

Nendest kolmest joonisest saab järelledaa, et hobumadara õied sisaldasid kõiki kolme ainerühma suuremas proportsioonis kui teised uuritud madarad. Samuti võib sellest omakorda järelledaa, et suurem osa bioaktiivsetest ainetest asus madarate õites. Üldfenoolide sisaldus oli sarnases suurusjärgus iridoidide kogusisaldusega kolmes madaras - roomav, Saaremaa ja terve hobumadar – mis varieerub 20 mg ekvivalendi/g ümber. Flavonoidide üldsisaldus oli palju väiksem kõikides madarates võrreldes üldfenoolidega, mis on loogiline, kuna nad kuulavad üldfenoolide rühma alla.

Tulemused näitavad, et kõige rohkem oli üldfenoole võimalik ekstraheerida Saaremaa madarast või hobumadara õitest 50% ats solvendiga ning flavonoide ja iridoide sai maksimaalselt ekstraheerida hobumadara õitest 50% ats solvendiga.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli määrata bioaktiivseid ühendid (üldfenoolid, flavonoidid ja iridoidid), erinevatest Eestis kasvanud madaratest kasutades spektrofotomeetritlist meetodit värvusreaktsioonide alusel ja võrrelda saadud ainerühmade sisaldust sõltuvalt taimest ja kasutatud solvendist. Nende määramine on oluline, kuna nad mõjuvad kasulikult inimese kehale. Üldfenoolide, flavonoidide ja iridoidide kogusisalduste määramiseks kasutati vastavalt Folin-Ciocalteu reaktiivi, AlCl_3 reaktiivi ja Trim-Hill reaktiivi. Taimedest kasutati roomavat madarat, Saaremaa madarat, tervet hobumadarat ja hobumadara õisi.

Kõikides madarates jäid üldfenoolide sisaldused 11 ja 27 mg GAE/g vahemikku, flavonoidide kogusisaldused 3 ja 7 mg QE/g vahemikku ning iridoidide kogusisaldused varieerusid 20-40 mg AE/g vahel. Kõige suurema saagisega oli võimalik ekstraheerida üldfenoole, flavonoide ja iridoide 50% atsetooni või 50% EtOH kasutades.

Hobumadara õites leidus kõige rohkem määratud bioaktiivseid ühendeid. Selle põhjal tasub edasistes uuringutes pigem kasutada madarate õisi, mitte tervet taime, kui soovitakse saada suurim kontsentratsioon ühendeid. Samas tuleb meeles pidada, et õite või ebasobiva solvendi kasutamisel võib suhteline standardhälve olla rohkem kui 20%.

Saadud tulemused langesid üldiselt kokku kirjanduses toodud väärustega, kuid vastavalt ainerühmale olid kirjanduses saadud vahemikud üsna suured. Sellest võib järeladata, et taimede metabolism on väga tundlik ning bioaktiivsete ainete sisaldust võivad mõjutada mitmesugused tegurid nagu taime kogumise aastaaeg või toitainete sisaldus mullas. Tähelepanu tasub pöörata ka ekvivalentainetele, kuna tulemused sõltuvad märgatavalta kasutatud ühendist.

Spektrofotomeetriline meetod värvusreaktsioonide alusel on hea meetod, et kiiresti määrata ligikaudseid bioaktiivsete ainete sisaldusi. See meetod on mugav kui on vaja hinnata bioaktiivsete ühendite olemasolu taimedes.

Abstract

The purpose of this work was to determine and compare the total concentration of bioactive compounds such as total phenols, flavonoids and iridoids, using a spectrophotometric method based on colorimetric analysis. Determinations of total phenolic, flavonoid and iridoid content were done using the Folin-Ciocalteu reagent, AlCl₃ reagent and Trim-Hill reagent, respectively. The plants used in this work were *Galium Aparine*, an unknown *Galium* from Saaremaa, *Galium Verum* (entire plant and blossoms) of the *Rubiaceae* species.

