

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMAKOLOGIJOS KATEDRA

GINTARĖ ANTANAVIČIŪTĖ

***ARTEMISIA VULGARIS* L. ŽOLĖS FENOLINIŲ JUNGINIŲ IR
ANTIOKSIDANTINIO AKTYVUMO TYRIMAI**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovė
Doc., dr. Lina Raudonė

KAUNAS, 2016

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMAKOLOGIJOS KATEDRA

TVIRTINU:

Farmacijos fakulteto dekanas

Prof. dr. Vitalis Briedis

***ARTEMISIA VULGARIS* L. ŽOLĖS FENOLINIŲ JUNGINIŲ IR
ANTIOKSIDANTINIO AKTYVUMO TYRIMAI**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovė

Doc., dr. Lina Raudonė

Recenzentas

Darbą atliko

Magistrantė Gintarė Antanavičiūtė

KAUNAS, 2016

TURINYS

SANTRAUKA	4
SUMMARY	5
SANTRUMPOS	6
ĮVADAS.....	7
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	9
1.1. Kiečio genties augalų klasifikacija, taksonominė įvairovė, paplitimas	9
1.2. <i>Artemisia vulgaris</i> L. morfologiniai požymiai ir identifikavimas	9
1.3. Kiečių vaistinė augalinė žaliava ir biologiškai aktyvūs junginiai.....	10
1.4. Fenoliniai junginiai, jų klasifikacija, savybės ir svarba augalui	11
1.5. <i>Artemisia vulgaris</i> L. farmakologinės savybės.....	15
1.6. Oksidacinis stresas, antioksidantai, antioksidantinio poveikio nustatymas	16
2. TYRIMO METODIKA	19
2.1. Tyrimų objektas.....	19
2.2. Naudoti reagentai.....	20
2.3. Naudota aparatūra.....	20
2.4. Tyrimų metodika	21
2.4.1. Spektrofotometriniai metodai.....	21
2.5. Tiriamojo laikotarpio meteorologinės sąlygos	26
2.6. Efektyvioji skysčių chromatografija.....	27
2.7. Duomenų statistinis įvertinimas	27
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	28
3.1. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas paprastųjų kiečių ekstraktuose spektrofotometrinio metodu	28
3.2. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas paprastųjų kiečių ekstraktuose spektrofotometrinio metodu.....	31
3.3. Antioksidantinio aktyvumo nustatymas ABTS ir FRAP metodais.....	34
3.4. Fenolinių junginių nustatymas paprastųjų kiečių augalinėje žaliavoje ESC metodu	37
3.5. Koreliacinių ryšių analizė.....	41
3.6. Tyrimo rezultatų apibendrinimas.....	43
4. IŠVADOS	44
5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	45
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS	46
7. PRIEDAI.....	50

SANTRAUKA

G. Antanavičiūtės magistro baigiamasis darbas/ mokslinė vadovė doc. dr. Lina Raudonė; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Farmacijos fakulteto, Farmakognozijos katedra.- Kaunas.

Darbo pavadinimas: *Artemisia vulgaris* L. žolės fenolinių junginių ir antioksidantinio aktyvumo tyrimai.

Tyrimo tikslas: Ištirti bendro fenolinių junginių, flavonoidų kiekio ir antioksidantinio aktyvumo įvairavimus *A.vulgaris* L. žolės ekstraktuose vegetacijos periodo metu bei žaliavose surinktose iš skirtingų Lietuvos augaviečių;

Tyrimo uždaviniai: Nustatyti bendrą fenolinių junginių ir flavonoidų kiekį *Artemisia vulgaris* L. žolės ekstraktuose vegetacijos metu bei žaliavose surinktose iš skirtingų augaviečių; įvertinti antiradikalinį aktyvumą ABTS metodu ir redukcinį aktyvumą FRAP metodu; ištirti flavonoidų ir fenolinių rūgščių komplekso kokybinę ir kiekybinę sudėtį efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

Tyrimo objektas ir metodai: Natūraliai augančių paprastųjų kiečių žolė. Bendras fenolinių junginių kiekis augalinėje žaliavoje nustatytas spektrofotometrinio Folin-Ciocalteu metodu, antioksidantinis aktyvumas nustatytas dviem metodais: ABTS (antiradikalinio aktyvumo) ir FRAP (redukcinio aktyvumo). Fenolinių junginių kokybinę ir kiekybinę sudėtį nustatyta ESC metodu.

