

**AHTALEHISES PÕRDAKANEPIS (*EPILOBIUM ANGUSTIFOLIUM*)
SISALDUVATE FÜTOKEMIKAALIDE EKSTRAKTSIOON JA
ISELOOMUSTAMINE**

Magistritöö

Üliõpilane: Kristin Düüna, 221618YASM

Juhendaja: Piia Jõul, teadur,

Tallinna Tehnikaülikool, Keemia ja biotehnoloogia instituut

Kaasjuhendaja: Merike Vaher, juhtivteadur,

Tallinna Tehnikaülikool, Keemia ja biotehnoloogia instituut

Õppekava: Rakenduskeemia ja biotehnoloogia

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: Kristin Düüna

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Piia Jõul

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Ott Scheler

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Lühendite loetelu.....	5
Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1 Ahtalehine põdrakanep.....	7
1.2 Fütokemikaalid.....	8
1.2.1 Lenduvad ühendid.....	8
1.2.2 Polüfenoolid.....	9
1.2.3 Antioksidatiivsus.....	10
1.3 Proovi ettevalmistus.....	10
1.3.1 Tahkefaasi mikroekstraktsioon.....	11
1.3.2 Ultraheli ekstraktsioon.....	12
1.3.3 Hüdrodestillatsioon.....	13
1.4 Analüüsimeetodid.....	13
1.4.1 Gaasikromatograafia-massispektromeetria.....	14
1.4.2 Kolorimeetriline analüüs.....	15
1.4.3 Kapillaarelektroforees.....	16
2. Töö eesmärgid.....	19
3. Eksperimentaalne osa.....	20
3.1 Kasutatud ained ja materjalid.....	20
3.2 Kasutatud aparaat.....	20
3.3 Taimematerjali ettevalmistus.....	21
3.4 Lenduvate ühendite analüüs.....	21
3.4.1 Tahkefaasi mikroekstraktsioon koos gaasikromatograafia-massispektromeetriaga..	21
3.4.2 Hüdrodestillatsioon.....	22
3.5 Mittelenduvate ühendite analüüs.....	22
3.5.1 Taimeekstraktide valmistamine.....	22
3.5.2 Kolorimeetriline analüüs.....	22
3.5.3 Kapillaarelektroforees.....	23
4. Tulemused ja arutelu.....	24
4.1 Taimematerjali iseloomustus.....	24

4.2	Lenduvate ühendite analüüs	24
4.2.1	Tahkefaasi mikroekstraktsiooni tulemused.....	25
4.2.1.1	Ekstraktsioonisorbentide võrdlus	25
4.2.1.2	Ekstraktsioon polüdimetüüsiloksaan-divinüülbenseen sorbendiga	26
4.2.2	Hüdrodestillatsiooni tulemused	29
4.3	Mittelenduvate ühendite analüüs	30
4.3.1	Kolorimeetrilise analüüsi tulemused	30
4.3.2	Kapillaarelektroforeesi tulemused.....	31
	Kokkuvõte.....	34
	Abstract	35
	Tänuavaldused.....	36
	Annotatsioon	37
	Kasutatud kirjandus	38
	LISAD	43
	Lisa 1. Lenduvad ühendid DVB-CAR-PDMS sorbendiga	43
	Lisa 2. Lenduvad ühendid CAR-PDMS sorbendiga	44
	Lisa 3. Lenduvad ühendid PDMS-DVB sorbendiga	45
	Lisa 4. Analüüsitud polüfenoolsete ühendite neeldumisspektrid	46
	Lisa 5. Analüüsitud polüfenoolsete ühendite struktuurid	47

Lühendite loetelu

Lühend	Inglise keeles	Eesti keeles
BGE	<i>Background electrolyte</i>	taustelektrolüüt
CAR	<i>Carboxen</i>	karbokseen
CE	<i>Capillary electrophoresis</i>	kapillaarelektroforees
DVB	<i>Divinylbenzene</i>	divinüülbenseen
DW	<i>Dry weight</i>	kuivmass
EOF	<i>Electroosmotic flow</i>	elektroendosmoos
F-C	<i>Folin–Ciocalteu method</i>	Folin–Ciocalteu meetod
GAE	<i>Gallic acid equivalent</i>	gallushappe ekvivalent
GC	<i>Gas chromatography</i>	gaasikromatograafia
HD	<i>Hydrodistillation</i>	hüdrodestillatsioon
HS	<i>Headspace</i>	gaasifaas proovi kohal
LoD	<i>Limit of detection</i>	avastamis- ehk detekteerimispiir
LoQ	<i>Limit of quantitation</i>	määramis- ehk kvantifitseerimispiir
MS	<i>Mass spectrometry</i>	massispektromeetria
m/z	<i>Mass-to-charge ratio</i>	massi/laengu suhe
PA	<i>Polyacrylate</i>	polüakrülaat
PDMS	<i>Polydimethylsiloxane</i>	polüdimetüülsiloksaan
PEG	<i>Polyethylene glycol</i>	polüetüleenglükool
QE	<i>Quercetin equivalent</i>	kvertsetiini ekvivalent
S/N	<i>Signal-to-noise ratio</i>	signaali/müra suhe
SPME	<i>Solid phase microextraction</i>	tahkefaasi mikroekstraktsioon
UV	<i>Ultraviolet</i>	ultravioletne
Vis	<i>Visible light</i>	nähtav valgus

Sissejuhatus

Taimi on aegade jooksul kasutatud mitmete tervisehädade leevendamiseks. Tänapäeval on tehtud kindlaks, et nende kasulikud omadused tulenevad sisalduvatest bioaktiivsetest ühenditest ehk fütokemikaalidest, millel on leitud antioksidatiivseid, antimikroobseid, põletikuvastaseid ja muid kasulikke omadusi. Fütokemikaalidest eristatakse lenduvaid ühendeid, nagu näiteks terpeenid ja fenüülpropanoidid, ning mittelenduvaid, millest suurema hulga moodustavad polüfenoolid koos flavonoididega.

Ühe levinud ravimtaimena tuntakse ahtalehist põdrakanepit (*Epilobium angustifolium*), mida on traditsiooniliselt rakendatud haavade, palaviku, aga ka mitmete kõhuhädade leevendamiseks. Tänapäeval kasutatakse seda mitmetes toidulisandites, aga ka näiteks kosmeetikatööstustes. Põdrakanep on rikas fütokemikaalide poolest, ent taimes sisalduvate bioaktiivsete ühendite kogus ja koostis on sõltuv nii taime geograafilisest kasvukohast kui ka kliimast ning varieerub taime erinevate osade vahel. Lisaks sõltub ekstraheeritavate ühendite kogus ja kooslus suuresti proovi ettevalmistusmetoodikast.

Põdrakanepit on eelnevalt uuritud enim polüfenoolide kvantifitseerimise ja eeterlike õlide eraldamise seisukohalt, ent käesolev töö keskendub suures osas ka solvendivabal tahkefaasi mikroekstraktsioonil ning taime erinevate osade ja proovi ettevalmistusmeetodite võrdlemisel, mille kohaseid tulemusi on autorile teadaolevalt nimetatud taime osas vähe.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on iseloomustada Eestis kasvavat ahtalehist põdrakanepit, võrreldes omavahel nii taime erinevaid osasid kui ka kuivatusmeetodeid. Selleks analüüsitakse tervet taime, taime varteta osa ehk lehti ja õisi ning võrseid. Analüüse viiakse läbi nii värske, õhu käes kuivatatud kui ka külmuivatatud proovidega. Nimetatud proovide korral võrreldakse omavahel lenduvate ühendite koostist, kasutades proovi ettevalmistamiseks tahkefaasi mikroekstraktsiooni ja hüdrodestillatsiooni ning analüüsimiseks gaasikromatograaf-massispektromeetrit. Mittelenduvate ühendite jaoks viiakse läbi taime etanooli ekstraktide kolorimeetiline analüüs spektrofotomeetriga ja kapillaarelektroforeetiline analüüs koos ultravioletse detekteerimisega.

Töö algab teoreetilise osaga, kus antakse ülevaade ahtalehisest põdrakanepist, fütokemikaalidest ja nende antioksidatiivsetest omadustest ning kasutatud proovi ettevalmistus- ja analüüsimeetoditest. Seejärel tuuakse välja töö täpsemad eesmärgid, millele järgneb eksperimentaalne osa, kus kirjeldatakse kasutatud aineid ja aparatuuri ning katsete läbiviimise tingimusi. Tulemuste ja arutelu osas kirjeldatakse töö tulemusi ning võrreldakse eelnevalt sooritatud sarnaste uuringutega kirjandusest. Käesoleva töö käigus valmistatud ekstrakte kasutatakse edasi *Borrelia* bakterite vastase aktiivsuse uurimiseks.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Ahtalehine põdrakanep

Paljud taimed on looduslikuks allikaks fütokemikaalidele ehk bioaktiivsetele komponentidele, mis omavad positiivset mõju ka inimestele, mistõttu on neid kasutatud rahvameditsiinis mitmete haiguste ennetamiseks ja raviks. Kui algusaegadel põhines nende tarvitamine katse-eksitus meetodil ning teadmised kasulike taimede kohta kujunesid välja ajaga, siis tänapäeval tehakse aktiivsed komponendid aga kindlaks ning taimi kasvatatakse ja kasutatakse eesmärgiga saamaks kasulikke ühendeid näiteks ravimite või toidulisandite valmistamiseks [1].

Ahtalehine põdrakanep (*Epilobium angustifolium*; edaspidi põdrakanep) on laialt levinud taim, mis kasvab peamiselt Põhja-Ameerikas ja Euraasias. See on sagedane näiteks teede ja raudteetammide ääres, metsaservas, ojade kaldal, lagendikel ja mäginiiitudel. Tegu on mitmeaastase taimega, mis kasvab kuni kahe meetri kõrguseks ning õitseb juunist kuni septembrini [2]. Õitsvat taime on kujutatud joonisel 1.



Joonis 1. Ahtalehine põdrakanep [2].

Põdrakanepit tuntakse kui ravimtaime, mille traditsioonilised kasutusviisid on seotud haavade ja nahahaiguste, palaviku, valu ja kõhuvaevustega seotud probleemidega [3]. Taime kasulikud omadused tulenevad selles sisalduvatest sekundaarsetest metaboliitidest nagu polüfenoolid, tanniinid ja terpeenid [4]. Tänapäeval kasutatakse põdrakanepit nii toidu- kui ka kosmeetikatööstustes, on levinud näiteks põdrakanepi komponente sisaldavad teed, tabletid, kreemid ja šampoonid [2].

1.2 Fütokemikaalid

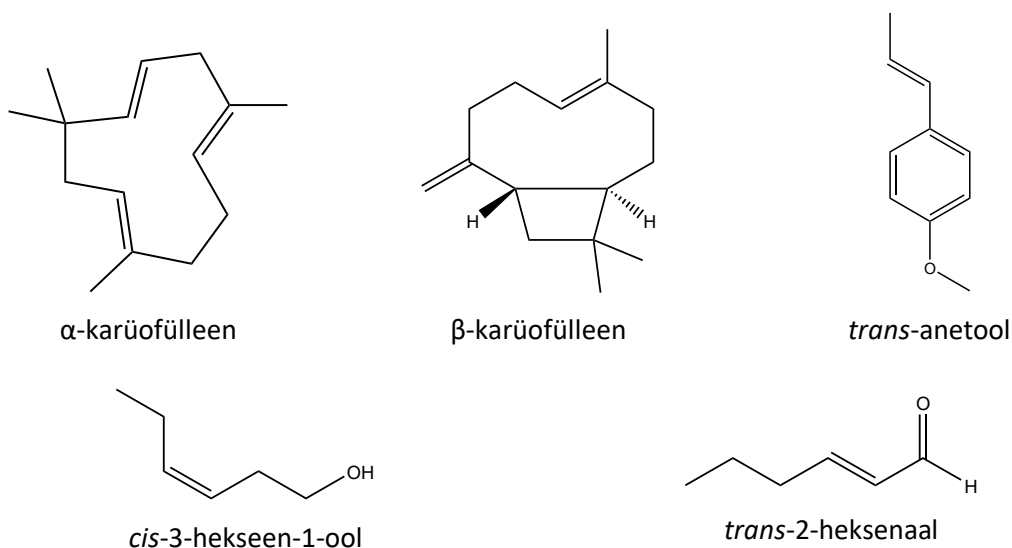
Fütokemikaalid on taimedest pärinevad bioaktiivsed ühendid, mida taimed toodavad eelkõige enda kaitsmiseks bakterite, putukate ja muude kahjurite eest. Tänapäevaks on avastatud üle kümne tuhande erineva fütokemikaali, millest olulisemad on polüfenoolid (sh flavonoidid) ja lenduvad orgaanilised ühendid, ning millel on leitud antioksidatiivseid, antimikroobseid, põletikuvastaseid ja muid tervisele kasulikke omadusi [5].

1.2.1 Lenduvad ühendid

Lenduvad orgaanilised ühendid esinevad taimedes tüüpiliselt madalmolekulaarsete lipofiilsete molekulidena. Taimed toodavad neid kaitseks stressi vastu ning aitamaks kaasa mitmetele füsioloogilistele protsessidele nagu taimedevahelistele interaktsioonidele, suhtlemisele sümbioossete organismidega ning meelitamaks ligi tolmendavaid organisme. Mitmed taimede poolt toodetavad lenduvad ühendid on kasutusel maitse- ja lõhnaainetena nii toidu- kui ka kosmeetikatööstuses, lisaks on neil tuvastatud ka mitmeid kasulikke omadusi inimeste tervisele. Lenduvate ühendite eraldamisel destillatsiooni käigus saadakse eeterlikud õlid [6], [7].

Tänapäeval on teada üle 1700 taimede poolt emiteeritava lenduva ühendi, mis olenevalt nende biosünteesilisest päritolust jaotatakse kolme suuremasse rühma: terpeenid/terpenoidid, fenüülpropanoidid ja rasvhapete derivaadid [8]. Terpeenid on ühendid, mille struktuur sisaldab üht või mitut isopreeni (2-metüül-1,3-butadieeni) ühikut, terpenoidid on modifitseeritud terpeenid, sisaldades sagedasti hapnikuaatomeid. Fenüülpropanoididele on iseloomulik fenüülrühm koos propeeni kõrvalahelaga. Lisaks on lenduvad ka näiteks mitmed alkoholid, aldehüüdid, ketoonid ja eetrid [9].

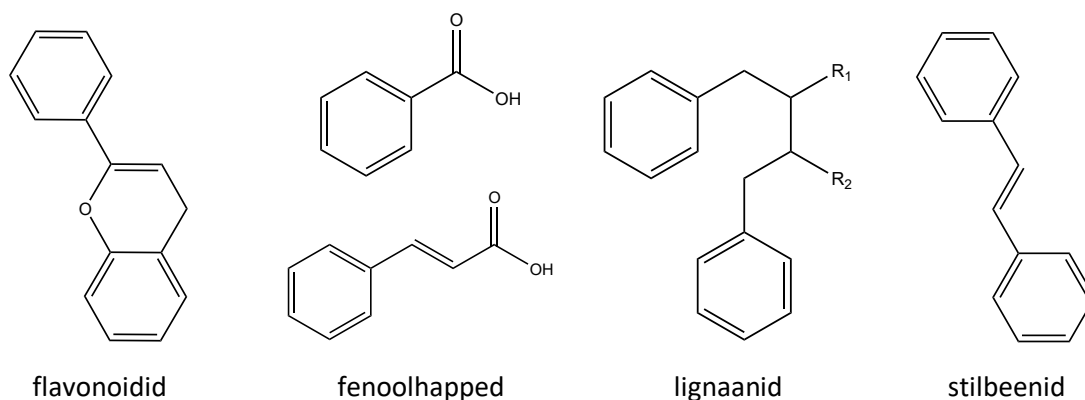
Põdrakanepist tuvastatud levinumad lenduvad ühendid on näiteks terpeenid α -karüofülleen ja β -karüofülleen, fenüülpropanoid *trans*-anetool ning alkohol *cis*-3-hekseen-1-ool ja aldehüüd *trans*-2-heksenaal [10], [11], [12]. Nimetatud ühendite struktuure on kujutatud joonisel 2.



Joonis 2. Põdrakanepis levinud lenduvad ühendid.

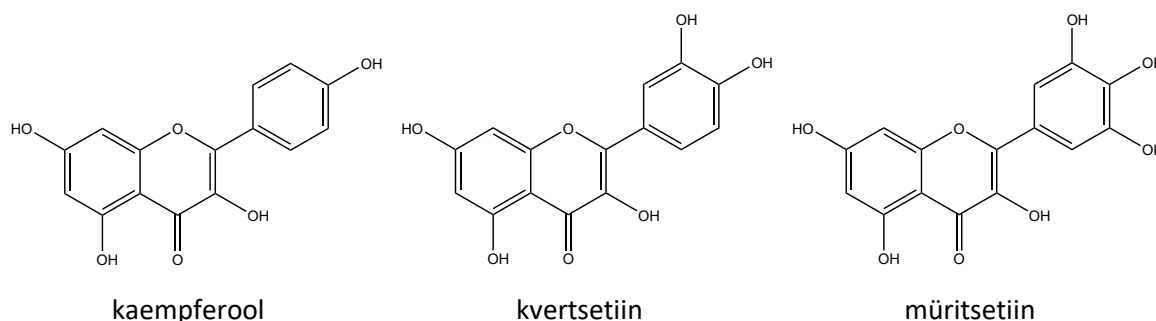
1.2.2 Polüfenoolid

Polüfenoolid on suurim rühm taime sekundaarseid metaboliite, mille hulka kuulub üle mitme tuhande erineva aine. Nende struktuur varieerub lihtsatest fenoolidest kuni keerukate polümeersete ühenditeni. Sõltuvalt fenoolrühmade arvust ning tsükleid koos hoidvate sidemete tüüpidest, jaotatakse need veel omaette bioloogiliselt erinevalt käituvatesse rühmadesse. Peamiselt eristatakse flavonoide, fenoolhappeid, lignaane ja stilbeene, mille süsinikskeletid on toodud joonisel 3. Polüfenoolid on potentsiaalselt võimalik kasutada mitmete haiguste, nagu näiteks kardiovaskulaarsete ja neurodegeneratiivsete haiguste, põletiku, 2. tüüpi diabeedi ning rasvumise, raviks [13], [14].