In all of the madders, the total phenolic content ranged from 11 to 27 mg GAE/g, the flavonoid content ranged from 3 to 7 mg QE/g, and the iridoid content ranged from 20 to 40 mg AE/g. The highest recoveries for total phenols, flavonoids and iridoids were in 50% acetone or 50% ethanol.

G. Verum blossoms contained the most bioactive compounds overall. It demonstrates that in further studies it would be better to use the blossoms rather than the entire plant to achieve the highest concentration of the compounds. However, it should be borne in mind that when using blossoms or an unsuitable solvent, the relative standard deviation may be more than 20%.

The obtained results coincided with the literature concentration ranges, although the ranges were dependant on the bioactive compound class. From this it can be concluded that plants are very sensitive and the content of bioactive substances can be influenced by various factors such as the season at which the plant was collected or the content of nutrients in the soil. Attention should also be placed on the substances used as equivalents as they greatly impact the results obtained.

The spectrophotometric method, which is based on colorimetric analysis, is a good method for rapidly determining the approximate content of various bioactive substances. This method is convenient when it is necessary to find the presence of bioactive compounds in plants.

Tänuavaldused

Töö autor avaldab tänu oma juhendajale abi eest töö kirjutamisel, katsete läbiviimisel ja keele korrektuuril.

Kasutatud kirjandus

- [1] A. Mocan *et al.*, "Liquid Phase and Microwave-Assisted Extractions for Multicomponent Phenolic Pattern Determination of Five Romanian Galium Species Coupled with Bioassays," *Molecules*, 2019.
- [2] M. Friščić, M. Š. Baglama, M. Milović, K. H. Pilepić, and Ž. Maleš, "Content of Bioactive Constituents and Antioxidant Potential of Galium L. Species," *Croat. Chem. Acta*, 2018.
- [3] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, "Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent," *Methods Enzymol.*, vol. 299, 1999.
- [4] T. Kukk, *Eesti taimede kukeabits*. Tallinn: Varrak, 2004.
- [5] J. Bradic, A. Petkovic, and M. Tomovic, "Phytochemical and Pharmacological Properties of Some Species of the Genus Galium L. (Galium verum and mollugo)," *Sciendo*, 2017.
- [6] A. Raal, "Madar: roomav madar ehk virn," *Maailma ravimtaiemed entsüklopeedia*. Eesti Entsüklopeediakirjastus, p. 380, 2010.
- [7] M. Värva, *Meie ravimtaiimed*. Tartu: Elmatar, 2010.
- [8] L. VLASE, A. MOCAN, D. HANGANU, D. BENEDEC, A. GHELDIU, and G. CRIŞAN, "COMPARATIVE STUDY OF POLYPHENOLIC CONTENT, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF FOUR GALIUM SPECIES (RUBIACEAE)," *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, 2014.
- [9] A. Raal, *Farmakognoosia*. Tartu Ülikooli Kirjastus, 2010.
- [10] L. Đurđević, G. Gajić, S. Jarić, O. Kostić, M. Mitrović, and P. Pavlović, "Analysis of benzoic and cinnamic acid derivatives of some medicinal plants in Serbia," *Arch. Biol. Sci.*, 2013.
- [11] M. R. Olthof, P. C. H. Hollman, and M. B. Katan, "Human Nutrition and Metabolism Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans 1," 2001.
- [12] N. V. Barakova, N. N. Skvortsova, and N. Y. Sharova, "Extraction of biologically active compounds from fruit, berry and grain Grist using ViscoStar 150L enzyme complex," *Agron. Res.*, 2016.
- [13] T. Evstigneeva, N. Skvortsova, and R. Yakovleva, "The application of green tea Extract as a source of antioxidants in the processing of dairy products," *Agron. Res.*, 2016.
- [14] A. Blainski, G. C. Lopes, and J. C. Pallazzo de Mello, "Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Limonium Brasiliense L.," *Molecules*, 2013.
- [15] Y. Nolvachai and P. J. Marriott, "GC for flavonoids analysis: Past, current, and prospective trends," *J. Sep. Sci.*, 2012.
- [16] S. Y. Shi *et al.*, "Coupling HPLC to on-line, post-column (bio)chemical assays for high-resolution screening of bioactive compounds from complex mixtures," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 28, no. 7, pp. 865–877, 2009, doi: 10.1016/j.trac.2009.03.009.
- [17] A. R. Trim and R. Hill, "The preparation and properties of aucubin, asperuloside and some related glycosides," *Biochem. J.*, 1951.
- [18] H.-J. Chi, H.-S. Kim, and S.-Y. Lee, "Iridoid-containing Korean Medicinal Plants (I)," *Korean J. Pharmacogn.*, 1981.
- [19] D. Rathee, P. Rathee, S. Rathee, and D. Rathee, "Phytochemical screening and antimicrobial activity of Picrorrhiza kurroa, an Indian traditional plant used to treat chronic diarrhea," *Arab. J. Chem.*, vol. 9, pp. S1307–S1313, Nov. 2016, doi: 10.1016/J.ARABJC.2012.02.009.
- [20] T. Janković *et al.*, "Comparative study of some polyphenols in Plantago species," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 42, pp. 69–74, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.BSE.2012.02.013.
- [21] K. L. Bajaj and G. Kaur, "Colorimetric Determination of Capsaicin in Capsicum Fruits With the Folin-Ciocalteu Reagent."
- [22] J. C. Carmona-Hernandez, G. Taborda-Ocampo, and C. H. González-Correa, "Folin-Ciocalteu