Tyrimo rezultatai ir išvados: Bendras fenolinių junginių kiekis *A.vulgaris* L. žolės ekstraktuose vegetacijos periodo metu įvairuoja nuo $32,44 \pm 1,30$ mg/g iki $87,74 \pm 1,66$ mg/g, skirtingose augavietėse įvairuoja nuo $40,01 \pm 1,08$ mg/g iki $93,12 \pm 1,49$ mg/g. Bendras flavonoidų kiekis augalo vegetacijos periodo metu įvairuoja nuo $5,08 \pm 0,26$ mg/g iki $16,98 \pm 0,13$ mg/g, skirtingose augavietėse įvairuoja nuo $7,5 \pm 0,3$ mg/g iki $13,21 \pm 0,63$ mg/g. Atiradikalinis aktyvumas augalo vegetacijos periodo metu įvairuoja nuo $172,77 \pm 4,21$ μ mol/g iki $622,43 \pm 8,52$ μ mol/g, o redukcinis aktyvumas – nuo $280,50 \pm 10,33$ μ mol/g iki $961,86 \pm 45,48$ μ mol/g. ESC metodu nustatyti šie junginiai: 3,5-dikafeilchino rūgštis (vegetacijos periodo metu įvairuoja nuo $7,46 \pm 0,16$ mg/g iki $20,63 \pm 0,43$ mg/g), chlorogeno rūgštis (įvairuoja nuo $5,50 \pm 0,19$ mg/g iki $21,09 \pm 0,77$ mg/g, rutinas (įvairuoja nuo $0,06 \pm 0,002$ mg/g iki $2,32 \pm 0,05$ mg/g).

SUMMARY

G. Antanavičiūtė final master's thesis/ research supervisor doc. dr. Lina Raudonė; Lithuanian University of Health Sciences, Academy of Medicine, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy. - Kaunas.

Title: Research of phenolic compounds and antioxidant activity in herb of *Artemisia vulgaris* L.

The aim of the research: to investigate variation of total content of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity during the vegetative season in herb of *Artemisia vulgaris* L. and samples selected from different regions of Lithuania.

The objectives of the research: to determine variation of total content of phenolic compounds and flavonoids during the vegetative season in herb of *Artemisia vulgaris* L. and samples collected from different regions of Lithuania; to evaluate antioxidant activity using ABTS method and reducing activity using FRAP method; to investigate qualitative and quantitative composition of flavonoids and phenolic acids using HPLC method.

Object and methods: Herb of naturally growing mugwort. The content of total phenolic compounds in plant extracts determined by Folin-Ciocalteu spectrophotometric method, the antioxidant activity determined using two methods: ABTS (radical scavenging) and FRAP (ferric reducing antioxidant potential). The qualitative and quantitative composition of total phenolic compounds determined by HPLC method.

Results and conclusions: Total amount of phenolic compounds in herb of *A.vulgaris* L. varies from $32,44 \pm 1,30$ mg/g to $87,74 \pm 1,66$ mg/g during the vegetative season, and varies from $40,01 \pm 1,08$ mg/g to $93,12 \pm 1,49$ mg/g selected from different regions of Lithuania. Total amount of flavonoids varies from $5,08 \pm 0,26$ mg/g to $16,98 \pm 0,13$ mg/g during the vegetative season and varies from $7,5 \pm 0,3$ mg/g to $13,21 \pm 0,63$ mg/g selected from different regions of Lithuania. Radical scavenging activity varies from $172,77 \pm 4,21$ μ mol/g to $622,43 \pm 8,52$ μ mol/g during the vegetative season, ferric reducing antioxidant activity varies from $280,50 \pm 10,33$ μ mol/g to $961,86 \pm 45,48$ μ mol/g during the vegetative season. 3,5-dicafeoylquinic acid (varies from $7,46 \pm 0,16$ mg/g to $20,63 \pm 0,43$ mg/g during the vegetative season), chlorogenic acid (varies from $5,50 \pm 0,19$ mg/g to $21,09 \pm 0,77$ mg/g), rutin (varies from $0,06 \pm 0,002$ mg/g to $2,32 \pm 0,05$ mg/g) determined by HPLC method.