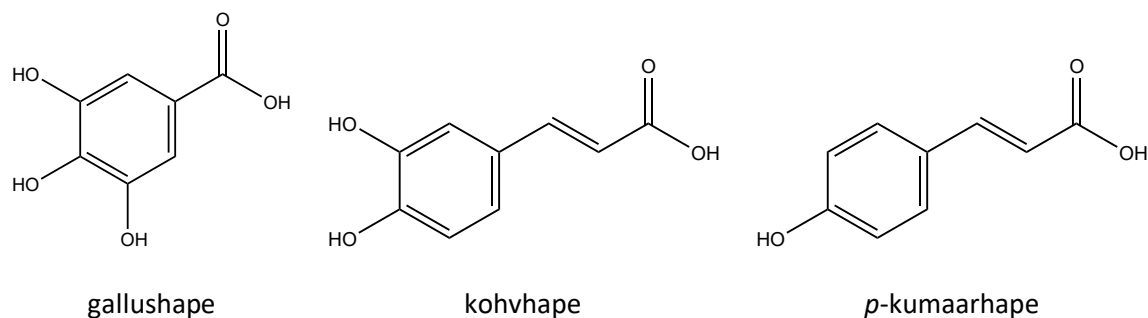
Joonis 3. Peamiste polüfenoolirühmade süsinikskeletid.

Flavonoidid on ühed tuntumad polüfenoolid, mis sisaldavad struktuuris enamasti kahte aromaatsset ringi, mis on omavahel seotud kolme, hapnikuga heterotsükli moodustava, süsinikaatomiga. Lähtuvalt täpsemast struktuurist, jaotatakse flavonoide veel omaette alamrühmadesse, millest tähtsamad on flavonoolid, flavoonid, isoflavoonid, flavanoonid ja antotsüaniinid. Lisaks paljudele tervisele kasulikele omadustele, on flavonoidid tähtsaimad pigmendiallikad, vastutades punase ja sinise värvuse eest lehtedes, õites ja viljades. Taimedes esinevad need peamiselt glükeeritud derivaatidena [13], [15]. Mõned levinud flavonoidid põdrakanepis on näiteks kaempferool, kvertsetiin ja müritsetiin [14], [16], mille struktuurid on toodud joonisel 4.



Joonis 4. Mõned levinud flavonoidid põdrakanepis.

Fenoolhapped jaotuvad kahte kategooriasse: bensoehappe derivaadid, nagu näiteks gallushape, ning kaneelhappe derivaadid [13], mille hulka kuuluvad ka põdrakanepis levinud kohv- ja *p*-kumaarhape. Nimetatud ühendite struktuurid on toodud joonisel 5.



Joonis 5. Mõned levinud fenoolhapped põdrakanepis.

Taime lignaanid on bifenoolsed ühendid, mis sisaldavad endas 2,3-dibensüülbutaani struktuuri, mis on moodustunud kahe kaneelhape dimeriseerumisest. Lignaanidel on potentsiaal mõjutada raku signaaliradu ja rakulisi protsesse näiteks kasvajate ennetamiseks ja raviks. Stilbeenid on moodustunud kahest fenüülrühmast, mida omavahel ühendab etüleensild [13].

1.2.3 Antioksidatiivsus

Mitmete keemiliste reaktsioonide ja metaboolsete ainevahetusprotsesside tulemusena tekib inimorganismi vabu radikaale ehk paardumata elektronidega osakesi, mis on võimelised muutma oluliste molekulide, nagu DNA, rasvad ja proteiinid, omadusi. Antioksidantidel on võime vabu radikaale kehast eemaldada, neutraliseerida, või on nad vajalikud võimaldamaks teistel molekulidel sarnast funktsiooni täita. Olukorda, kus oksüdatiivsete stressorite ning antioksidantide tasakaal kehas on paigast ära, nimetatakse oksüdatiivseks stressiks, mille lühiajaline ja kontrollitud vorm kehas on normaalne ja vajalik. Kestev ja sügav oksüdatiivne stress võib põhjustada aga mitmeid tervisemuresid nagu vähk, kardiovaskulaarsed haigused, dementsus ja insult. Antioksidantide süsteem kehas on keeruline ning selliseid rolle täidavad mitmed ained nagu vitamiinid C ja E, karotenoidid, aga ka metallid ja mineraalid nagu tsink ja seleen [17].

Antioksidatiivseid omadusi on leitud ka taimedes sisalduvatel polüfenoolidel, mis võivad neutraliseerida vabu radikaale loovutades elektroni või vesinikuaatomi. Olulisel kohal nende antioksidantses aktiivsuses on tugevalt konjugeeritud süsteem ning teatud hüdroksüülimismustrid nagu 3-hüdroksürühm flavonoolides. Sageli toimivad nad lipiidide peroksidatsiooni ahelreaktsioonide katkestajatena, neutraliseerides tekkivad radikaalid ja muutudes ise stabiilseteks, vähem reaktiivseteks radikaalideks [18]. Samuti tuntakse polüfenoole ka metallide kelaatijatena, vähendades siirdemetallide aktiivsust oksüdatsiooniprotsessides, ning nad võivad toimida ka kaasantioksidantidena ja osaleda oluliste vitamiinide regenereerimises [19]. Kuigi enamik tõendeid polüfenoolide antioksidantse toime kohta põhinevad *in vitro* uuringutel, näitavad tulemused üha enam, et need võivad toimida ka antioksidantsetes funktsioonides *in vivo* [20].

1.3 Proovi ettevalmistus

Taime bioloogiline aktiivsus on sõltuv nii tema geograafilisest kasvukohast, taime vanusest kui ka taime erinevatest osadest. Lisaks sõltub ekstraheeritud fütokemikaalide kogus ja koostis suuresti

proovi ettevalmistusmetoodikast [11]. Lenduvate ühendite analüüsi ettevalmistamiseks kasutatakse antud töös tahkefaasi mikroekstraktsiooni ja hüdrodestillatsiooni, mittelenduvaid ühendeid analüüsitakse ultraheli ekstraktsioonil saadavatest ekstraktidest. Analüüse viiakse läbi nii värske, õhu käes kuivatatud kui ka külmuivatatud proovidega.

1.3.1 Tahkefaasi mikroekstraktsioon

Ekstraktsioon on protsess, kus proovimaatriksist eraldatakse üks või mitu huvipakkuvat ühendit ehk analüüti segavate ainete kõrvaldamiseks, huvipakkuvate ainete kontsentreerimiseks või maatriksi lihtsustamiseks. Olenevalt proovi- ning ekstraktsioonifaasist, on olemas erinevaid ekstraktsioonimeetodeid, millest kõige enam leiavad kasutust vedelik-vedelik, vedelik-tahke (Soxhleti ekstraktsioon) ja tahkefaasi ekstraktsioon. Kui vedelik-vedelik ekstraktsioonis on nii proov kui ka solvent vedelas olekus, siis tahkefaasi ekstraktsiooni korral on ekstraktsioonisolvent asendatud tahke sorbendiga [21], [22].

Tahkefaasi mikroekstraktsioon (SPME) on miniatuurne tahkefaasi ekstraktsiooni meetod, mis loodi 1990. aastate algul Kanadas J. Pawliszyni poolt kiirendamaks proovi ettevalmistust. SPME korral viiakse proovianumasse väikse diameetriga fiiber, mis on kaetud statsionaarse faasiga, kuhu sorbeeruvad proovis sisalduvad analüüdid. Pärast anumast eemaldamist on võimalik fiiber analüüsiks otse gaasikromatograafi sisestada [23], [24]. SPME korral on kasutusel kolm peamist ekstraktsiooni tüüpi: fiiber viiakse kas vastavalt otse proovifaasi, gaasifaasi proovi kohal (*headspace*, HS), mille korral on võimalik analüüsida vaid lenduvaid ühendeid, või kus kaetud fiiber on omakorda kaitstud membraaniga, mis filtreerib välja segavad komponendid [24]. HS-SPME-d on kujutatud joonisel 6.



Joonis 6. Tahkefaasi mikroekstraktsioon gaasifaasist proovi kohal [25].

Lisaks lihtsusele, kiirusele ja kõrgele tundlikkusele [24], on SPME ka rohelise keemia seisukohalt tervitatav meetod, kuna see on solvendivaba ning analüüsitava proovi kogused on väga väikesed [26]. Rohelise keemia printsiipide kohaselt peetakse proovi ettevalmistust kõige saastavamaks

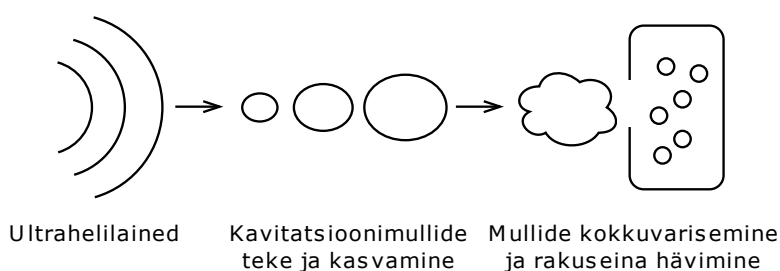
etapiks analüütilises protseduuris, kuna see nõuab tihtipeale palju solventi ja energiat [27]. Seetõttu räägitakse eraldi ka rohelisest proovi ettevalmistusest, mille põhimõtted on järgmised: *in situ* proovi ettevalmistamise eelistamine, keskkonnale ja inimestele ohutute solventide kasutamine, korduvkasutavate ja säästvate materjalide kasutamine, jäätmete minimeerimine, proovi koguse, kemikaalide ja materjalide koguste minimeerimine, proovi läbilaskevõime maksimeerimine, sammude integreerimine ja automatiseerimine, energiatarbimise minimeerimine, analüüsimiseks keskkonnasõbraliku proovijärgse ettevalmistuse konfiguratsiooni valimine, töötajale ohutute protseduuride tagamine [28].

SPME-ga on võimalik ekstraheerida väga erinevaid analüüte, lenduvaid ja mittelenduvaid, polaarseid ja mittepolaarseid, mis on saavutatav tänu erinevat tüüpi ekstraktsioonifaasidele. Kommertsiaalselt on kasutusel näiteks mittepolaarne polüdimetüülsiloksaan (PDMS) ning polaarsed polüakrülaad (PA) ja polüetüleenglükool (PEG). Lisaks on olemas ka mitmed bipolaarsed faasid nagu PDMS-divinüülbenseen (PDMS-DVB), karbokseen-PDMS (CAR-PDMS) ja DVB-CAR-PDMS [29].

Taimedes leiduvate lenduvate komponentide analüüsil on SPME laialt levinud [30], [31] ning leidub väheseid artikleid ka põdrakanepi kohta [11], kus ühendeid analüüsiti HS-SPME-ga kasutades PDMS-DVB fiibrit.

1.3.2 Ultraheli ekstraktsioon

Ultraheli ekstraktsioon kasutab analüütide eraldamiseks maatriksist ultrahelilaineid (sagedus on suurem kui 20 kHz). Ekstraktsiooni peamine toimemehhanism on akustiline kavitatsioon (joonis 7) ehk lainete proovist läbimine põhjustab molekulide nihkumist, vahelduvat kokkusurumist ja eemaldumist, mis toob endaga kaasa kavitatsioonimullide tekke. Mullid kasvavad ühinedes suuremaks, kuni nad lõpuks kokku varisevad, põhjustades äärmuslikke temperatuure ja rõhke ning turbulentside teket vedelikus. Kokkuvarisevad kavitatsioonimullid kiirendavad lokaalselt osakeste liikumist ning biokeemilisi reaktsioone, tekitades rakumembraanidesse mikropragusid, fragmentatsioone, mis viib rakust bioaktiivsete ühendite vabanemiseni, tänu millele kokkupuude ekstraktsioonisolvendiga suureneb. Laboritingimustes kasutatakse ultraheli ekstraktsiooniks peamiselt ultraheli vanne, kus proov ekstraktsioonisolvendiga asetatakse suurde anumasse, või sonde, mis sukeldatakse otse proovi [32], [33].

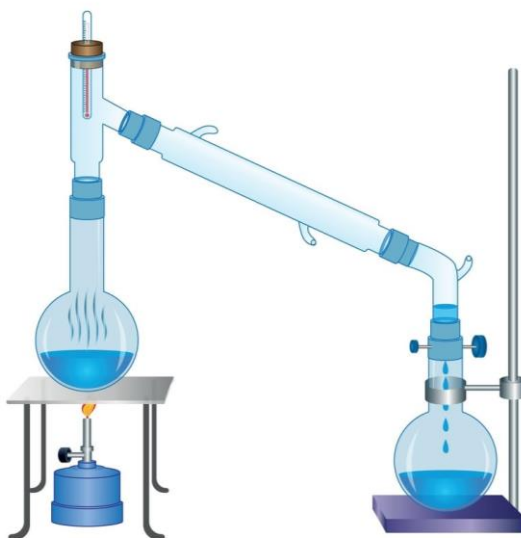


Joonis 7. Ultraheli ekstraktsiooni peamine toimemehhanism.

Ekstraktsioonisolvendi valik taimedest analüütide eraldamiseks sõltub suuresti huvipakkuvate bioaktiivsete ühendite iseloomust. Polaarse ühendite ekstraktsiooniks kasutatakse polaarseid solvendid nagu vesi, metanool ja etanool, mittepolaarsetele ühenditele sobivad mittepolaarsed solvendid nagu heksaan ja diklorometaan [34]. Polüfenoolide on ekstraheeritud solvendidega nagu metanool, etanool ja atsetoon [12], [30] nii värsketest, külmutatud kui ka kuivatatud taimeproovidest, mida eelnevalt jahvatatakse ja homogeniseeritakse. Lisaks solvendivalikule sõltub ekstraheeritud polüfenoolide kogus ka proovi kuivatusmeetodist [35].

1.3.3 Hüdrodestillatsioon

Hüdrodestillatsioon (HD) on üks standardmeetoditest taimedest eeterlike õlide ekstraheerimiseks. HD korral asetatakse proov koos veega samasse anumasse, mille kuumutamisel kannab veeaur lenduvate ühendite aurud jahutisse, kus need seejärel kondenseeruvad. Hiljem on võimalik omavahel mittesegunevad vedelikud kergesti eraldada. HD sobib vees mittelahustuvate kõrgete keemistemperatuuridega ühendite ekstraheerimiseks, kui algmaterjali ei ole võimalik soovitud temperatuurini kuumutada näiteks ühendite lagunemise tõttu [36], [37]. HD aparatuuri skeem on toodud joonisel 8.



Joonis 8. Hüdrodestillatsiooni aparaat [38].

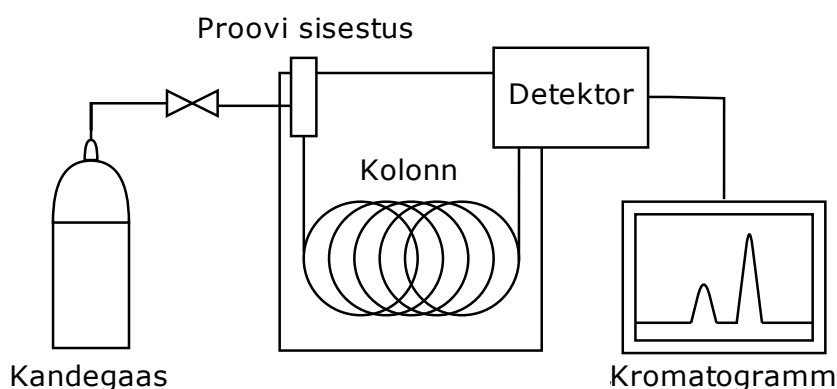
1.4 Analüüsimeetodid

Pärast huvipakkuvate ühendite ekstraheerimist proovimaatriksist, on võimalik neid mitmete meetoditega analüüsida. Antud töös kasutatakse gaasikromatograafia-massispektromeetriat lenduvate ühendite analüüsil nii pärast SPME-d kui HD-d ning kolorimeetrilist analüüsi koos spektrofotomeetriga polüfenoolide sisalduse kvantifitseerimiseks. Lisaks kasutatakse kapillaarelektroforeesi peamiste aktiivsete ühendite kindlaks määramisel.

1.4.1 Gaasikromatograafia-massispektromeetria

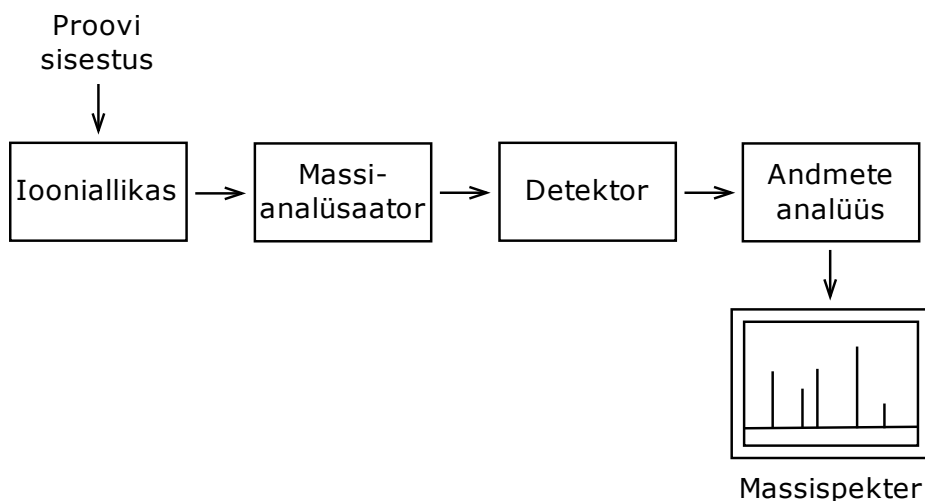
Kromatograafia on füüsikaline lahutusmeetod, kus komponentide lahutumine kolonnis põhineb nende erineval jaotumisel statsionaarse ja mobiilse faasi vahel [39]. Lähtuvalt liikuva faasi olekust, eristatakse vedelik- ja gaasikromatograafiat (GC). GC alamkategoriseerimine toimub liikumatu faasi põhjal: kui statsionaarne faas on tahke, on tegu gaasi-adsorptsiooni-kromatograafiaga, kui aga vedelik, on tegu gaasi-vedelik-kromatograafiaga [40].