- Reaction Alternatives for Higher Polyphenol Quantitation in Colombian Passion Fruits," 2021, doi: 10.1155/2021/8871301.
- [23] L. M. Äs Magalha, M. A. Segundo, S. Reis, J. L. Ä F C Lima, and A. O. Ä Nio S S Rangel, "Automatic Method for the Determination of Folin–Ciocalteu Reducing Capacity in Food Products," 2006, doi: 10.1021/jf060324s.
 - [24] M. Atanassova, S. Georgieva, and K. Ivancheva, "TOTAL PHENOLIC AND TOTAL FLAVONOID CONTENTS, ANTIOXIDANT CAPACITY AND BIOLOGICAL CONTAMINANTS IN MEDICINAL HERBS," *J. Univ. Chem. Technol. Metall.*, 2011.
 - [25] J. Zhang, J. Wang, and J. S. Brodbelt, "Characterization of flavonoids by aluminum complexation and collisionally activated dissociation," *J. MASS Spectrom.*, 2004.
 - [26] L. M. Magalhães, M. Inês, G. S. Almeida, L. Barreiros, S. Reis, and M. A. Segundo, "Automatic Aluminum Chloride Method for Routine Estimation of Total Flavonoids in Red Wines and Teas," doi: 10.1007/s12161-011-9278-1.
 - [27] V. Punger and L. Grigorieva, *ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ*. Jõhvi: SA INNOVE, 2012.
 - [28] P. J. Worsfold, "SPECTROPHOTOMETRY | Overview," *Encycl. Anal. Sci. Second Ed.*, pp. 318–321, Jan. 2005, doi: 10.1016/B0-12-369397-7/00714-7.
 - [29] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 8th ed. New York: W. H. Freeman and Company.
 - [30] J. Tom, "UV-Vis Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Applications," *Technol. Networks*, 2021.
 - [31] N. S. Lakić, N. M. Mimica-Dukić, J. M. Isak, and B. N. Božin, "Antioxidant properties of Galium verum L. (Rubiaceae) extracts," *Cent. Eur. J. Biol.*, 2010.

Lihtlitsents lõputöö reproduutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Regina Drošnova

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose "Erinevate madaraliikide (Rubiaceae) üldfenoolide, flavonoidide ja iridoidide kogusisalduste võrdlus värvusreaktsioonide alusel",

mille juhendaja on Piret Saar-Reismaa,

1.1 reproduutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jääävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

19.05.2022

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reproduutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaks määratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reproduutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2., siis lihtlitsents nimetatud tähtaaja jooksul ei kehti.