SANTRUMPOS

ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sulfono rūgštis)

CUPRAC – vario jonų redukcijos antioksidantinė galia (angl. *Cupric ion reducing antioxidant capacity*)

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas

ESC – efektyvioji skysčių chromatografija (angl. *high performance liquid chromatography*)

FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia (angl. *Ferric reducing antioxidant power*)

GAE – galo rūgšties ekvivalentai (angl. *gallic acid equivalents*)

n – imtis

ORAC – deguonies radikalų absorbcinė geba (angl. *oxygen radical absorbance capacity*)

R – Pirsono koreliacijos koeficientas

R² – regresijos koeficientas

ROS – reaktyviosios deguonies rūšys (angl. *reactive oxygen species*)

TE – troloksui ekvivalentiška antioksidantinė galia (ang. *trolox equivalent antioxidant capacity*)

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas

UV – ultravioletinė spinduliuotė

IVADAS

Paprastasis kietis (*Artemisia vulgaris* L.) – astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos daugiametis, žolinis, vaistinis augalas. Vaistinę augalinę žaliavą sudaro lapai ir žolė. Paprastųjų kiečių lapai ir žolė dažniausiai vartojami virškinimo sutrikimams gydyti, esant kirmėlinėms ligoms. Tyrimais įrodytas priešūždegiminis, estrogeninis, antihelmininis, antihistamininis, antioksidantinis veikimas, teigiamas poveikis širdies ir kraujagyslių sistemai. Augalas kaupia fenolinius junginius, eterinius aliejus, kartumynus, vitaminą C, beta karoteną (1, 2).

Fenoliniai junginiai yra siejami su antioksidantiniu aktyvumu – jie geba surišti žalingus laisvuosius radikalus ir apsaugoti ląsteles nuo oksidacinio streso (3). Oksidacinis stresas yra sudėtingas cheminis ir fiziologinis reiškinys, kuris pažeidžia ląsteles ir sukelia jų disfunkciją. Oksidacinį stresą lemia padidėjęs laisvųjų radikalų kiekis organizme, kuris dalyvauja įvairių ligų patogenezėje (vėžys, aterosklerozė, diabetas, insultas, neurodegeneracinės ligos) ir skatina senėjimo procesus (4).

Augaliniai ekstraktai yra pripažinti natūralūs antioksidantai, sugebantys surišti žalingus laisvuosius radikalus. Juose esantys antioksidantiniu poveikiu pasižymintys junginiai (fenoliniai junginiai, askorbo rūgštis, karotenoidai, fosfolipidai, steroliai) tiesioginiu ir netiesioginiu būdu slopina oksidacijos reakcijas (3, 5). Pasaulyje yra atliekami antioksidantinio aktyvumo tyrimai paprastųjų kiečių žaliavose. Egipto, Bulgarijos, Nepalo mokslininkai tyrė natūraliai augančių paprastųjų kiečių žolėse, lapuose esančią bendrą fenolinių junginių kiekį, bendrą flavonoidų kiekį ir antioksidantinį aktyvumą (6, 7, 8). Lietuvoje buvo tirtas bendras fenolinių junginių kiekis skirtingose *Artemisia vulgaris* L. morfologinėse dalyse (lapuose, žiedynuose, stiebuose ir šaknyse) (9), taip pat *Artemisia vulgaris* L. lapuose esančių flavonoidų kokybinė ir kiekybinė sudėtis (10). Lietuvoje neatlikti antioksidantinio aktyvumo tyrimai su *Artemisia vulgaris* L. žaliavomis, tad tikslinga įvertinti paprastųjų kiečių žaliavų antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą, palyginti su fenolinių junginių ir flavonoidų kiekio kaupimosi dėsniniais.

Fenolinių junginių antioksidantinis aktyvumas priklauso nuo augalo augimo sąlygų, žaliavos rinkimo laiko (11), todėl tikslinga yra nustatyti bendrą fenolinių junginių, bendrą flavonoidų kiekį ir antioksidantinį aktyvumą augalo vegetacijos periodo metu, nustatyti optimalų žaliavos rinkimo laiką, užtikrinantį didesnius biologiškai aktyvių junginių kiekius.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas – ištirti bendro fenolinių junginių, flavonoidų kiekio ir antioksidantinio aktyvumo įvairavimus *A.vulgaris* L. žolės ekstraktuose vegetacijos metu bei žaliavose surinktose iš skirtingų Lietuvos augaviečių;