Gaasikromatograaf on üks maailmas levinumaid analüütilisi instrumente, mis on peamiselt kasutusel lenduvate ühendite lahutamiseks ja analüüsimiseks. Analüüsida on võimalik nii gaase, vedelaid kui ka tahkeid aineid, mis enne analüüsi aurustatakse tavaliselt lahustatuna lenduvates vedelikes. Võimalik on analüüsida proovidest analüüte, mille molekulmass on vahemikus 2-1000 amu [40]. Tüüpiline gaasikromatograaf (joonis 9) koosneb inertse kandegaasi balloonist (nt heelium), proovi sisestusseadmest, kolonnist, mis on paigutatud termostaati, ja detektorist, mis teisendab informatsiooni kolonnist väljuvate ainete kohta elektriliseks signaaliks. Liikumatu faasina kasutatakse kas adsorbente või vedelikku, mis on kantud kas inertse kandja osakestele või kapillaari sisepinnale [41].



Joonis 9. Gaasikromatograafi plokskeem.

Massispektromeetria (MS) on meetod aatomite, molekulide või molekuli fragmentide uurimiseks. MS on üks olulisemaid kromatograafia detektoreid, tagades nii kvalitatiivset kui kvantitatiivset informatsiooni ning pakkudes kõrget tundlikkust. Massispektromeetri plokskeem on toodud joonisel 10. Sisestatud proov liigub esmalt iooniliskasse, kus proovi molekulid ioniseeruvad ja kus tekkinud ioonid lagunevad fragmentideks, mis on antud molekulile spetsiifilised. Tekkinud fragmendid sorteeritakse massianalüsaatoris vastavalt fragmendi massi/laengu (m/z) suhtele ja detekteeritakse detektoris. Detektori signaali esitatakse graafiku ehk massispektri kujul [41], [42].



Joonis 10. Massispektromeetri plokk skeem.

Neutraalsete molekulide ioniseerimiseks iooniallikas kasutatakse peamiselt ioniseerimist elektronide vooga või keemilist ionisatsiooni. Elektroonse ionisatsiooni korral satuvad proovi molekulid iooniallikas elektronidevoo alla, mis on suunatud risti molekulide liikumise suunaga. Elektrone tekitatakse katoodi soojendamise, mis liikudes anoodi poole, põrkuvad kokku proovi molekulidega ning ioniseerivad need. Tekkinud positiivseid ioone kiirendatakse ning suunatakse massianalüsaatori poole. Elektroonne ionisatsioon on tugev ionisatsioonimeetod, mis tähendab, et molekulaarneioon laguneb enamasti täielikult tütarioonideks ning molekulaarse iooni enda piiki massispektris avastada on raske. Keemilise ionisatsiooni käigus on protsesside tulemuseks vähem fragmenteerumist ning molekulaarse iooni osakaal on suurem. Iooniallikas on sel juhul täidetud gaasiga, nagu näiteks metaan, isobutaan, ammoniaak, mis muudetakse energetiliste elektronide puhul reaktiivseteks osadeks, prootonite doonoriks, mis omakorda reageerivad analüüdiga, andes protoneeritud molekule [41], [42].

Massianalüsaatoris toimub molekuli ioniseeritud fragmentide sorteerimine massi ja laengu järgi. Tulemus esitatakse massispektrina, kus on näha tekkinud fragmentide arvu sõltuvus fragmendi m/z suhtest. Magnetanalüsaatoris eraldatakse ioonid lähtuvalt nende liikumisest homogeenes magnetväljas. Kvadrupoolanalüsaatoris, mis koosneb neljast rööpvardast, rakendatakse vastastikku asetsevatele vardapaaridele alalis- ning vaheduvpinget, mis mõjutab ionide liikumise trajektoore ning lubab detektorini jõuda vaid kindla m/z suhtega ioonidel, teised põrkuvad varrastega ning neutraliseeruvad [41], [42].

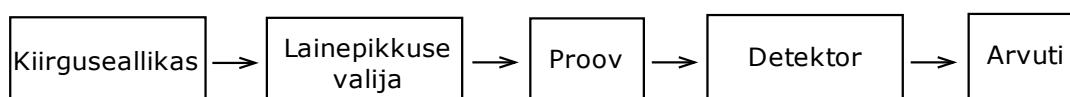
1.4.2 Kolorimeetriline analüüs

Spektroskoopia uurib ainete vastastikmõju elektromagnetkiirgusega, mida aatomid ja molekulid võivad neelata, hajutatada ja kiirata [43]. Ultravioletne-nähtav (UV-Vis) absorptsiooni spektroskoopias neelavad ained valgust ultravioletses ja nähtavas piirkonnas (180-1100 nm). Ühendi kontsentratsiooni määramiseks lahuses rakendatakse Lambert-Beer'i seadust (valem 1).

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda l C, \quad (1)$$

kus A on absorptsioon, I_0 ja I on kiirguse intensiivsused enne ja pärast proovi läbimist, C on molaarne kontsentratsioon, ε_λ on molaarne absorptsioonitegur ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) lainepikkusel λ ning l optiline teepikkus (cm) [44].

UV-Vis spektrofotomeeter, mille plokskeemi on kujutatud joonisel 11, koosneb tüüpiliselt kiirguseallikast, monokromaatorist või filtrist, mis valib vajaliku lainepikkuse, ning detektorist, mis konverteerib valguse intensiivsuse mingiks lihtsasti mõõdetavaks, enamasti elektriliseks signaaliks, mida töödeldakse edasi ja esitatakse arvutis numbrilise väärtusena [44].



Joonis 11. Spektrofotomeetri plokskeem.

Kolorimeetrisel analüüsis kasutatakse spektrofotomeetrit määramaks värviliste keemiliste ühendite kontsentratsiooni lahuses, mõõtes ühendile iseloomulikul lainepikkusel absorptsiooni. Kui ühend neeldumisspektril ise ei oma, on võimalik spetsiifilistel reaktsioonidel aineid modifitseerida ning tekkiva värvuse intensiivsus on sõltuv ühendi kogusest [44].

Folin-Ciocalteu meetod (F-C) on samanimeliste teadlaste poolt 1927. aastal välja töötatud meetod polüfenoolide kvantifitseerimiseks. F-C reagent on segu fosfovolfram- ($H_3PW_{12}O_{40}$) ja fosfomolibdeenihappest ($H_3PMo_{12}O_{40}$), mis aluselistes tingimustes reageerides taandavate ühenditega moodustavad lahustuva sinise kompleksi, mida on võimalik spektrofotomeetriselt mõõta ning mille intensiivsus on proportsionaalne polüfenoolide sisaldusega. Meetod leiab ulatuslikku kasutamist taimeekstraktide uurimisel ning polüfenoolide määramisel ka toidus ja joogis. Traditsiooniliselt kasutatakse meetodis võrdlemiseks gallushappe standardeid ning tulemusi antakse gallushappe ekvivalentidena [45].

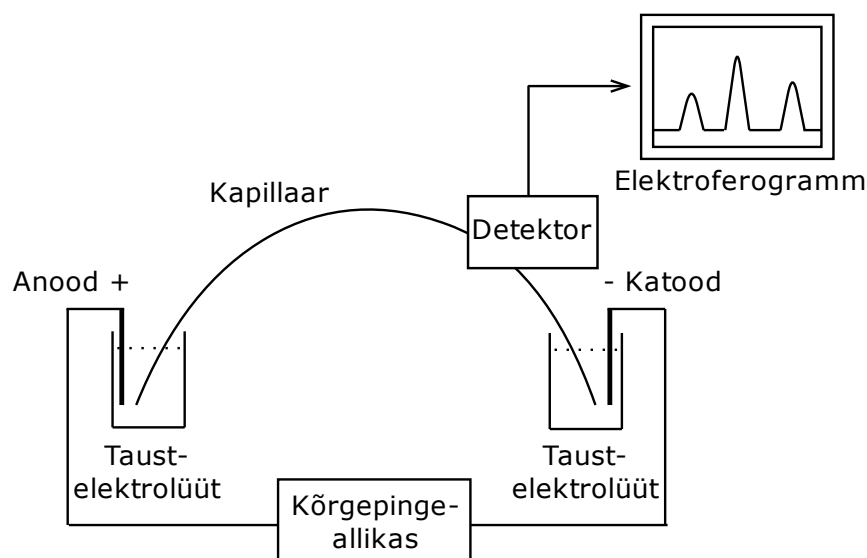
Üks levinuim flavonoidide määramise meetodeid ekstraktidest on $AlCl_3$ meetod, mida esimest korda kirjeldati 1960. aastal [46]. See meetod põhineb kollaste Al(III)-flavonoid kelaatide moodustumisel, mille tagab flavonoidide kõrge afiinsus metalliioonide suhtes. Flavonoidide kogus kvantifitseeritakse standardaine, millest üks levinumaid on näiteks kvartsetiin, ekvivalentina [47].

1.4.3 Kapillaarelektroforees

Kapillaarelektroforees (CE) on analüütiline lahutusmeetod, mille korral toimub ainete elektroforeetiline lahutamine kapillaarkolonnis. CE-d teostatakse kvarts-, klaas- või teflontorus, mis täidetakse sobiva taustelektrolüüdiga (BGE). Kui ioone sisaldavale lahusele rakendada elektripotentsiaali, hakkavad ioonid liikuma: katioonid liiguvad negatiivse elektroodi ehk katodi suunas ning anioonid positiivse elektroodi ehk anoodi suunas. Liikuvus sõltub iooni raadiusest ja laengust, mistõttu erinevad ioonid liiguvad erineva kiirusega ning algne tsoon jaguneb ribadeks. Lisaks ionidele liigub kolonnis ka BGE, mille liikumist nimetatakse elektroendosmoosiks (EOF), ning

mis on enamasti kiirem kui ionide liikumine ja avaldab seetõttu mõju kõikidele lahutatavatele osakestele. Kuna normaaltingimustes on EOF suunatud anoodilt katoodile, liiguvad katoodi suunas ka neutraalsed ühendid ja anioonid ning ühe ja sama analüüsi vältel on võimalik lahutada seega nii anioone, neutraalseid osakesi kui ka katioone [41], [48].

Kapillaarelektroforeesi aparatuuri (joonis 12) peamised komponendid on kõrgepingeallikas, kapillaar ja detektor. Kõige laiemalt kasutatakse UV-detektorit, kus kapillaar asetatakse läbi detektori raku nii, et polüamiidist puhastatud osa satuks UV-kiirguse ja fotoelemendi vahele [41].



Joonis 12. Kapillaarelektroforeesi plokk skeem.

Võrreldes kromatograafiliste meetoditega on CE üsna uus lahutusmeetod, mis on just viimastel aastakümnetel palju populaarsust kogunud, pakkudes paremat lahutusvõimet. Meetod on levinud toidu- ja keskkonnaproovide, aga ka näiteks taimeproovidest polüfenoolide analüüsimisel [49].

Analüüsitulemuste kvaliteedi tagamiseks on oluline iseloomustada meetodikat kindlate parameetritega, mis määravad analüütilise protseduuri kasutamise võimalused ja piirid analüütide määramisel. Sellised parameetrid on näiteks tundlikkus, spetsiifilisus, selektiivsus, robustsus ning avastamis- ja määramispiirid. Käesolevas töös määrati neist viimased ning uuriti lisaks proovi maatriksi mõju analüütide määramisel.

Avastamis- ehk detekteerimispiir (LoD) kirjeldab vähimat analüüdi sisaldust, mida on proovis antud meetodikaga usaldusväärselt võimalik detekteerida. Määramis- ehk kvantifitseerimispiir (LoQ) iseloomustab madalaimat analüüdi sisaldust proovis, mida antud meetodika võimaldab usaldusväärselt kvantifitseerida. Üheks võimaluseks on nimetatud piiride arvutamisel lähtuda signaal/müra (S/N) suhtest, mis LoD korral on tüüpiliselt 3/1 ja LoQ korral 10/1. Lisaks arvutatakse neid ka kalibreerimisgraafiku põhjal, kasutades graafiku sirge tõusu ja jääkliikmete standardhälvet (valemid 2-3) [50].

$$LoD = 3 \frac{s_y}{b_1}, \quad (2)$$

$$LoQ = 10 \frac{s_y}{b_1}, \quad (3)$$

kus s_y on kalibreerimisgraafiku residuaalide standardhälve ning b_1 kalibreerimisgraafiku sirge tõus.

2. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on iseloomustada Eestis kasvava ahtalehise põdrakanepi fütokeemilist koostist:

- valmistada taimeproovidest etanooli ekstraktid;
- võrrelda omavahel taime erinevaid osasid: tervet taime, lehti ja õisi, võrseid;
- võrrelda omavahel värsket, õhu käes kuivatatud ja külmuivatatud taimeproove;
- lenduvate ühendite iseloomustamiseks kasutada tahkefaasi mikroekstraktsiooni ja hüdroadestillatsiooni, ühendeid tuvastada gaasikromatograafia-massispektromeetriaga;
- mittelenduvaid ühendeid analüüsida etanooli ekstraktidest kasutades kolorimeetrilist analüüsi ja spektrofotomeetrit ning kapillaarelektroforeesi koos UV-detekteerimisega.

3. Eksperimentaalne osa

3.1 Kasutatud ained ja materjalid

Analüüsitud põdrakanepid pärinesid Harjumaalt Kose alevikust. Taime erinevate osade fütokeemilise koostise võrdlemiseks kasutatud võrsed korjati juunis 2022 ning terve taime ja varteta taime proovid õitsemise ajal juulis 2022. Erinevate kuivatusmeetodite võrdlemiseks kasutatud põdrakanepi taimed korjati õitsemise ajal juulis 2023.

Proovide ja lahuste valmistamiseks kasutati ülipuhast vett ($\geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$), mis saadi laborisiseselt Milli-Q veepuhastussüsteemiga (Millipore, USA). Ekstraktide tegemiseks kasutati solvendina 96,7% etanooli (Sigma-Aldrich). Kolorimeetriliseks analüüsiks 2M Folin-Ciocalteu reaktsioonisegu (Sigma-Aldrich), veevaba naatriumkarbonaati (Sigma-Aldrich), $\geq 99\%$ puhtusega alumiiniumkloriidi (Fluka), metanooli ($\geq 99.9\%$, Honeywell) ning standardainetena gallushappe monohüdraati (Sigma-Aldrich) ja kvartsetiini dihüdraati ($\geq 97\%$, Alfa-Aesar).

Kapillaarelektroforeesil oli standardaineteks lisaks gallushappele ja kvartsetiinile veel ka rutiin-trihüdraat ($\geq 97\%$, Alfa Aesar), klorogeenhape ($\geq 95\%$, Aldrich), feruulhape ($\geq 99\%$, Aldrich), kaempferool ($\geq 96\%$, Fluka), luteoliin ($\geq 98\%$, Sigma), *p*-kumaarhape ($\geq 98\%$, Fluka), müritsetiin ($\geq 96\%$, Sigma) ja kohvhape ($\geq 97\%$, Aldrich). BGE-ks kasutati naatriumtetraboraat-dekahüdraati ($\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich) ning kapillaari aktiveerimiseks naatriumhüdrosiidi ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich).

3.2 Kasutatud aparatuur

Proovide peenestamiseks kasutati Bomann KSW 445 CB (Hiina) kohviveskit ning külmuivatamiseks Labogene Scanvac CoolSafe 110-4 (Taani) seadet. Kõik kaalumised sooritati Mettler Toledo AB204-S (Šveits) analüütilisel ja Precisa 390HF 125SM-FR (Šveits) semi-mikro analüütilisel kaalul. Niiskusesisaldust mõõdeti OHAUS MB90 (USA) niiskusemõõtjaga.

Ekstraktide valmistamiseks segati proove OrbitalShaker DOS-20M (Läti) loksutil. Ultraheli ekstraktsioon viidi läbi Sonorex™ Digital 10P (Bandelin, Saksamaa) ultrahelivannis ning tsentrifuugimiseks kasutati Eppendorf tsentrifuugi 5804 R (Saksamaa).

SPME-ks kasutati manuaalset fiibrihoidjat (57330-U, Supelco, Bellefonte, PA, USA) ning sama firma PDMS-DVB (tahke faasi paksus $65 \mu\text{m}$), DVB-CAR-PDMS ($50/30 \mu\text{m}$) ja CAR-PDMS ($75 \mu\text{m}$) kattega fiibreid.

Kromatograafiline lahutumine toimus Agilent Technologies 7890A gaasikromatograafia süsteemis jaotuseta (*splitless*) laineriga (Agilent Technologies, tüüp 5190-2293), mis oli varustatud Agilent

5975C massispektromeetriga, mis omakorda koosnes elektroonse ionisatsiooni allikast ja kvadрупoolanalüsaatorist.

Hüdrodestillatsiooni aparatuur koosnes Electrothermal EMA0250/CEB kuumutuspesast, ümarkolvist, termomeetrist, jahutist ja vastuvõtukolvist.

Kolorimeetrilise analüüsi proove mõõdeti Varian Cary 50 Bio UV-Vis spektrofotomeetriga (Agilent Technologies, USA) kasutades 1,5 mL semi-mikro küvette (Nerbe Plus GmbH & Co. KG, Saksamaa).

Kapillaarelektroforeesiks kasutati Agilent Technologies G7100A (Saksamaa) instrumenti koos UV-detektoriga.

Lahuste ja proovide tegemiseks kasutati 1000, 200 ja 20 µL automaatpipette, Eppendorf katsuteid ja 15 mL proovianumaid.

3.3 Taimematerjali ettevalmistus

Erinevate taimeosade koostise võrdlemiseks korjatud põdrakanepi taimed kuivatati esmalt pimedas õhu käes konstantse massini, misjärel eraldati ja jahvatati peeneks kolm erinevat proovi: terve taim (sh vars, lehed, õied), varteta proov (lehed ja õied) ning võrsed.

Erinevate kuivatusmeetodite võrdlemiseks jaotati ilma varteta jahvatatud uued taimed kolmeks: üks osa analüüsiti värskena, teine kuivatati pimedas õhu käes ning kolmandat külmuivatati 24 h lüofilisaatoris -110°C juures vaakumis.

Jahvatatud proovide niiskussisaldust mõõdeti 105°C juures kolmes paralleelis konstantse massini.