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti bendrą fenolinių junginių kiekį *Artemisia vulgaris* L. žolės ekstraktuose vegetacijos metu bei žaliavose surinktose iš skirtingų augaviečių.
2. Nustatyti bendrą flavonoidų kiekį *Artemisia vulgaris* L. žolės ekstraktuose vegetacijos metu bei žaliavose surinktose iš skirtingų augaviečių.
3. Įvertinti *Artemisia vulgaris* L. žolės antiradikalinį aktyvumą ABTS spektrofotometrinio metodu.
4. Įvertinti *Artemisia vulgaris* L. žolės redukcinį aktyvumą FRAP spektrofotometrinio metodu.
5. Ištirti *Artemisia vulgaris* L. žolės flavonoidų ir fenolinių rūgščių komplekso kokybinę ir kiekybinę sudėtį efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kiečio genties augalų klasifikacija, taksonominė įvairovė, paplitimas.

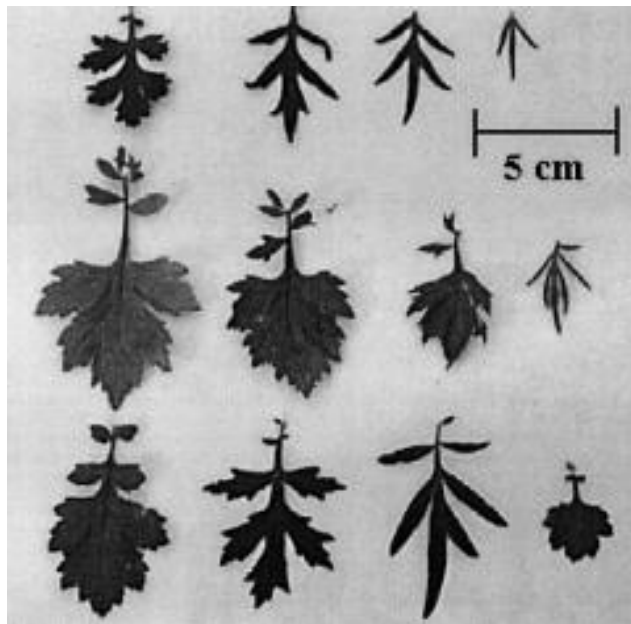
Artemisia (N. L. Burman) gentis priklauso astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimai, astriečių (lot. *Asterales*) pošeimiui, magnolijainių (lot. *Magnoliopsida*) klasei (12). *Artemisia* gentį sudaro virš 500 skirtingų rūšių. Lietuvoje auga 11 rūšių, labiausiai paplitusios yra: *A. absinthium* (kartusis kietis, kitaip dar vadinamas pelynu.), *A. vulgaris* (paprastasis kietis), *A. campestris* (dirvinis kietis), *A. dracunculus* (vaistinis kietis, pelerūnas), *A. abrotanum* (diamedis) (13).

Artemisia gentis plačiai paplitusi pasaulyje. Ji randama vidutinio klimato juostose Europoje, Azijoje ir Šiaurės Amerikoje. *Artemisia* gentis labiau paplitusi šiaurės pusrutulyje nei pietų. Ši gentis pasižymi dideliu prisitaikymu – ją randama lygumose ir aukštai kalnuose, sausringose vietose ir pelkėse (15, 16). *Artemisia vulgaris* L. yra plačiai Lietuvoje paplitęs augalas – randamas dirbamuose laukuose, pakelėse, šlaituose, pamiškėse, vandens telkinių pakrantėse. Paprastasis kietis įsikuria derlingame, vidutiniškai drėgname, mažai rūgščios, neutralios ir net labai šarminės reakcijos dirvožemyje (17).

1.2. *Artemisia vulgaris* L. morfologiniai požymiai ir identifikavimas

Lietuvoje dažniausiai paprastieji kiečiai yra 60-170 cm. aukščio. Stiebai būna keli, vagoti, rausvai violetiniai, plaukuoti. Lapai plunksniškai suskaldyti, tik viršūniniai nesuskaldyti ir lygiakraščiai. Viršutinė lapų pusė tamsiai žalia, apatinė – pilka ir gausiai plaukuota. Žiedai rusvos spalvos, susitelkę nedideliais graižais. Paprastieji kiečiai žydi nuo liepos antros pusės iki vėlyvo rudens, sėklas subrandina rugsėjo – spalio mėnesiais (17, 18.).