3.4 Lenduvate ühendite analüüs

3.4.1 Tahkefaasi mikroekstraktsioon koos gaasikromatograafia-massispektromeetriaga

Lenduvate ühendite analüüsimiseks HS-SPME-GC-MS-iga kasutati eelnevalt samas laboris välja töötatud meetodikat [30]. Selleks kaaluti 1,5 mL viaali 50 mg purustatud taimeproovi, viaal sulgeti, anumasse viidi ekstraktsioonifiber ning proovi kuumutati 50°C juures 15 min. Seejärel sisestati fiiber otse GC-MS-i, kus analüüdid kuumuse mõjul desorptseerusid. Kandegaasiks kasutati heeliumit (AGA, Eesti), mille voolukiirus hoiti konstantsena 1,2 mL/min ning ühendid lahutati ZB-5 plus kapillaarkolonnis (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Agilent Technologies, USA). Aurusti temperatuur hoiti 275°C juures, proovi sisestati jaotuseta režiimil 2 min. Termostaadi algne temperatuur oli 35°C, mis seejärel kuumutati 200°C-ni kiirusega 5°C/min ning 280°C-ni kiirusega 20°C/min, lõpptemperatuuri hoiti 2 min. Kogu analüüsi aeg oli seega kokku 39 min. Analüüdi ionisatsioon toimus kasutades elektronide energiat 70 eV, proovi sisestuse, ioonilika ja massianalüsaatori temperatuurid olid vastavalt 280, 250 ja 150°C. Ioonide skannimiseks kasutati m/z vahemikku 20-500. Analüüs viidi läbi kolmes paralleelis ning ühendid tuvastati kasutades National Institute of

Standards and Technology 17 (NIST17) raamatukogu ning andmete analüüsiks kasutati Agilent MassHunter Qualitative, Quantitative and Unknowns Analysis programmi.

3.4.2 Hüdrodestillatsioon

Hüdrodestillatsiooni aluseks võeti teadustöö [51], mida vastavalt eesmärgile modifitseeriti. Selleks kaaluti 200 mL ümarkolbi 10 g purustatud taime ning lisati 100 mL ülipuhast vett. Proovi kuumutati keemiseni ning destillaati koguti seejärel 2 tunni vältel umbes 20 mL (maht fikseeriti). Saadud destillaadile lisati 2 mL (10% destillaadi mahust) heksaani, segati loksutil 15 min, misjärel heksaan eraldati jaotuslehtriga ning analüüsiti GS-MS-ga samadel tingimustel kui SPME proove. Destillatsioon viidi läbi varteta 2022 prooviga kolmes korduses.

3.5 Mittelenduvate ühendite analüüs

3.5.1 Taimeekstraktide valmistamine

Taimeekstraktide valmistamiseks kasutati solvendina 50% etanooli, kuna kirjandusest [30] on teada, et sellises solvendis lahustuvad hästi nii polüfenoolid kui flavonoidid ning ekstraktsioonisolventi antud töös seetõttu ei optimeeritud. Ekstraktide valmistamiseks kaaluti 15 mL proovianumasse 0,5 g taimeproovi, millele lisati 10 mL 50% EtOH-d. Saadud segu segati loksutil 30 min (250 rpm), misjärel ekstraheeriti ultrahelivannis 30 min (35°C) ning tseentrifuugiti 10 min (4500 rpm, 20°C). Tseentrifugaat eraldati sademelt pipetiga. Kõigist kuuest erinevast proovist valmistati ekstraktid kahes korduses.

3.5.2 Kolorimeetiline analüüs

Kolorimeetriliste testidega kvantifitseeriti peamised bioaktiivsete ühendite grupid: polüfenoolid ja flavonoidid. Selleks kasutati F-C ja AlCl_3 meetodeid [52], mis kohandati vastavalt antud töö tingimustele ja eesmärkidele.

Polüfenoolide mõõtmiseks valmistati esmalt 5 mg/mL gallushappe lähtelahus metanoolis, millest tehti kalibratsiooniks lahjendatuna ülipuhtas vees standardlahused kontsentratsioonidega 10, 20, 50, 75 ja 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kalibratsioonilahused tehti igal mõõtmisel uued samaaegselt proovidega. Reaktsioonisegu koosnes 1 mL 10% Folin–Ciocalteu reagentist vees, millele lisati 200 μL proovi/kalibratsiooni, lasti seista 8 min ning lisati 800 μL 10% Na_2CO_3 lahust vees, misjärel segati hoolega ning lasti reaktsioonil toimuda 1 h. Proove mõõdeti küvettides spektrofotomeetriga 765 nm juures. Kõikidest proovidest tehti neli paralleeli ning tulemused anti mg gallushappe ekvivalendina g taime kuivmassi kohta (mg GAE/g DW).

Flavonoidide mõõtmiseks valmistati kvartsetiini 2 mg/mL lähtelahus metanoolis, millest omakorda kalibratsiooniks lahjendused 50% MeOH-s kontsentratsioonidega 2, 5, 10, 20 ja 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kalibratsioonilahused tehti igal mõõtmisel uued samaaegselt proovidega. Reaktsiooniks segati kokku 600 μL proovi/kalibratsiooni ning 600 μL 2% AlCl_3 metanoolis. Proovidel lasti seista 0,5 h ning

absorptsiooni mõõdeti spektrofotomeetriga 415 nm juures. Kõikidest proovidest tehti neli paralleeli ning tulemused anti mg kvartsetiini ekvivalendina g taime kuivmassi kohta (mg QE/g DW).

3.5.3 Kapillaarelektroforees

Kapillaarelektroforeesiga analüüsi proovidest kirjanduse alusel põdrakanepis enim sisalduvaid polüfenoole: rutiin, klorogeenhape, feruulhape, kaempferool, kvartsetiin, müritsetiin, luteoliin, *p*-kumaarhape, kohvhape ja gallushape. Selleks kasutati eelnevalt samas laboris välja töötatud meetodikat, mida kohandati ja kontrolliti vastavalt eesmärgile. Omavahel võrreldi proovi ja teadaoleva kontsentratsiooniga standardlahuste signaale. Igast aimest valmistati esmalt 1 g/mL standardlahused, millest kalibratsiooniks tehti lahused kontsentratsioonidega 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 ja 10 µg/mL. LoD ja LoQ väärtused arvutati kalibreerimisgraafiku tõusu ja jääkliikmete standardhälve põhjal, lähtudes peatükis 1.4.3 toodud valemitest 2 ja 3 ning kasutades S/N suhet, mis LoD korral oli 3/1 ning LoQ korral 10/1. Maatriksefekt arvatades lähtuti analüüdi piigi pindalast rikastatud proovis ja sama analüüdi pindalast standardlahuses. Kõiki mõõtmisi sooritati kolmes paralleelis.

CE-ks kasutati kvartskapillaari efektiivse pikkusega 61,5 cm ning sisediameetriga 50 µm. Kapillaarile rakendati pinget 25 kV, voolutugevus oli 300 µA ning proov süstiti rakendades rõhku 50 mbar 10 sekundi jooksul. Kapillaari aktiveerimiseks ehk pinna deprotoneerimiseks enne esmast kasutamist ning pesemiseks katsete vahel kasutati 1 M NaOH-d ja ülipuhast vett. Puhvrina kasutati 33 mM boraati, ühendeid detekteeriti igale nimetatud polüfenoolile iseloomulikul lainepikkusel.

4. Tulemused ja arutelu

4.1 Taimematerjali iseloomustus

Joonisel 13 on toodud analüüsitud põdrakanepiproovid jahvatatul kujul, kust on näha, et proovide värvused olid erinevates rohelistes toonides. Võrreldes näiteks sama aasta õhk- ja külmuivatatud proove, oli esimene nimetatutest tunduvalt tumedamat värvi.



Joonis 13. Analüüsitud põdrakanepiproovid jahvatatult, vasakult: värske 2023, terve taim 2022, varteta 2022, võrsed 2022, õhkuivatatud 2023, külmuivatatud 2023.

Tabelis 1 on mõõdetud proovide niiskusesisaldused, mida on hiljem arvesse võetud polüfenoolide ja flavonoidide sisalduste arvutamisel. Tulemustest paistab, et kõige väiksema niiskussisaldusega proov saadi külmuivatades.

Tabel 1. Proovide niiskussisaldused.

	Õhkuivatatud			Varteta		
	Terve taim 2022	Varteta 2022	Võrsed 2022	Värske 2023	Õhkuivatatud 2023	Kylmuivatatud 2023
Niiskus (%)	5,3 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,2 ± 0,1	70,4 ± 0,3	8,9 ± 0,3	4,6 ± 0,1

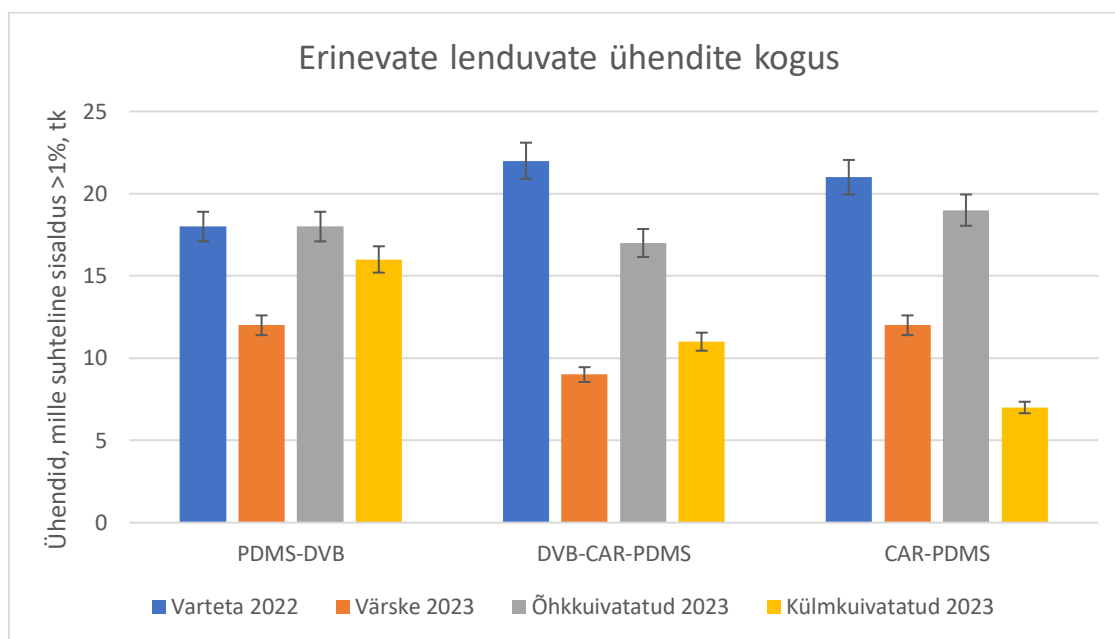
4.2 Lenduvate ühendite analüüs

Lenduvaid ühendeid analüüsiti GC-MS-iga kasutades proovi ettevalmistuseks HS-SPME-d ja HD-d. Proovide varteta 2022, värske 2023, õhkuivatatud 2023 ja külmuivatatud 2023 korral viidi katsed läbi kolme erineva polaarsuse sorbendiga, PDMS-DVB, DVB-CAR-PDMS ja CAR-PDMS, ning terve taim 2022 ja võrsed 2022 proovide korral kasutati vaid PDMS-DVB kattega fiibrit, mis andis antud töös kasutatud meetodikaga parimaid tulemusi. Hüdrodestillatsioon viidi võrdluseks läbi vaid varteta 2022 prooviga. Lenduvatest ühenditest on välja toodud vaid ained, mille suhteline sisaldus vastavas proovis oli >1% kogu kromatogrammi piikide pindalast, seejuures ei arvestatud ühendite piike, mis sisaldasid tühiproovis.

4.2.1 Tahkefaasi mikroekstraktsiooni tulemused

4.2.1.1 Ekstraktsioonisorbentide võrdlus

Uurides erinevaid sorbente, varieerusid tuvastatud ühendid nii erinevate proovide kui fiibrите vahel ning kokku tuvastati proovidest üle 70 erineva aine. Ainete täpsed loetelud on toodud lisades 1-3. Kuigi arvuliselt ühendite hulk erinevate sorbentide korral suuresti ei erinenud, saadi siiski enim, 44 erinevat ainet, kasutades PDMS-DVB kattega fiibrit. PDMS-DVB sorbendiga oli suurim ka erinevatest proovidest leitud keskmine ühendite kogus (joonis 14).



Joonis 14. Erinevate lenduvate ühendite kogus kasutades erinevaid sorbente.

Teiste sorbentidega tuvastati aga näiteks kõlmkuivatatud 2023 proovist märgatavalt vähem ühendeid, mille üheks põhjuseks võib olla parem afiinsus mitmete polaarsete ühendite, näiteks alkoholi *trans*-3-hekseen-1-ool, suhtes, mille osakaal PDMS-DVB-ga analüüsitud proovis oli 42,8%, DVB-CAR-PDMS-i ja CAR-PDMS-iga aga vastavalt 48,6% ning 66,1%. Vaadeldes aga põdrakanepis levinud ühendit mittepolaarset β -karüofülleeni, tuvastati seda kõige enam kasutades PDMS-DVB sorbenti. Tulemustest lähtuvalt sobib PDMS-DVB sorbent ilmselt neist kolmest kõige paremini erinevat tüüpi ühendite analüüsimiseks.

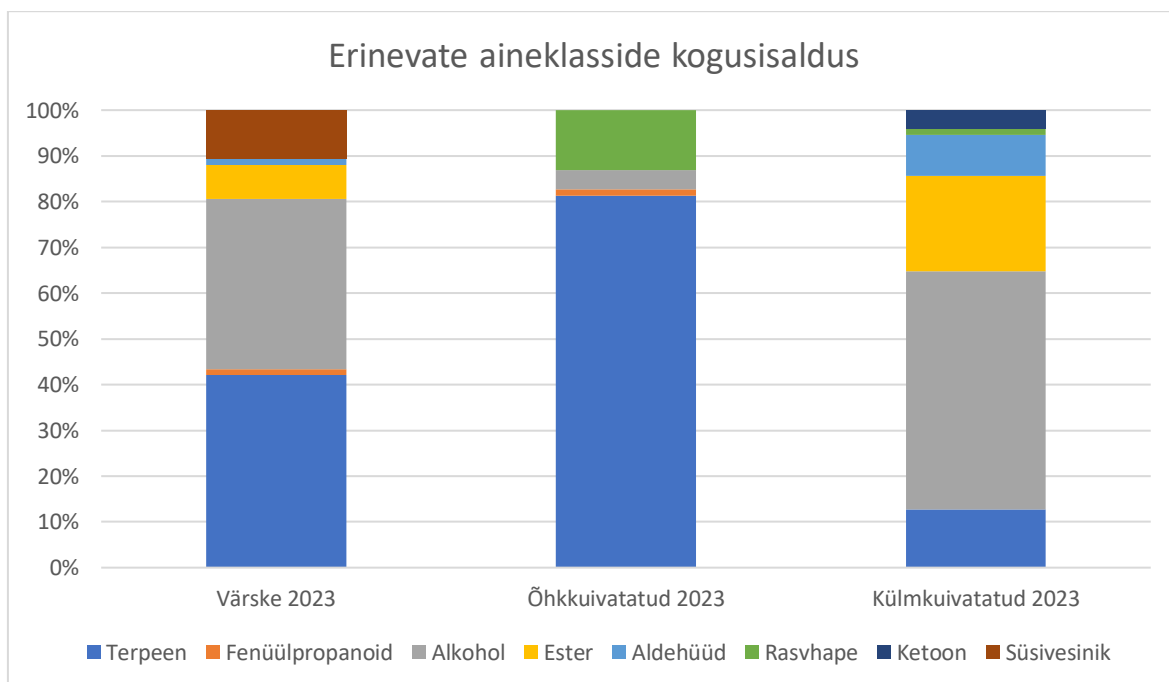
Ka kirjanduses on eelnevalt sarnaseid uuringuid läbi viidud, uurides erinevate fiibrikatete mõju lenduvate ühendite tuvastamisele. On leitud, et DVB-CAR-PDMS sorbent annab optimeeritud tingimustes parima sorptsioonivõime ning sellega on võimalik tuvastada laiem hulk erinevaid ühendeid võrreldes näiteks PDMS-DVB ja CAR-PDMS sorbentidega [53]. Analüüsides aga monoterpeene, leiti, et võrreldes nimetatud kolme sorbenti, annab parima tulemuse enantiomeeride lahutatavuse ja konkureeriva sorptsiooni mõju vähendamise seisukohalt PDMS-DVB sorbent. CAR-PDMS ja DVB-CAR-PDMS kipuvad nimelt hea afiinsuse tõttu mitmetest analüütidest küllastuma, mis takistab teiste ühendite sorptsiooni ning raskendab nimetatud ühendi enantiomeeride lahutumist [54].

Lähtuvalt eelpool toodust ning tulemustest kirjanduses, sooritati ülejäänud analüüsid terve taime 2022 ja võrsete 2022 prooviga kasutades vaid PDMS-DVB kattega fiibrit

4.2.1.2 Ekstraktsioon polüdimetüüsiloksaan-divinüülbenseen sorbendiga

Kõikide proovide keskmised analüüsitulemused PDMS-DVB sorbendiga on toodud tabelis 2, kus ainete suhtelised standardhälbed ei ületanud 7%. Kaks viimast tulpa tabelis võrdlevad antud töös saadud aineid tulemustega kirjandusest.

Analüüsid tulemusi, leidub tuvastatud ühendite hulgas erinevatesse aineklassidesse kuuluvaid aineid: alkohole, aldehüüde, estreid, terpeen, kui ka küllastumata ja küllastunud süsivesinikke. Erinevate taimeosade lenduvate ühendite võrdluses suuri varieeruvusi ei olnud, küll aga avaldas mõju kuivatamine. Kuivatusmeetodite võrdlus erinevatesse aineklassidesse kuuluvate ühendite suhteliste kontsentratsioonidega on toodud joonisel 15. Graafikult on näha, et värske proovi lenduvatest ühenditest moodustasid enamuse terpeenid ja alkoholid. Õhu käes kuivatades suurenes terpeenide sisaldus, külmuivatades aga langes oluliselt. Estreid sisaldasid vaid värske ja külmuivatatud proov. Õhkuivatades tekkisid proovi mitmed rasvhapped, mida värskest proovist >1% sisaldusega ei tuvastatud.



Joonis 15. Erinevate aineklasside kogusisaldus kuivatusmeetodite võrdluses.

Tabel 2. Proovidest tuvastatud lenduvad ühendid PDMS-DVB sorbendiga kasutades HS-SPME-GC-MS-i.

Ühend	Terve taim 2022	Varteta 2022	Võrsed 2022	Värske 2023	Õhk-kuivatatud 2023	Külm-kuivatatud 2023	Värske 2015 [11]	Õhk-kuivatatud 2015 [11]
α -amino- γ -butürolaktoon	-	-	-	-	-	13,6	-	-
alloaromandreen	< 1,0	-	1,0	-	-	-	-	-
anetool	1,9	1,3	1,7	-	1,1	-	-	3,4-46,2
aromandreen	-	1,3	< 1,0	-	< 1,0	-	-	-
bensaldehüüd	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	1,9	-	-
<i>cis</i> - α -bergamoteen	1,1	1,2	1,0	-	-	-	-	-
<i>trans</i> - α -bergamoteen	3,5	3,8	3,6	-	3,4	-	-	-
β-bisaboleen	3,7	3,8	3,8	-	2,9	-	-	0,5-2,4
β-bourbeen	-	-	-	1,9	< 1,0	1,7	0,4-4,8	0,8-7,8
2,2-dimetüülundekaan	-	-	-	9,1	-	-	-	-
etüüllauraat	-	-	-	-	-	1,3	-	-
eugenool	-	-	-	1,1	< 1,0	< 1,0	0,3-3,2	-
<i>cis</i> - β -farneseen	2,6	2,3	3,0	-	2,2	-	-	-
fenüületüülalkohol	-	< 1,0	-	< 1,0	1,7	< 1,0	0,7-4,6	0,7-4,7
heksaanhape	< 1,0	-	< 1,0	< 1,0	2,7	1,1	-	-
n-heksadekaanhape	< 1,0	< 1,0	< 1,0	-	3,7	-	-	-
heksanaal	< 1,0	< 1,0	< 1,0	1,2	-	4,6	-	-
<i>trans</i>-3-hekseen-1-ool	-	-	-	32,1	-	42,8	17,5-68,6	-
<i>cis</i> -3-heksenüül-1-atsetaat	-	-	-	-	-	1,0	-	-
<i>cis</i>-3-heksenüülbutüraat	-	-	-	-	-	1,7	2,9-10,8	-
<i>trans</i> -3-heksenüülbutüraat	-	< 1,0	-	4,6	-	-	-	-
<i>cis</i>-3-heksenüül-α-metüülbutüraat	-	-	-	1,8	-	< 1,0	1,2-20,0	0,6-1,7
(E,E)-2,4-heptadienaal	< 1,0	< 1,0	< 1,0	-	< 1,0	1,1	-	-
humuleen	-	-	< 1,0	-	8,9	3,8	1,0-15,5	3,2-21,8
β -jonoon	1,1	1,1	1,1	-	-	-	-	-
δ-kadiineen	1,3	1,4	1,5	1,2	1,1	< 1,0	-	0,5-2,4
(R)-karvon	1,1	1,3	1,1	-	1,1	-	-	-
β-karüofülleen	34,6	32,5	34,2	15,6	34,8	5,2	1,5-21,3	7,7-30,5
karüofülleenoksiid	2,0	2,1	2,2	< 1,0	1,4	-	-	-
α-kopeen	< 1,0	1,2	1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
β -kopeen	1,6	1,9	2,0	3,8	< 1,0	< 1,0	-	-
linalool	2,3	4,3	2,2	-	1,5	-	-	-
6-metüül-5-hepteen-2-oon	< 1,0	< 1,0	< 1,0	-	-	1,1	-	-
γ -muuroleen	-	< 1,0	-	1,4	-	< 1,0	-	-
(E,E)-3,5-oktadien-2-oon	< 1,0	< 1,0	< 1,0	-	< 1,0	1,1	-	-
palmitoleinhape	-	-	-	-	1,7	-	-	-
panaginseen	1,0	1,0	1,1	-	-	-	-	-
<i>cis</i> -2-penteen-1-ool	-	-	-	< 1,0	-	1,0	-	-
α -selineen	2,8	2,6	2,9	-	2,5	< 1,0	-	-
β-selineen	4,4	4,2	4,3	-	4,1	-	-	-
tetradekaanhape	-	-	-	-	1,0	-	-	-
1,1,4,8-tetrametüül- <i>cis,cis</i> ,4,7,10-tsükloundekatrieen	9,3	8,3	9,4	12,3	-	-	-	-
2,2,6-trimethüültsükloheksanoon	-	-	-	< 1,0	-	1,2	-	-
<i>cis</i> -vaktseenhape	-	-	-	-	1,0	-	-	-

Vaadeldes täpsemalt aineid, oli mitmeid ühendeid, nagu anetool, *trans*- α -bergamoteen, β -bisaboleen, *cis*- β -farneseen, (R)-karvon, linalool ja β -selineen, mida tuvastati kõikidest õhu käes kuivatatud proovidest (tabelis 2 sinisel taustal), aga mitte värskest ega külmuivatatust. Vaid üht ainet, 2,2-dimetüülundekaan (tabelis 2 roosal taustal), tuvastati ainult värskest proovist ning külmuivatatud proovist leiti antud töös ainult α -amino- γ -butürolaktooni, *cis*-3-heksenüül-1-atsetaati ning *cis*-3-heksenüül-butüraati (tabelis 2 rohelisel taustal). *Trans*-3-hekseen-1-ooli (tabelis 2 kollasel taustal), mida oli värskes proovis kõige suurem kogus, leidis lisaks vaid külmuivatatud proovis. Kõikides proovides tuvastati üle >1% sisaldusega vaid β -karüofülleen (tabelis 2 hallil taustal), mille sisaldus varieerus 5,2% külmuivatatud proovis kuni 34,8% sisalduseni õhkuivatatud proovis.

Võrreldes antud töös saadud ühendeid kirjanduses sarnase uuringuga, kus põdrakanepist analüüsiti lenduvaid ühendeid samuti SPME-ga PDMS-DVB fiibrit kasutades [11], langesid kokku vaid pea pooled ühendid, kuid nende hulgas suurima sisaldusega β -karüofülleen ja 3-hekseen-1-ool. Kokkulangenud ühendid on toodud tabelis 2 paksus kirjas. Antud töös tuvastati ka rohkem erinevaid ühendeid. Varieeruvused näitavad, et erinevast kohast erineval ajal korjatud taimed on varieeruva lenduvate ühendite sisaldusega ning olulised on ka proovi ettevalmistusmeetodid ning täpsemad analüüsingimused.

Vaadeldes kuivatusmeetodeid, on uuringuid, kus õhu käes kuivatamine vähendas taimes sisalduvatest lenduvate ühendite osakaalu [11], kuid on ka tulemusi, kus kuivatusprotsess märkimisväärset efekti ühendite kogusisaldusele ei avaldanud [55]. Küll aga on mõlemas artiklis täheldatud, et kuivatamine muudab lenduvate ühendite koostust, näiteks alkoholide sisaldus on värskes proovis kõrgem, kuna õhu käes kuivatamine võib põhjustada alkoholide oksüdeerumist aldehüüdideks [11]. Ka antud töös langes alkoholide sisaldus, ent aldehüüdide sisalduse tõusu ei täheldatud. Kuivatades vähenes ka lenduvate ühendite kogusisaldus, aga seejuures suurenes erinevate ühendite arv ning mõndade ühendite sisaldus langes alla LoD väärtuse. Uute ühendite teke, näiteks anetool, või ühendite sisalduse suurenemine, näiteks β -karüofülleen, mida täheldati nii antud töös kui ka tulemustest kirjanduses [11], võib aga vaatamata lenduvate ühendite kogusisalduse vähenemisele taime kvaliteeti tõsta, kuna nimetatud ühendeid on efektiivsed mitmete bakterite ja seente liinide vastu [56], [57].

Kylmuivatamise ehk lüofiliseerimise korral eemaldatakse proovist solvent sublimatsiooni teel, jättes vahele vedelfaasi. Kylmuivatamist peetakse võrreldes õhu käes kuivatamisega paremaks meetodiks, kuna õhu puudumine kuivatusprotsessis takistab toote oksüdeerumist ning kuivatamine madalatel temperatuuridel takistab materjali struktuuri hävinemist ning lagunemisreaktsioone, säilitades paremini ka toodete maitset ja aroomi [58], [59]. Ka antud töös leiti, et kylmuivatatud proovi lenduvate ühendite koostis sarnases rohkem värsketele proovile kui õhu käes kuivatatu oma. Samas on aga varasemalt ka vastupidiselt leitud, et mitmete taimede lenduvate ühendite koostus säilib paremini hoopis õhu käes kuivatatud proovides [60], [61]. Sarnaselt antud tööle on täheldatud [61], et kylmuivatamise käigus leiab aset terpeenide sisalduse langus, kuid samas on ka vastupidiseid tulemusi, kus terpeenide sisaldus seevastu tõusis [62].

4.2.2 Hüdrodestillatsiooni tulemused

Hüdrodestillatsiooni sooritati SPME võrdluseks vaid varteta 2022 põdrakanepi proovist, kuna seda oli kõige rohkem ning aja- ja materjalikulu tõttu ei olnud mõistlik kõiki proove selliselt eeltöödelda ja analüüsida. Tabelis 3 on toodud tulemused võrdluses SPME meetodiga ning sarnase uuringuga kirjandusest. On näha, et HD proovist tuvastati >1% suhtelise sisaldusega 26 erinevat ühendit, mis on rohkem kui vastava proovi SPME meetodil. Samu ühendeid (tabelis 3 toodud sinisel taustal) oli vaid seitse: β -bisaboleen, β -jonoon, β -karüofülleen, karüofülleenoksiid, linalool, α - ja β -selineen, kuid peamised üendid olid mõlemas proovis siiski esindatud. Kui SPME-ga saadud tulemustest moodustas proovis suurima sisalduse β -karüofülleen, mida oli 32,5%, siis HD proovis oli seda aga vaid 4,9% ning seal oli enim karüofülleeni tema oksiidises derivaadis (11,5%).

Tabel 3. HD tulemused võrdluses SPME tulemustega antud tööst ja HD tulemustega kirjandusest.

Ühend	SPME Varteta 2022	HD Varteta 2022	HD 2021 [10]	Ühend	SPME Varteta 2022	HD Varteta 2022	HD 2021 [10]
anetool	1,3	-	1,9	palustrool	-	2,6	-
aromandreen	1,3	-	-	panaginseen	1,0	-	-
<i>cis</i> - α -bergamoteen	1,2	-	-	perhüdrofarnesüülsetoon	< 1,0	10,9	-
<i>trans</i> - α -bergamoteen	3,8	< 1,0	-	δ -kadineen	1,4	-	0,6
β -bisaboleen	3,8	2,7	-	4-(7,7-dimetüül-4-bitsüklo[4.1.0]hept-3-enüül)butaan-2-oon	-	3,5	-
β -damastsenoon	-	1,6	-	(R)-karvon	1,3	< 1,0	4,0
dehüdro- β -jonoon	-	2,7	-	β-karüofülleen	32,5	4,9	6,8
10,10-dimetüül-2,6-dimetüleebitsüklo[7.2.0]undekaan-5-ool	< 1,0	1,5	-	karüofülleenoksiid	2,1	11,5	8,6
eugenool	-	1,1	-	α -kopeen	1,2	-	-
farnesüülsetoon	-	1,2	-	β -kopeen	1,9	-	-
ftaalhape	-	2,7	-	linalool	4,3	1,5	4,5
<i>cis</i> - β -farneseen	2,3	< 1,0	-	α -selineen	2,6	1,7	-
heneikosaan	< 1,0	3,8	-	β -selineen	4,2	2,5	-
humuleen	-	2,8	2,5	α -terpinüülpropionaat	-	1,2	-
β -jonoon	1,1	3,0	-	tetrakosaan	-	1,9	-
<i>trans</i> -longipinokarveool	-	1,3	-	5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimetüülbensfuraan-2(4H)-oon	< 1,0	1,8	-
8a-metüülheksahüdro-1,8(2H,5H)-naftaleendioon	-	2,5	-	3,7,11,15-tetrametüül-1-heksadeküün-3-ool	-	1,9	-
2-naftaleenmetanool	< 1,0	1,0	-	1,1,4,8-tetrametüül- <i>cis,cis</i> ,4,7,10-tsükloundekatrieen	8,3	-	-
neofütadien	-	1,5	-				

Eelnevas sarnases uuringus [10], kus analüüsiti samuti hüdrodestillatsiooniga põdrakanepist eraldatud eeterlikku õli, tuvastati sealt võrreldes antud tööga samas suurusjärgus, täpsemalt 24 erinevat ühendit. Küll aga olid enamik aineid võrreldes antud töös saadutega erinevad. Üendid, mis kokku langesid, on toodud tabelis 3 paksus kirjas ning nendeks olid humuleen, β -karüofülleen, karüofülleenoksiid ja linalool.

Võrreldes HD-d ja SPME-d lenduvate ühendite analüüsil, on ka kirjanduses leitud, et tulemuseks on erinevad ühendid varieeruvates kogustes, ent põhigrupid on jäänud siiski samaks. HD ei sobi termolabiilsetele ühenditele, ent sellega on võimalik saada suuremas koguses kõrgema keemistemperatuuriga ühendeid. SPME on aga seevastu kiirem ning võimaldab tuvastada paremini madala keemistemperatuuriga ühendeid [63], [64].

Vaadeldes HD-d ja SPME-d proovi ettevalmistusena, on roheline keemia printsiipide seisukohast neil kahel olulised erinevused. SPME ei vaja solventi, proovi kogused on väga väikesed, võtab vähem aega tarbides seega ka vähem energiat ning jäätmeid on minimaalselt. HD korral on aga solvendi ja proovi kogused suured, protseduur võtab kauem aega tarbides rohkem energiat ning ka jäätmeid tekib seejuures rohkem.

4.3 Mittelenduvate ühendite analüüs

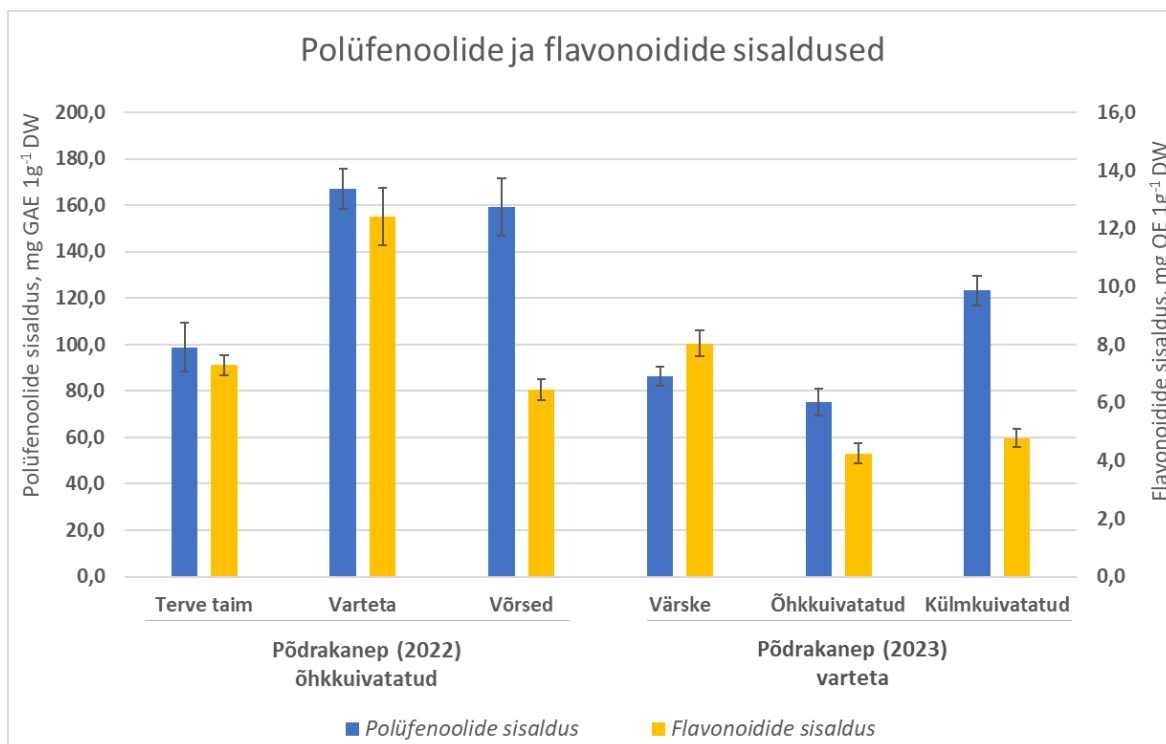
Mittelenduvate ühendite analüüsimiseks valmistati esmalt taimeproovide ekstraktid 50% etanooliga. Eesmärgiks oli taimeekstrakte võrrelda nii omavahel kui ka kirjandusega ning kasutada neid edasi mikrobioloogilisteks eksperimentideks. Ekstrakte lahjendati sobivas määras, et kolorimeetriliselt spektrofotomeetriga kvantifitseerida polüfeenolid ja flavonoidid ning CE-ga tuvastada neist levinumad ühendid.

4.3.1 Kolorimeetrilise analüüsi tulemused

Värvusreaktsioonide tulemused on toodud joonisel 16. Polüfenoolide sisaldused oli uuritud proovides vahemikus 75,2-167,1 mg GAE/g DW ning flavonoidide omad 4,3-12,4 mg QE/g DW. Võrreldes põdrakanepi erinevate taimeosade proove, oli kõrgeima polüfenoolide ja flavonoidide sisaldusega varteta 2022 proov ehk taime lehed ja õied. Kuna terve taime proovi vastavate ainete sisaldused olid märgatavalt väiksemad, võib järeldada, et taime jämedad varred fütokemikaalide poolest rikkad ei ole. Lisaks oli polüfenoolide sisaldus kõrge ka võrsete proovis, ent flavonoidide sisaldus oli seejuures võrreldes varteta prooviga pea kaks korda väiksem. Saadud tulemustest lähtuvalt kasutati erinevate kuivatusmeetodite võrdlemiseks edasi ilma varteta põdrakanepi taimi, mis korjati aastal 2023.