Morfologiniai požymiai priklauso nuo augavietės. JAV rytuose augantys paprastieji kiečiai gali būti iki 2 metrų aukščio, nešakoti, o šiaurinėse JAV vietovėse – žemi ir labai šakoti. *A. vulgaris* L. pasižymi plačia lapų variacija – lapų ilgis gali būti 1-10 cm, plotis 3-7,5 cm. (1 pav.) (19). Įvairovė priklauso nuo dirvožemio cheminės sudėties, meteorologinių sąlygų, aplinkos užterštumo (10,19).



1 pav. *A. vulgaris* L. lapų variacija (19)

1.3. Kiečių vaistinė augalinė žaliava ir biologiškai aktyvūs junginiai.

Paprastųjų kiečių žolė renkama vasarą prieš žydėjimą arba žydėjimo pradžioje. Dažniausiai skinamos kiečių viršūnės iki 30 cm. ilgo. Surinkta žaliava džiovinama gerai vėdinamoje patalpoje arba džiovvykloje. Tinkamiausias laikas žaliavai vartoti yra iki dviejų metų (17).

Paprastųjų kiečių žolė kaupia flavonoidus (apigeninas, kvercetas, kempferolis, hiperozidas), fenolines rūgštis (chlorogeno rūgštis), eterinius aliejus (kamparas, α -pinenas, 1,8-cineolis, trans-tujonas, seskviterpeniniai laktonai), kartumynus, vitaminą C, beta karoteną (1, 2).

A. vulgaris L. eterinio aliejaus sudėtis priklauso nuo augalo augimo vietos ir vystymosi stadijos. Italijoje augančių paprastųjų kiečių žolės vyraujantis junginys yra kamparas (47proc.), Prancūzijoje – kamparas kartu su 1,8-cineoliu (iki 23proc.), Indijoje α -tujonas (56 proc.), Maroke taip pat daugiausia randama α -tujono (35proc.), Vietname – 1,8-cineolio (iki 24proc.) (20). Lietuvoje augančių paprastųjų kiečių lapų eterinio aliejaus pagrindinis komponentas yra 1,8-cineolis (17 proc.) (1). Eterinio aliejaus kiekis ir komponentų sudėtis priklauso nuo fenologinio tarpsnio. Prancūzijoje augančiose paprastųjų kiečių žolėse didžiausi kamparo kiekiai nustatomi esant sėklų brandai, mažiau – žydėjimo metu, dar mažiau – esant butonizacijai, mažiausi kamparo kiekiai randami masinio atžėlimo metu (21). Paprastieji kiekiai, kurie auga sausesnėmis sąlygomis, yra linkę kaupti didesnę kiekį eterinio aliejaus (22).

A. vulgaris L. fenolinių junginių sudėtis ir taip pat priklauso nuo augimo vietos ir vystymosi stadijos. Lietuvoje augančių *A. vulgaris* L. lapų ekstraktuose daugiausia nustatyta chlorogeno rūgštis – 0,46 mg/g, žiedų ekstraktuose daugiausia nustatyta kumaro rūgštis – 0,65 mg/g (10). Bulgarijoje

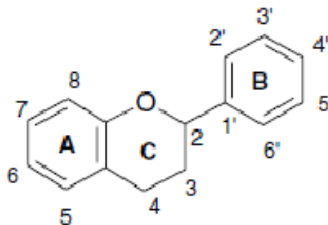
augančių paprastųjų kiečių žolės metanoliniuose ekstraktuose daugiausia nustatyta chlorogeno rūgštis – $1,70 \pm 0,10$ mg/g, rutino – $0,87 \pm 0,06$ mg/g (23). Indijoje augančiuose paprastųjų kiečių lapų metanoliniuose ekstraktuose – kumarino klasės junginių (eskuletino, skopolino) (4). Serbijoje augančių paprastųjų kiečių metanoliniuose lapų ekstraktuose daugiausia nustatyta 3,5-dikafeilchino rūgštis – 26 ± 2 mg/g (24). Lenkijoje tirtų paprastųjų kiečių žolėje daugiausiai nustatyta p-kumaro rūgštis – $3,04 \pm 0,01$ mg/g (6). Fenolinių junginių sudėtis ir kiekis priklauso nuo fenologinio tarpsnio – literatūros šaltiniuose nurodoma, kad didžiausias flavonoidų kiekis nustatomas žydėjimo metu, o mažiausias flavonoidų kiekis nustatomas vegetatyvinio augimo metu (56).