Võrreldes erinevaid taimeosaid, on eelnevalt leitud, et fütokemikaalide poolest on kõige rikkamad taime õied ning juured [30], [65]. Vaadeldes kirjandusest põdrakanepi uuringut [66], tuvastati suurim polüfenoolide sisaldus taime juurtest ja vartest, millele järgnesid õied ja lehed. Flavonoide tuvastati siiski samas uuringus enim lehtedest ja õitest, mille tulemused langevad kokku antud töö tulemustega.

Vaadeldes jooniselt 16 eri meetoditel kuivatatud proove, oli suurim polüfenoolide sisaldus külmuivatatud põdrakanepis, millele järgnes värskel proov. Flavonoide oli värskes proovis aga rohkem. Õhu käes kuivatamine põhjustas võrreldes värskel prooviga nimetatud fütokemikaalide sisalduste langust.



Joonis 16. Polüfenoolide ja flavonoidide sisaldused proovides.

Mitmed uuringud näitavad, et kuivatamine mängib olulist rolli polüfenoolide sisalduse langusele. Eelnevalt on teadustöödest leitud, et õhu käes kuivatamine põhjustas polüfenoolide sisalduse märgatavat muutust, vähenedes 1,5-3,5 korda. Kuivatamise mõju flavonoidide sisaldusele tendentsi ei avaldanud [11]. Antud töös seevastu vähenes märgatavalt kuivatamise käigus just flavonoidide sisaldus. Võrreldes õhu käes kuivatamisega, mis võib põhjustada ühendite oksüdeerumist, on leitud, et paremat alternatiivi pakub külmkuivatamine, mille käigus polüfenoolide sisaldus langeb vähem [67], [68]. Antud töös suurenes külmkuivatamisprotsessis polüfenoolide sisaldus võrreldes värse prooviga. Samas on külmkuivatamise puhul tegu aga aeganõudva ning spetsiaalset aparatuuri vajava protsessiga.

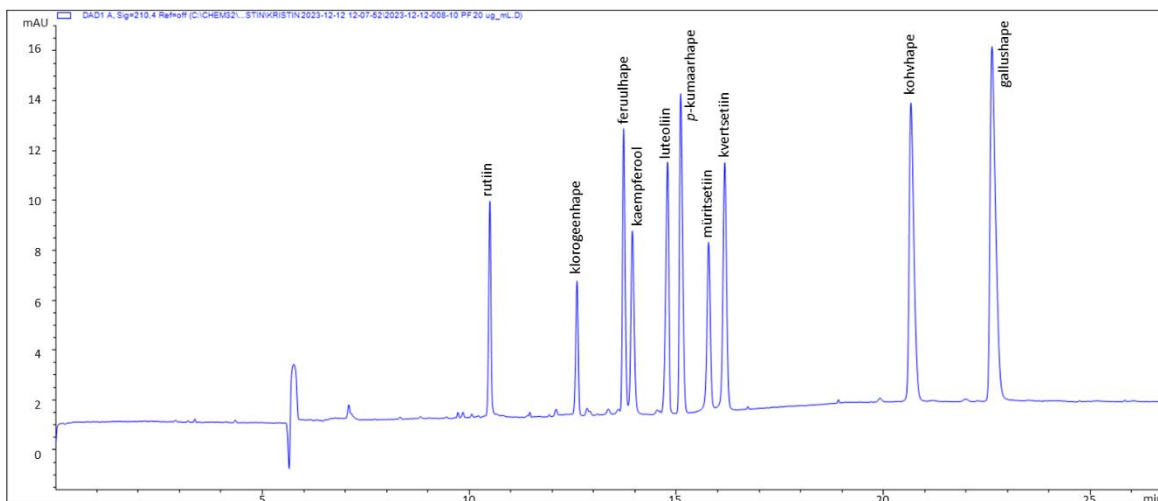
Lisaks saab antud töö tulemustest lähtuvalt võrrelda ka erinevatel aastatel samast kohast korjatud taimi. Nii on näiteks näha, et öhkkuivatatud 2022. aastal juulis korjatud varteta taim oli polüfenoolide poolest veidi enam kui kaks korda rikkam kui öhkkuivatatud 2023. aasta juuli varteta taim. Varieeruvusi võivad põhjustada erinevate aastate vahelduvad ilmastikutingimused kui ka võimalikud erinevused kuivatustingimustes.

4.3.2 Kapillaarelektroforeesi tulemused

Kapillaarelektroforeesiga analüüsiti peatükis 3.5.3 toodud analüüsingimustel kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt kümnet kirjanduse alusel põdrakanepis leiduvat polüfenoolset ühendit: rutiini, klorogeenhapet, feruulhapet, kaempferooli, luteoliini, *p*-kumaarhapet, müritsetiini, kvartsetiini kohvhapet ja gallushapet, varteta 2022, värsest 2023, öhkkuivatatud 2023 ja külmkuivatatud 2023 proovidest. Selleks koostati igale ainele kalibreerimisgraafik, arvutati LoD ja LoQ väärtused kahel

meetodil, hinnati matriksefeki ning polüfenoolid tuvastati ja kvantifitseeriti võrreldes rikastamata ja rikastatud proovide signaale ning vaadeldes ainete neeldumisspektreid.

Kümne polüfenooli standardainete (50% etanoolis) elektroferogramm, mis detekteeriti lainepikkusel 210 nm, on toodud joonisel 17. Lisas 4 on toodud ka igale ainele iseloomulikud neeldumisspektrid ning lisas 5 ainete struktuurid.



Joonis 17. Standardainete elektroferogramm.

Tabelis 4 on toodud antud CE meetodikale iseloomulikud LoD ja LoQ väärtused igale standardainele iseloomulikul lainepikkusel, lisaks ka kalibreerimisgraafiku sirge võrrand ning korrelatsiooni koefitsendi R^2 väärtus. Nimetatud parameetrite väärtused arvutati vastavalt peatükis 3.5.3 selgitatud meetodikatele.

Tabel 4. Analüüsitud polüfenoolide kalibreerimisgraafikute sirge võrrandid, korrelatsioonikordaja ruudud (R^2) ning LoD ja LoQ väärtused: leitud kalibratsioonikõvera järgi^a, leitud kasutades S/N suhet^b.

	Detekteeritav lainepikkus (nm)	Kalibreerimisgraafiku sirge võrrand	Korrelatsioonikordaja ruut (R^2)	LoD ^a (µg/mL)	LoD ^b (µg/mL)	LoQ ^a (µg/mL)	LoQ ^b (µg/mL)
Rutiin	270	$y=1,0141x-0,0921$	0,9987	0,3	0,3	1,0	0,9
Klorogeenhape	345	$y=1,4344x-0,4394$	0,9933	0,4	0,2	1,4	0,7
Luteoliin	265	$y=1,5759x-0,2865$	0,9965	0,5	0,3	1,7	1,1
p-kumaarhape	300	$y=3,6931x-0,6843$	0,9966	0,4	0,2	1,5	0,7
Kohvhape	330	$y=4,0001x-0,9238$	0,9960	0,5	0,2	1,6	0,6
Gallushape	270	$y=2,6905x-1,1114$	0,9930	0,5	0,3	1,7	0,9
Feruulhape	345	$y=2,0592x-0,4334$	0,9917	0,7	0,4	2,2	1,3
Kaempferool	330	$y=1,5907x+0,2379$	0,9978	0,2	0,3	0,7	0,9
Müritsetiin	265	$y=0,8734x-0,8865$	0,9917	0,8	0,7	2,7	5,0
Kvertsetiin	270	$y=1,0485x-0,1798$	0,9990	0,5	0,3	1,7	2,5

Maatriksefekt määrati lähtudes analüüdi piigi pindalast rikastatud proovis ja sama analüüdi pindalast standardlahuses, mõõtes igat polüfenoolset ühendit temale iseloomulikul lainepikkusel. Hinnatud matriksefekt jäi alla 20%, välja arvatud kaempferooli, müritsetiini ja kvertsetiini korral.

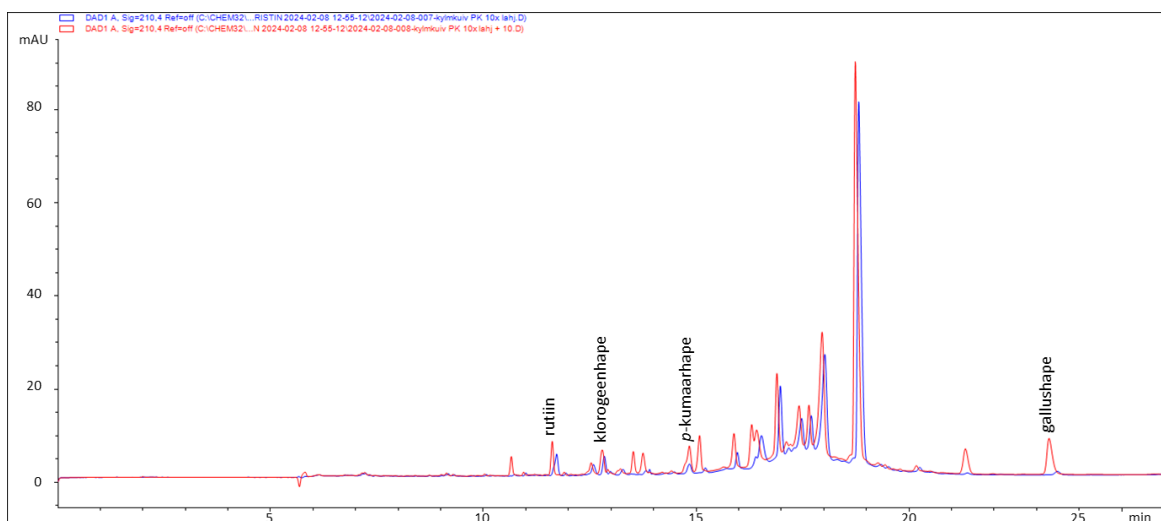
Tabelis 5 on toodud kvantifitseeritud polüfenoolid: klorogeenhape, gallushape, rutiin ja *p*-kumaarhape. Luteoliin, feruulhape, kaempferool, müritsetiin, kvertsetiin ja kohvhape puuduvad tabelist, kuna nende sisaldus oli igas proovis väiksem LoD väärtusest. Vaadates tulemusi, tuvastati kõikidest proovidest vaid klorogeen- ja gallushape, mida kõige enam oli varteta 2022 proovis. Kõige rohkem erinevaid ühendeid detekteeriti aga külmuivatatud 2023 proovist.

Tabel 5. Kvantifitseeritud polüfenoolid.

mg/g DW	Õhkuivatatud	Varteta		
	Varteta 2022	Värske 2023	Õhkuivatatud 2023	Külmuivatatud 2023
Klorogeenhape	2,8	1,5	1,2	1,5
Gallushape	0,6	<LoQ	0,4	0,2
Rutiin	<LoD	<LoD	0,6	0,6
<i>p</i> -kumaarhape	<LoD	<LoD	<LoD	0,3

Suhteline standardhälve ei ületanud 10%.

Vaadeldes külmuivatatud pödrakanepi näitel proovi elektroferogrammi (joonis 18), mis detekteeriti lainepikkusel 210 nm, on näha, et ühendite tuvastamist segasid tundmatute ainete piigid. Lisaks esinevad flavonoidid taimedes enamasti glükeeritud derivaatidena [16], mida antud meetodikaga tuvastada ei olnud võimalik.



Joonis 18. Külmuivatatud proovi elektroferogramm: sinisega proov, punasega rikastatud proov.

Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli iseloomustada Eestis kasvava ahtalehise põdrakanepi fütokeemilist koostist. Selleks võrreldi nii erinevaid taimeosasisid kui ka kuivatusmeetodeid, kasutades lenduvate ühendite proovi ettevalmistuseks tahkefaasi mikroekstraktsiooni ja hüdrodestillatsiooni ning mittelenduvate ühendite jaoks ultraheli ekstraktsiooni. Proove analüüsiti gaasikromatograaf-massispektromeetri, UV-Vis spektrofotomeetri ning kapillaarelektroforeesiga koos UV-detekteerimisega.

Proovidest tuvastati kokku üle 70 erineva lenduva ühendi, mille hulgas olid nii terpeenid, fenüülpropanoidid, rasvhapete derivaadid, alkoholid, estrid, eetrid, ketoonid kui ka süsivesinikud. Suurima sisaldusega olid β -karüofülleen ja *trans*-3-hekseen-1-ool. Võrreldes omavahel tervet taime, taime ilma varteta ning võrseid, lenduvate ühendite hulgas suuri erinevusi ei täheldatud. Vaadeldes aga värsket, õhu käes kuivatatud ja külmuivatatud proove, olid erinevused märkimisväärsed. Kuigi värskes proovis tuvastati kogusisalduselt enim lenduvaid ühendeid, oli erinevaid aineid enim siiski külmuivatatud proovis. Viimases proovis olid ühendid võrreldes õhu käes kuivatatud prooviga ka sarnasemad värsketele taimele. Hüdrodestillatsiooniga tuvastati rohkem erinevaid ühendeid kui tahkefaasi mikroekstraktsiooniga, ent kuigi ühendite kokkulangevus oli väike, olid siiski peamised ühendid nagu β -karüofülleen ja karüofülleenoksiid esindatud mõlemas proovis.

Mittelenduvate ühendite analüüsil kolorimeetriliselt varieerusid polüfenoolide ja flavonoidide sisaldused samuti erinevates proovides. Polüfenoolide sisaldused olid vahemikus 75,2-167,1 mg GAE/g DW ning flavonoidide omad 4,3-12,4 mg QE/g DW. Võrreldes taime erinevaid osasisid, oli suurim polüfenoolide sisaldus ilma varteta proovis, väikseim aga terves taimes. Analüüsides kuivatusmeetodeid, oli enim polüfenoolide külmuivatatud proovis, ent flavonoidide värskes. Kapillaarelektroforeesiga enim põdrakanepis levinud polüfenoolide kindlaks määramisel tuvastati kõikidest proovidest vaid klorogeenhape (1,2-2,8 mg/g DW) ning gallushape (kuni 0,6 mg/g DW) ning enim, neli polüfenooli kvantifitseeriti külmuivatatud proovis.

Töös saadud tulemused ning võrdlused kirjandusega kinnitasid, et taime fütokeemiline koostis on sõltuv tema geograafilisest kasvukohast, aga varieerub olenevalt kliimast ka näiteks erinevate aastate lõikes. Lisaks sõltub tuvastavate ühendite kogus ja koostis erinevatest taimeosadest ning proovi ettevalmistusmeetodist. Käesoleva töö käigus valmistatud ekstrakte kasutati edasi *Borrelia* bakterite vastase aktiivsuse uurimiseks.

Abstract

The aim of this master's thesis was to characterize the phytochemical composition of fireweed (*Epilobium angustifolium*) growing in Estonia, comparing various plant parts and drying methods. For sample preparation, solid-phase microextraction and hydrodistillation were used for volatile organic compounds, and ultrasound extraction for polyphenols. Samples were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry, UV-Vis spectroscopy, and capillary electrophoresis with UV detection. The work was part of the project „Evaluation of the antioxidant and antibacterial activity of plant extracts“.

In total, over 70 different volatile organic compounds were identified in the samples, including terpenes, phenylpropanoids, fatty acid derivatives, alcohols, esters, ethers, ketones, and hydrocarbons. The volatiles with the highest contents detected were β -caryophyllene and *trans*-3-Hexen-1-ol. Comparing whole plant, plant without stem, and shoots, significant differences in volatile compounds were not observed. However, there were remarkable differences between fresh, air-dried, and freeze-dried samples. Although the highest total amount of volatile compounds was found in the fresh sample, the freeze-dried sample contained the highest variety of compounds. The compounds in the freeze-dried sample were more similar to those in the fresh plant compared to the air-dried sample. Hydrodistillation identified more different compounds than solid-phase microextraction. Although there was not much overlap in the composition of compounds between the two samples, the main compounds, such as β -caryophyllene and caryophyllene oxide, were present in both.

In the analysis of non-volatile compounds, the concentrations of polyphenols and flavonoids varied among different samples. The concentrations of polyphenols ranged from 75.2 to 167.1 mg GAE/g DW, and flavonoids ranged from 4.3 to 12.4 mg QE/g DW. The highest polyphenol content was found in the sample without stems, while the lowest was in the whole plant. Analyzing drying methods, more polyphenols were found in the freeze-dried sample, but more flavonoids in the fresh sample. Capillary electrophoresis identified only chlorogenic acid (1.2-2.8 mg/g DW) and gallic acid (up to 0.6 mg/g DW) in all samples, and the most polyphenols quantified in a single sample were four, which were found in the freeze-dried sample.

The results obtained in this study, along with comparisons to the literature, confirmed that fireweed is a valuable source of phytochemicals. However, the composition depends on its geographical location and on climatic conditions and varies between different plant parts. In addition, the amount and composition of the extracted phytochemicals are highly dependent on the sample preparation procedure. The extracts prepared in this work were further used to study the activity against *Borrelia* bacteria.

Tänuavaldused

Töö autor soovib tänada juhendajat Piia Jõuli ja kaasjuhendajat Merike Vaherit igakülgse juhendamise ja toe eest nii praktiliste tööde sooritamisel kui ka antud magistritöö kirjutamisel. Samuti soovitakse tänada Keemia ja biotehnoloogia Instrumentaalanalüüsi teaduslaborit, kus antud töö eksperimentaalne osa läbi viidi. Magistritöö valmis projekti „Taimreekstraktide antioksidatiivse ja antibakteriaalse aktiivsuse hindamine“ raames, mille projektjuhiks on Merike Vaher.

Annotatsioon

Antud magistritöö eesmärgiks oli iseloomustada ühe levinud ravimtaime, Eestis kasvava ahtalehise põdrakanepi (*Epilobium angustifolium*), fütokeemilist koostist, võrreldes omavahel nii taime erinevaid osasid kui ka kuivatusmeetodeid. Töös analüüsiti eraldi lenduvaid orgaanilisi ühendeid ja mittelenduvaid polüfenoole.

Lenduvate ühendite eraldamiseks kasutati tahkefaasi mikroekstraktsiooni ja hüdrodestillatsiooni ning proove analüüsiti gaasikromatograaf-massispektromeetriga. Tulemusena tuvastati proovidest üle 70 erineva ühendi, mis varieerusid suuresti erinevate proovide vahel. Kõige enam leiti erinevaid aineid õhu käes kuivatatud proovidest hüdrodestillatsiooni käigus. Ühend, mida sisaldasid kõik analüüsitud proovid, oli β -karüofülleen.

Polüfenoolide (sh flavonoidide) kogused kvantifitseeriti kasutades kolorimeetrilist analüüsi, mõõtes värvusreaktsioone UV-Vis spektrofotomeetriga. Suurimad polüfenoolide sisaldused mõõdeti taime õites ja lehtedes ning külmuivatatud proovis. Kapillaarelektroforeesiga tuvastati mõõdetud proovidest klorogeen- ja gallushape.

Töö tulemused näitasid, et ahtalehine põdrakanep on fütokeemikaalide poolest rikas, ent koostis varieerub taime erinevate osade vahel ning tuvastatud ühendite kooslus on suuresti sõltuv ka proovi ettevalmistusmetoodikast.

Kasutatud kirjandus

- [1] E. Salmerón-Manzano, J. A. Garrido-Cardenas, ja F. Manzano-Agugliaro, „Worldwide Research Trends on Medicinal Plants“, *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, kd 17, nr 10, lk 3376, mai 2020, doi: 10.3390/ijerph17103376.
- [2] A. Adamczak, M. Dreger, K. Seidler-Łożykowska, ja K. Wielgus, „Fireweed (*Epilobium angustifolium* L.): botany, phytochemistry and traditional uses. A review“, *Herba Pol.*, kd 65, lk 51–63, sept 2019, doi: 10.2478/hpo-2019-0018.
- [3] R. Sõukand *et al.*, „Inventing a herbal tradition: The complex roots of the current popularity of *Epilobium angustifolium* in Eastern Europe“, *J. Ethnopharmacol.*, kd 247, lk 112254, jaan 2020, doi: 10.1016/j.jep.2019.112254.
- [4] A. Nowak *et al.*, „*Epilobium angustifolium* L. Extracts as Valuable Ingredients in Cosmetic and Dermatological Products“, *Molecules*, kd 26, nr 11, lk 3456, juuni 2021, doi: 10.3390/molecules26113456.
- [5] A. Kumar *et al.*, „Major Phytochemicals: Recent Advances in Health Benefits and Extraction Method“, *Molecules*, kd 28, nr 2, lk 887, jaan 2023, doi: 10.3390/molecules28020887.
- [6] M. E. Maffei, J. Gertsch, ja G. Appendino, „Plant volatiles: production, function and pharmacology“, *Nat. Prod. Rep.*, kd 28, nr 8, lk 1359–1380, aug 2011, doi: 10.1039/c1np00021g.
- [7] N. J. Sadgrove, G. F. Padilla-González, ja M. Phumthum, „Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication“, *Plants*, kd 11, nr 6, lk 789, märts 2022, doi: 10.3390/plants11060789.
- [8] J. Picazo-Aragonés, A. Terrab, ja F. Balao, „Plant Volatile Organic Compounds Evolution: Transcriptional Regulation, Epigenetics and Polyploidy“, *Int. J. Mol. Sci.*, kd 21, nr 23, lk 8956, nov 2020, doi: 10.3390/ijms21238956.
- [9] A. Masyita *et al.*, „Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives“, *Food Chem. X*, kd 13, lk 100217, jaan 2022, doi: 10.1016/j.fochx.2022.100217.
- [10] A. Nowak *et al.*, „*Epilobium angustifolium* L. Essential Oil—Biological Activity and Enhancement of the Skin Penetration of Drugs—In Vitro Study“, *Molecules*, kd 26, nr 23, lk 7188, nov 2021, doi: 10.3390/molecules26237188.
- [11] V. Kaškonienė *et al.*, „Evaluation of phytochemical composition of fresh and dried raw material of introduced *Chamerion angustifolium* L. using chromatographic, spectrophotometric and chemometric techniques“, *Phytochemistry*, kd 115, lk 184–193, juuli 2015, doi: 10.1016/j.phytochem.2015.02.005.
- [12] V. Kaškonienė *et al.*, „Screening of antioxidant activity and volatile compounds composition of *Chamerion angustifolium* (L.) Holub ecotypes grown in Lithuania“, *Nat. Prod. Res.*, kd 30, nr 12, lk 1373–1381, juuni 2016, doi: 10.1080/14786419.2015.1058792.
- [13] A. Rana, M. Samtiya, T. Dhewa, V. Mishra, ja R. E. Aluko, „Health benefits of polyphenols: A concise review“, *J. Food Biochem.*, kd 46, nr 10, lk e14264, 2022, doi: 10.1111/jfbc.14264.

- [14] I. A. Schepetkin, A. G. Ramstead, L. N. Kirpotina, J. M. Voyich, M. A. Jutila, ja M. T. Quinn, „Therapeutic Potential of Polyphenols from *Epilobium angustifolium* (Fireweed)“, *Phytother. Res. PTR*, kd 30, nr 8, lk 1287–1297, aug 2016, doi: 10.1002/ptr.5648.
- [15] A. N. Panche, A. D. Diwan, ja S. R. Chandra, „Flavonoids: an overview“, *J. Nutr. Sci.*, kd 5, 2016, doi: 10.1017/jns.2016.41.
- [16] B. Hevesi Tóth, B. Blazics, ja Á. Kéry, „Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species“, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, kd 49, nr 1, lk 26–31, jaan 2009, doi: 10.1016/j.jpba.2008.09.047.
- [17] S. Stanner ja E. Weichselbaum, „Antioxidants“, *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*, B. Caballero, Toim, Waltham: Academic Press, 2013, lk 88–99. doi: 10.1016/B978-0-12-375083-9.00013-1.
- [18] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, ja G. Paganga, „Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids“, *Free Radic. Biol. Med.*, kd 20, nr 7, lk 933–956, 1996, doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.
- [19] R. Tsao, „Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols“, *Nutrients*, kd 2, nr 12, lk 1231–1246, dets 2010, doi: 10.3390/nu2121231.
- [20] G. Serreli ja M. Deiana, „In vivo formed metabolites of polyphenols and their biological efficacy“, *Food Funct.*, kd 10, nr 11, lk 6999–7021, nov 2019, doi: 10.1039/c9fo01733j.
- [21] M. K. L. Bicking, „EXTRACTION | Analytical Extractions“, *Encyclopedia of Separation Science*, I. D. Wilson, Toim, Oxford: Academic Press, 2000, lk 1371–1382. doi: 10.1016/B0-12-226770-2/02271-7.
- [22] C. F. Poole, „EXTRACTION | Solid-Phase Extraction“, *Encyclopedia of Separation Science*, I. D. Wilson, Toim, Oxford: Academic Press, 2000, lk 1405–1416. doi: 10.1016/B0-12-226770-2/02141-4.
- [23] C. L. Arthur ja Janusz. Pawliszyn, „Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers“, *Anal. Chem.*, kd 62, nr 19, lk 2145–2148, okt 1990, doi: 10.1021/ac00218a019.
- [24] H. Lord ja J. Pawliszyn, „Evolution of solid-phase microextraction technology“, *J. Chromatogr. A*, kd 885, nr 1, lk 153–193, juuli 2000, doi: 10.1016/S0021-9673(00)00535-5.
- [25] C. Lancioni, C. Castells, R. Candal, ja M. Tascon, „Headspace solid-phase microextraction: Fundamentals and recent advances“, *Adv. Sample Prep.*, kd 3, lk 100035, aug 2022, doi: 10.1016/j.sampre.2022.100035.
- [26] S. Armenta, S. Garrigues, ja M. de la Guardia, „The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry“, *TrAC Trends Anal. Chem.*, kd 71, lk 2–8, sept 2015, doi: 10.1016/j.trac.2014.12.011.
- [27] S. Armenta, S. Garrigues, F. A. Esteve-Turrillas, ja M. de la Guardia, „Green extraction techniques in green analytical chemistry“, *TrAC Trends Anal. Chem.*, kd 116, lk 248–253, juuli 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.03.016.
- [28] Á. I. López-Lorente, F. Pena-Pereira, S. Pedersen-Bjergaard, V. G. Zuin, S. A. Ozkan, ja E. Psillakis, „The ten principles of green sample preparation“, *TrAC Trends Anal. Chem.*, kd 148, lk 116530, märts 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116530.

- [29] R. E. Shirey, „4 - SPME Commercial Devices and Fibre Coatings“, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, J. Pawliszyn, Toim, Oxford: Elsevier, 2012, lk 99–133. doi: 10.1016/B978-0-12-416017-0.00004-8.
- [30] P.-R. Laanet, P. Saar-Reismaa, P. Jõul, O. Bragina, ja M. Vaher, „Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Selected Estonian Galium Species“, *Molecules*, kd 28, nr 6, Art. nr 6, jaan 2023, doi: 10.3390/molecules28062867.
- [31] A. L. C. C. Ramos *et al.*, „Chemical Approach to the Optimization of Conditions Using HS-SPME/GC-MS for Characterization of Volatile Compounds in Eugenia brasiliensis Fruit“, *Mol. Basel Switz.*, kd 27, nr 15, lk 4955, aug 2022, doi: 10.3390/molecules27154955.
- [32] K. Kumar, S. Srivastav, ja V. S. Sharanagat, „Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review“, *Ultrason. Sonochem.*, kd 70, lk 105325, sept 2020, doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105325.
- [33] F. Chemat, N. Rombaut, A.-G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.-S. Fabiano-Tixier, ja M. Abert-Vian, „Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review“, *Ultrason. Sonochem.*, kd 34, lk 540–560, jaan 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.
- [34] A. R. Abubakar ja M. Haque, „Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes“, *J. Pharm. Bioallied Sci.*, kd 12, nr 1, lk 1–10, 2020, doi: 10.4103/jpbs.JPBS_175_19.
- [35] E. Brglez Mojzer, M. Knez Hrnčič, M. Škerget, Ž. Knez, ja U. Bren, „Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects“, *Molecules*, kd 21, nr 7, lk 901, juuli 2016, doi: 10.3390/molecules21070901.
- [36] P. Tongnuanchan ja S. Benjakul, „Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation“, *J. Food Sci.*, kd 79, nr 7, lk R1231–R1249, 2014, doi: 10.1111/1750-3841.12492.
- [37] J. Azmir *et al.*, „Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review“, *J. Food Eng.*, kd 117, nr 4, lk 426–436, aug 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- [38] S. Ray, „Hydro distillation“, Pharmacy Scope. Vaadatud: 1. märts 2024. [Online]. Available at: <https://pharmacyscope.com/hydro-distillation/>
- [39] L. S. Ettre, „Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993)“, *Pure Appl. Chem.*, kd 65, nr 4, lk 819–872, jaan 1993, doi: 10.1351/pac199365040819.
- [40] H. M. McNair ja J. M. Miller, *Basic gas chromatography*, 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2009.
- [41] M. Kaljurand ja R. Kuldvee, *Instrumentaalanalüüs. III*. Tallinn: Tallinna Tehnikaülikool, 1997.
- [42] D. C. Harris, *Quantitative chemical analysis*, 8th ed., International ed. New York (N.Y.): W.H. Freeman, 2010.
- [43] T. A. Germer, J. C. Zwinkels, ja B. K. Tsai, „Chapter 2 - Theoretical Concepts in Spectrophotometric Measurements“, *Experimental Methods in the Physical Sciences*, kd 46, T. A. Germer, J. C. Zwinkels, ja B. K. Tsai, Toim, Spectrophotometry, vol. 46. , Academic Press, 2014, lk 11–66. doi: 10.1016/B978-0-12-386022-4.00002-9.
- [44] F. Rouessac ja A. Rouessac, *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*. Wiley, 2007.

- [45] R. M. Lamuela-Raventós, „Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity“, *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity*, John Wiley & Sons, Ltd, 2018, lk 107–115. doi: 10.1002/9781119135388.ch6.
- [46] B. Christ ja K. H. Müller, „Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen“, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, kd 293, nr 12, lk 1033–1042, 1960, doi: 10.1002/ardp.19602931202.
- [47] A. M. Shraim, T. A. Ahmed, M. M. Rahman, ja Y. M. Hijji, „Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation“, *LWT*, kd 150, lk 111932, okt 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111932.
- [48] J. Aupiais ja F. Chartier, „Chapter 6 - Capillary electrophoresis“, *Sample Introduction Systems in ICPMS and ICPOES*, D. Beauchemin, Toim, Amsterdam: Elsevier, 2020, lk 299–356. doi: 10.1016/B978-0-444-59482-2.00006-3.
- [49] A. Przybylska, M. Gackowski, ja M. Koba, „Application of Capillary Electrophoresis to the Analysis of Bioactive Compounds in Herbal Raw Materials“, *Molecules*, kd 26, nr 8, lk 2135, apr 2021, doi: 10.3390/molecules26082135.
- [50] M. Koel ja M. Kaljurand, *Usaldusväärased mõõtmised keemias*. Tallinna Tehnikaülikool: Tallinn, 2020.
- [51] M. Dangkulwanich ja T. Charaslertrangsi, „Hydrodistillation and antimicrobial properties of lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*, Stapf): An undergraduate laboratory exercise bridging chemistry and microbiology“, *J. Food Sci. Educ.*, kd 19, nr 2, lk 41–48, 2020, doi: 10.1111/1541-4329.12178.
- [52] M. Vaher *et al.*, „Automatic spot preparation and image processing of paper microzone-based assays for analysis of bioactive compounds in plant extracts“, *Food Chem.*, kd 143, lk 465–471, jaan 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.007.
- [53] P. Mehta, M. Galvão, A. Soares, J. Nogueira, ja N. Narain, „Volatile Constituents of Jambolan (*Syzygium cumini* L.) Fruits at Three Maturation Stages and Optimization of HS-SPME GC-MS Method Using a Central Composite Design“, *Food Anal. Methods*, kd 11, lk 1–17, märts 2018, doi: 10.1007/s12161-017-1038-4.
- [54] Y. Nouredine, T. Custer, W. Song, P. F. K. J, ja J. Williams, „Quantitative and enantioselective analysis of monoterpenes from plant chambers and in ambient air using SPME“, *Atmospheric Meas. Tech. Discuss.*, kd 3, nov 2010, doi: 10.5194/amt-3-1615-2010.
- [55] W. Zhang *et al.*, „Comparison of volatile components in fresh and dried *Zanthoxylum bungeanum* Maxim“, *Food Sci. Biotechnol.*, kd 28, nr 4, lk 1083–1092, jaan 2019, doi: 10.1007/s10068-019-00562-3.
- [56] I. Kubo, K. Fujita, ja K. Nihei, „Antimicrobial activity of anethole and related compounds from aniseed“, *J. Sci. Food Agric.*, kd 88, nr 2, lk 242–247, 2008, doi: 10.1002/jsfa.3079.
- [57] S. S. Dahham *et al.*, „The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*“, *Molecules*, kd 20, nr 7, lk 11808–11829, juuni 2015, doi: 10.3390/molecules200711808.
- [58] A. Putranto ja X. D. Chen, „Drying in Biotechnology☆“, *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*, M. Moo-Young, Toim, Oxford: Pergamon, 2019, lk 820–833. doi: 10.1016/B978-0-444-64046-8.00102-6.

- [59] S. L. Nail, S. Jiang, S. Chongprasert, ja S. A. Knopp, „Fundamentals of freeze-drying“, *Pharm. Biotechnol.*, kd 14, lk 281–360, 2002, doi: 10.1007/978-1-4615-0549-5_6.
- [60] M. C. Hidalgo, M. Perez-Coello, ja M. Cabezudo, „Effect of different drying methods on the volatile components of parsley (*Petroselinum crispum* L.)“, *Eur. Food Res. Technol.*, kd 215, lk 227–230, sept 2002, doi: 10.1007/s00217-002-0529-7.
- [61] M. C. Díaz-Maroto, M. S. Pérez-Coello, M. A. González Viñas, ja M. D. Cabezudo, „Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.)“, *J. Agric. Food Chem.*, kd 51, nr 5, lk 1265–1269, veebr 2003, doi: 10.1021/jf020805l.
- [62] D. Abouelenein *et al.*, „Influence of Freezing and Different Drying Methods on Volatile Profiles of Strawberry and Analysis of Volatile Compounds of Strawberry Commercial Jams“, *Molecules*, kd 26, nr 14, lk 4153, juuli 2021, doi: 10.3390/molecules26144153.
- [63] A. Kowalczyk, P. Kuś, Z. Marijanović, C. I. G. Tuberoso, I. Fecka, ja I. Jerković, „Headspace Solid-Phase Micro-Extraction Versus Hydrodistillation of Volatile Compounds from Leaves of Cultivated *Mentha* Taxa: Markers of Safe Chemotypes“, *Molecules*, kd 27, nr 19, lk 6561, okt 2022, doi: 10.3390/molecules27196561.
- [64] K. Skalicka-Wozniak, R. Los, K. Glowniak, ja A. Malm, „Comparison of Hydrodistillation and Headspace Solid-Phase Microextraction Techniques for Antibacterial Volatile Compounds from the Fruits of *Seseli Libanotis*“, *Nat. Prod. Commun.*, kd 5, nr 9, lk 1934578X1000500916, sept 2010, doi: 10.1177/1934578X1000500916.
- [65] S. K. Pradhan ja V. Sharma, „Polyphenols in Different Plant Parts of *Inula grandiflora* Collected from Two Habitats of Uttarakhand Himalayas“, *J. Herbs Spices Med. Plants*, kd 29, nr 2, lk 199–212, apr 2023, doi: 10.1080/10496475.2022.2128137.
- [66] S. Jürgenson, V. Matto, ja A. Raal, „Vegetational variation of phenolic compounds in *Epilobium angustifolium*“, *Nat. Prod. Res.*, kd 26, lk 1951–3, dets 2011, doi: 10.1080/14786419.2011.643310.
- [67] S. Tan *et al.*, „Effects of three drying methods on polyphenol composition and antioxidant activities of *Litchi chinensis* Sonn.“, *Food Sci. Biotechnol.*, kd 29, nr 3, lk 351–358, okt 2019, doi: 10.1007/s10068-019-00674-w.
- [68] J. Y. Yap, C. L. Hii, S. P. Ong, K. H. Lim, F. Abas, ja K. Y. Pin, „Effects of drying on total polyphenols content and antioxidant properties of *Carica papaya* leaves“, *J. Sci. Food Agric.*, kd 100, nr 7, lk 2932–2937, mai 2020, doi: 10.1002/jsfa.10320.