1.4. Fenoliniai junginiai, jų klasifikacija, savybės ir svarba augalui

Fenoliniai junginiai yra antriniai augalo metabolitai, jų randama visose augalo dalyse, tačiau kiekybinio ir kokybinio komplekso pasiskirstymas nevienodas – dažniausiai didžiausia koncentracija randama lapuose ir žaliuose stiebuose (25). Fenolinių junginių koncentracija priklauso nuo aplinkos sąlygų, geografinės padėties, kuriame auga augalas, genetinių faktorių, evoliucijos (25, 26).

Pagrindinis fenolinių junginių struktūrinis elementas yra vienas ar keli aromatiniai žiedai, kurie turi bent vieną hidroksilo grupę (27). Hidroksilo grupė gali būti laisva ar prisijungusi kitą funkcinę grupę: eterius, esterius, glikozidus (28). Fenoliniai junginiai, atsižvelgiant į molekulės struktūrą, skirstomi į šias grupes: flavonoidai, fenolinės rūgštys, stilbenai, kumarinai, taninai (25, 27).

Flavonoidai yra plati šeima, kuri sudaro maždaug pusę visų fenolinių junginių (25). Flavonoidų cheminę struktūrą būtinai sudaro du aromatiniai žiedai A ir B, kurie sujungti trijų anglies atomų tilteliu. Anglies atomų tiltelis, kartu su deguonies atomu, sudaro heterociklinį žiedą C (2 pav.). Pakaitų variacija žiede C lemia įvairias flavonoidų klases: flavanonai, flavonai, flavanoliai, flavonoliai, izoflavonoidai, antocianidinai. Hidroksilo grupių pakaitai, esantys A ir B aromatiniam žiede, gali būti glikozilinti, metilinti, acilinti, tai lemia individualius flavonoidų skirtumus (25, 29, 30, 31, 32).



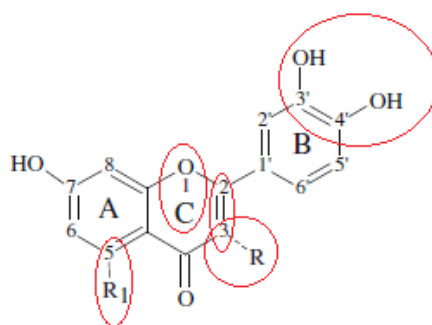
2 pav. Bendra flavonoidų molekulės struktūra (29)

Flavonoidų antioksidantinis aktyvumas siejamas su šių funkcinių grupių buvimu:

1. 3,4-dihidroksi grupė B žiede. Ji lemia didesnę oksiduotų flavonoidų radikalų stabilumą. Šiai grupei būdingos elektronų donorinės savybės.

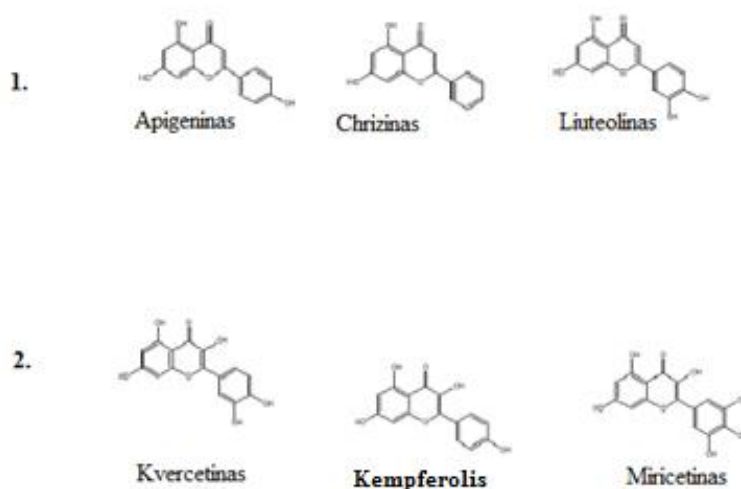
2. C2=C3 dviguba jungtis, kuri konjūguota su C4=O keto grupe C žiede atsakinga už elektronų perkėlimą iš B žiedo. Ši jungtis lemia didesnį oksiduotų flavonoidų radikalų stabilumą.
3. Hidroksilo pakaitai, esantys 3 ir 5 padėtyje atiduoda vandenilio atomą vandenilio peroksido radikalui ir taip sumažina neigiamą laisvųjų radikalų poveikį. Tačiau ne visi hidroksilo pakaitai pasižymi vienodu aktyvumu atiduodant vandenilio atomą: hidroksilo pakaitai, esantys 5 ir 7 padėtyje pasižymi silpnu aktyvumu atiduodant vandenilį (33, 34).