LISAD

Lisa 1. Lenduvad ühendid DVB-CAR-PDMS sorbendiga

Ühend	CAS	Varteta 2022	Värske 2023	Õhk-kuivatatud 2023	Külm-kuivatatud 2023
<i>trans</i> - α -bergamoteen	13474-59-4	2,3	-	3,2	1
β -bisaboleen	495-61-4	6,5	-	3,3	<1,0
β -bourbeen	5208-59-3	<1,0	1,1	<1,0	<1,0
10,10-dimetüül-2,6-dimetüleenbitsüklo[7,2,0]undekaan	357414-37-0	1,2	-	1,4	<1,0
estragool	140-67-0	1,5	-	-	<1,0
fenüületüülalkohol	60-12-8	-	1,4	2,3	1,1
heksaanhape	142-62-1	-	-	4,4	1,2
heksanaal	66-25-1	1,7	-	<1,0	2,7
1-heksanool	111-27-3	-	-	-	9,7
<i>trans</i> -3-hekseen-1-ool	928-97-2	-	28,5	-	48,6
<i>trans</i> -3-heksenüülbutüraat	53398-84-8	-	3,7	-	<1,0
<i>cis</i> -3-heksenüül- α -metüülbutüraat	53398-85-9	-	2,3	-	<1,0
humuleen	6753-98-6	-	-	9,4	2,8
isoaromandreeneepoksiid	1000159-36-6	-	-	1	-
isobornüülisobutüraat	85586-67-0	1,5	-	-	-
isokarüofülleen	118-65-0	1,6	-	2,2	<1,0
β -jonoon	14901-07-6	2,2	-	2,3	<1,0
δ -kadiineen	483-76-1	1,4	1,5	1,7	<1,0
(R)-karvon	6485-40-1	1,2	-	1,4	<1,0
β -karüofülleen	87-44-5	23,9	8,2	30,5	8,8
karüofülleenoksiid	1139-30-6	<1,0	<1,0	1,7	<1,0
linalool	78-70-6	<1,0	-	1,1	<1,0
metüültümüüleeter	1076-56-8	1,5	-	<1,0	<1,0
3-metüül-1-pentanool	589-35-5	-	29,5	-	-
β -mürtseen	123-35-3	6,9	-	<1,0	-
nonanaal	124-19-6	1,4	-	<1,0	<1,0
<i>cis</i> - β -osimeen	3338-55-4	1,1	-	-	-
<i>cis</i> -2-penteen-1-ool	1576-95-0	-	<1,0	-	1,6
α -pineen	80-56-8	1,4	-	-	-
β -pineen	127-91-3	1,5	-	-	-
α -selineen	473-13-2	1,7	-	3,2	<1,0
β -selineen	17066-67-0	2,1	-	4,7	1,1
sorbaldehüüd	142-83-6	-	<1,0	-	1,8
γ -terpineen	99-85-4	1,4	-	-	-
terpinoleen	586-62-9	8,4	-	-	-
1,1,4,8-tetrametüül- <i>cis,cis</i> ,4,7,10-tsükloundekatrieen	1000062-61-9	5,9	7,2	-	-
4,11,11-trimetüül-8-metüleenbitsüklo[7,2,0]undek-4-een	13877-93-5	<1,0	<1,0	1	<1,0

Suhteline standardhälve ei ületanud 7%.

Lisa 2. Lenduvad ühendid CAR-PDMS sorbendiga

Ühend	CAS	Varteta 2022	Värske 2023	Õhk-kuivatatud 2023	Külm-kuivatatud 2023
alloosimeen	7216-56-0	1,1	-	-	-
<i>trans</i> - α -bergamoteen	13474-59-4	1,5	-	2,3	<1,0
α -bergamoteen	17699-05-7	-	-	1,3	-
β -bisaboleen	495-61-4	3,3	-	2,3	<1,0
dekanaal	112-31-2	1,9	-	<1,0	<1,0
dihüdroaktinidioliid	17092-92-1	1	-	-	<1,0
10,10-dimetüül-2,6-dimetüleenbitsüklo[7,2,0]undekaan	357414-37-0	<1,0	<1,0	1,7	<1,0
fenüületüülalkohol	60-12-8	-	1,1	2,8	<1,0
heksaanhape	142-62-1	-	<1,0	5,8	1,2
1-heksanool	111-27-3	-	31,2	-	-
<i>trans</i> -3-hekseen-1-ool	928-97-2	-	35,6	-	66,1
<i>trans</i> -4-hekseen-1-ool	928-92-7	-	-	4,7	-
heksanaal	66-25-1	1,6	-	-	2,6
<i>trans</i> -2-heksenaal	6728-26-3	<1,0	<1,0	1,1	<1,0
<i>trans</i> -3-heksenüülbutüraat	53398-84-8	-	2,8	-	-
<i>cis</i> -3-heksenüül- α -metüülbutüraat	53398-85-9	-	2,2	-	<1,0
heksüülbutüraat	2639-63-6	-	1,3	<1,0	<1,0
humuleen	6753-98-6	-	-	9,2	2,2
4-hüdroksübutaanhape	591-81-1	-	-	2	-
isobornüülisobutüraat	85586-67-0	1,4	-	-	-
isokarüofülleen	118-65-0	-	<1,0	2,1	<1,0
2-isopropenüül-4a,8-dimetüül-1,2,3,4,4a,5,6,7-oktahüdraftaleen	103827-22-1	-	-	1,5	-
<i>cis</i> -kalameen	72937-55-4	1,7	1,1	1,5	<1,0
(R)-karvon	6485-40-1	1,2	-	1,5	<1,0
β -karüofülleen	87-44-5	19,2	5,6	31,4	7
linalool	78-70-6	2	-	1	<1,0
metüültümüüleeter	1076-56-8	1,2	-	<1,0	<1,0
2-metüül-4-pentenaal	5187-71-3	-	1	-	-
β -mürtseen	123-35-3	17,2	-	-	-
nonanaal	124-19-6	1,2	-	<1,0	<1,0
<i>cis</i> - β -osimeen	3338-55-4	1,9	-	-	-
<i>cis</i> -2-penteen-1-ool	1576-95-0	-	1,5	-	2,1
α -selineen	473-13-2	<1,0	-	2,6	<1,0
β -selineen	17066-67-0	1,2	-	4,4	<1,0
sorbaldehüüd	142-83-6	-	1,2	-	3,1
α -terpineen	99-86-5	1,5	-	-	-
γ -terpineen	99-85-4	3,4	-	-	-
terpinoleen	586-62-9	12,9	-	-	-
1,1,4,8-tetrametüül- <i>cis,cis</i> ,4,7,10-tsükloundekatrieen	100062-61-9	4,1	5,4	-	-
4,11,11-trimetüül-8-metüleenbitsüklo[7,2,0]undek-4-een	13877-93-5	1,8	<1,0	1,7	<1,0

Suhteline standardhälve ei ületanud 7%.

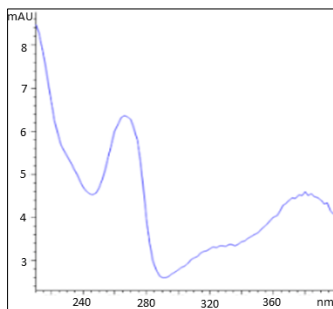
Lisa 3. Lenduvad ühendid PDMS-DVB sorbendiga

Ühend	CAS	Varteta 2022	Värske 2023	Õhk-kuivatatud 2023	Külm-kuivatatud 2023
alloaromandreen	25246-27-9	-	-	-	-
α -amino- γ -butürolaktoon	1192-20-7	-	-	-	13,6
anetool	104-46-1	1,3	-	1,1	-
aromandreen	489-39-4	1,3	-	< 1,0	-
bensaldehüüd	100-52-7	< 1,0	< 1,0	< 1,0	1,9
<i>cis</i> - α -bergamoteen	18252-46-5	1,2	-	-	-
<i>trans</i> - α -bergamoteen	13474-59-4	3,8	-	3,4	-
β -bisaboleen	495-61-4	3,8	-	2,9	-
β -bourbeen	5208-59-3	-	1,9	< 1,0	1,7
2,2-dimetüülundekaan	17312-64-0	-	9,1	-	-
etüüllauraat	106-33-2	-	-	-	1,3
eugenool	97-53-0	-	1,1	< 1,0	< 1,0
<i>cis</i> - β -farneseen	28973-97-9	2,3	-	2,2	-
fenüületüülalkohol	60-12-8	< 1,0	< 1,0	1,7	< 1,0
heksaanhape	142-62-1	-	< 1,0	2,7	1,1
n-heksadekaanhape	57-10-3	< 1,0	-	3,7	-
heksanaal	66-25-1	< 1,0	1,2	-	4,6
3-hekseen-1-ool	928-97-2	-	32,1	-	42,8
<i>cis</i> -3-heksenüül-1-atsetaat	3681-71-8	-	-	-	1
<i>cis</i> -3-heksenüül- α -metüülbutüraat	53398-85-9	-	1,8	-	< 1,0
<i>cis</i> -3-heksenüülbutüraat	16491-36-4	-	-	-	1,7
<i>trans</i> -3-heksenüülbutüraat	53398-84-8	< 1,0	4,6	-	-
(E,E)-2,4-heptadienaal	05.03.4313	< 1,0	-	< 1,0	1,1
humuleen	6753-98-6	-	-	8,9	3,8
β -jonoon	14901-07-6	1,1	-	-	-
δ -kadineen	14901-07-6	1,4	1,2	1,1	< 1,0
(R)-karvon	6485-40-1	1,3	-	1,1	-
β -karüofülleen	87-44-5	32,5	15,6	34,8	5,2
karüofülleenoksiid	1139-30-6	2,1	< 1,0	1,4	-
α -kopeen	3856-25-5	1,2	< 1,0	< 1,0	< 1,0
β -kopeen	18252-44-3	1,9	3,8	< 1,0	< 1,0
linalool	78-70-6	4,3	-	1,5	-
6-metüül-5-hepteen-2-oon	110-93-0	< 1,0	-	-	1,1
γ -muuroleen	30021-74-0	< 1,0	1,4	-	< 1,0
(E,E)-3,5-oktadien-2-oon	30086-02-3	< 1,0	-	< 1,0	1,1
palmitoleiinhape	373-49-9	-	-	1,7	-
panaginseen	871660-96-7	1	-	-	-
<i>cis</i> -2-penteen-1-ool	1576-95-0	-	< 1,0	-	1
β -selineen	17066-67-0	4,2	-	4,1	-
α -selineen	473-13-2	2,6	-	2,5	< 1,0
tetradekaanhape	544-63-8	-	-	1	-
1,1,4,8-tetrametüül- <i>cis,cis</i> ,4,7,10-tsükloundekatrieen	1000062-61-9	8,3	12,3	-	-
2,2,6-trimethüülsükloheksanoon	2408-37-9	-	< 1,0	-	1,2
<i>cis</i> -vaktseenhape	506-17-2	-	-	1	-

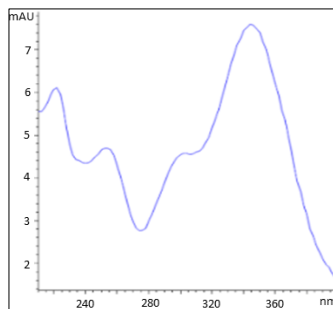
Suhteline standardhälve ei ületanud 7%.

Lisa 4. Analüüsitud polüfenoolsete ühendite neeldumisspektrid

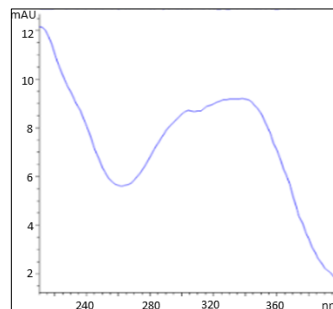
Rutiin



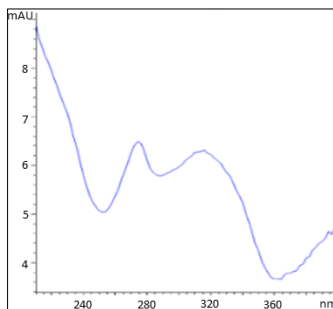
Klorogeenhape



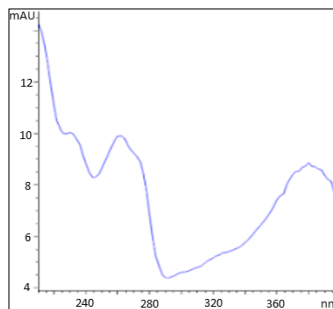
Feruulhape



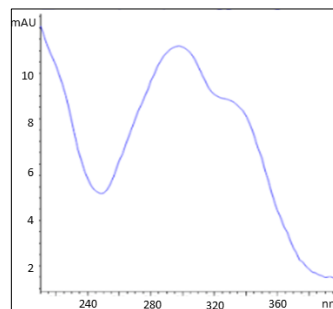
Kaempferool



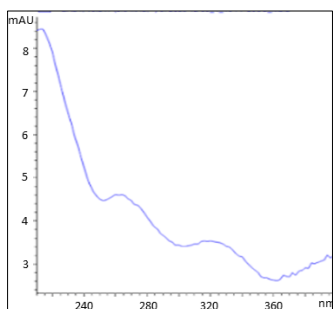
Luteoliin



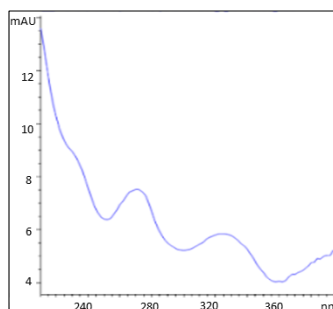
p-kumaarhape



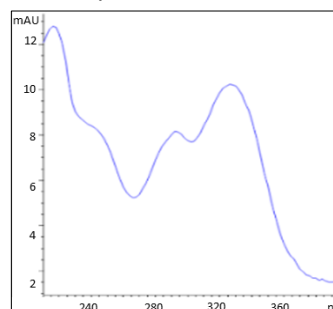
Müritsetiin



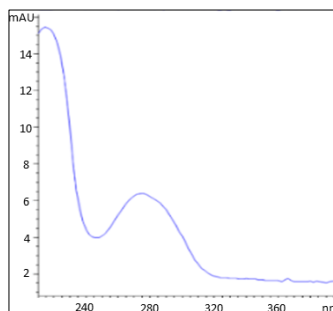
Kvertsetiin



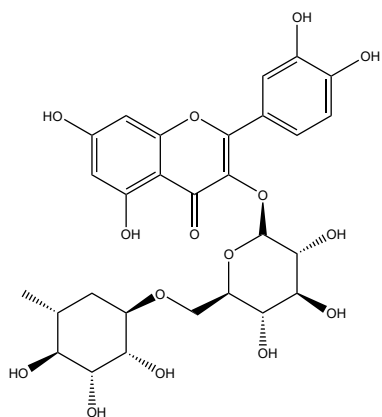
Kohvhape



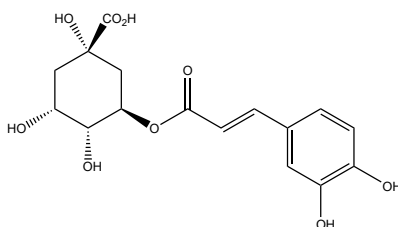
Gallushape



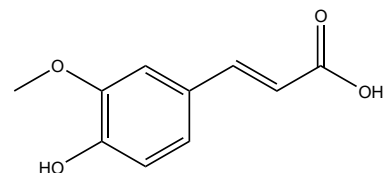
Lisa 5. Analüüsitud polüfenoolsete ühendite struktuurid



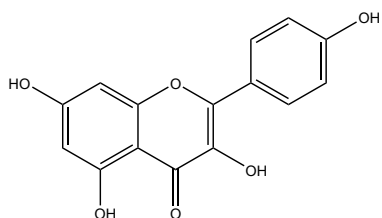
Rutiin



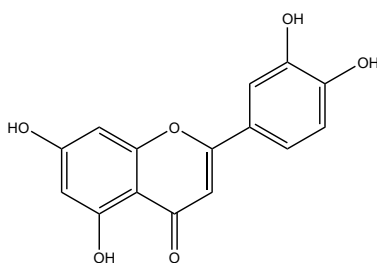
Klorogeenhape



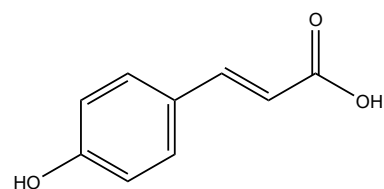
Feruulhape



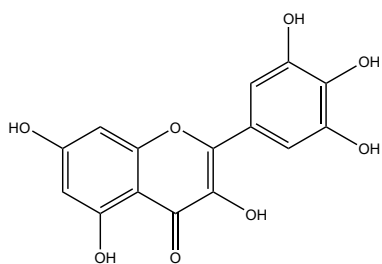
Kaempferool



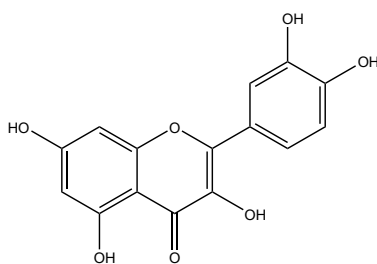
Luteoliin



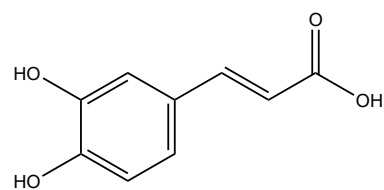
p-kumaarhape



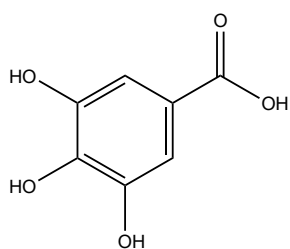
Müritsetiin



Kvertsetiin



Kohvhape



Gallushape

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Kristin Düüna,

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Ahtalehises põdrakanepis (*Epilobium angustifolium*) sisalduvate fütokemikaalide ekstraktsioon ja iseloomustamine“, mille juhendaja on Piia Jõul

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

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

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

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

27.05.2024

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida 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 kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.