Kvercetas turi visus šiuos struktūrinius elementus, todėl jis yra efektyviausias antioksidantas iš visų flavonoidų (34).



3 pav. Flavonoidų molekulė su pažymėtom funkcinėm grupėm (33, 34)

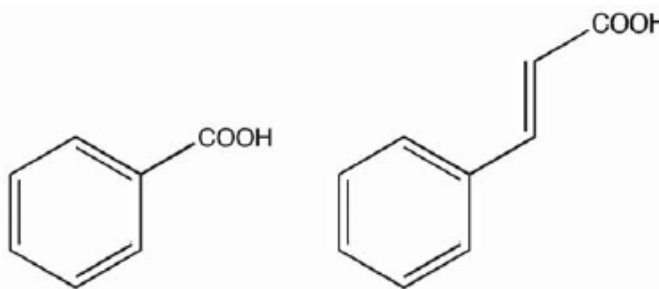
Labiausiai paplitę flavonoidai yra flavonai (apigeninas, chrizinas, liuteolinas), flavonoliai (kvercetas, kempferolis, miricetas) ir jų glikozidai (4 pav.). Apigenino randama obuoliuose, liuteolino – salieruose. Kvercetino yra morkose, alyvuogėse, svogūnuose, kempferolio – brokoliuose, miricetino – vynuogėse (35).



4 pav. Labiausiai paplitę 1 - flavonai (apigeninas, chrizinas, liuteolinas), 2 - flavonoliai (kvercetas, kempferolis, miricetas)

Flavonoidai atsakingi už žiedų, vaisių, lapų spalvą (antocianinai yra svarbiausia grupė, sudaranti vandenyje tirpius augalų pigmentus). Flavonoidai - natūralios augalo gynybinės medžiagos: apsaugo augalą nuo vabzdžių, grybelių, bakterijų, virusų, UV radiacijos (28, 32, 35).

Fenolinės rūgštys svarbi fenolinių junginių klasė. Fenolinės rūgštys turi bent vieną aromatinį žiedą, kuriame ne mažiau kaip vienas vandenilis pakeistas hidroksilo grupe (36). Fenolinės rūgštys skirstomos pagal tai, kiek yra anglies vienetų šoninėje grandinėje, kuri prijungta prie aromatinio žiedo. Svarbiausios yra dvi grupės: turinčios C6-C1 struktūrą (hidroksibenzenkarboksirūgštys) ir turinčios C6-C3 struktūrą (hidroksicinamono rūgštys – turi trijų anglies atomų šoninę grandinę) (5pav.). Hidroksilo ir metoksi grupių skaičius ir padėtis ant aromatinio žiedo lemia individualius fenolinių rūgščių skirtumus (37).



5 pav. Bendra hidroksibenzenkarboksirūgščių ir hidroksicinamono rūgščių struktūra (27)

Hidroksicinamono rūgštis pasižymi didesniu antioksidantiniu aktyvumu nei hidroksibenzenkarboksirūgštis. Stipresnis antioksidantinis aktyvumas susijęs su $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ grupe, kuri užtikrina didesnę gebėjimą atiduoti vandenilio atomą radikalams, negu $-\text{COOH}$ grupė (34, 38).

Hidroksibenzenkarboksirūgščių antioksidantinis aktyvumas priklauso nuo:

1. Karboksilo grupės ($-\text{COOH}$). Dėl šios grupės hidroksibenzenkarboksirūgštys sunkiau atiduoda vandenilio atomą radikalams, dėl to silpniau mažinamas laisvųjų radikalų poveikis.
2. Hidroksilo pakaitų skaičiaus aromatiname žiede. Esant vienam hidroksido pakaitui aromatiname žiede, junginys pasižymi silpnu aktyvumu atiduodant vandenilio atomą, dėl to silpnėja antioksidantinis aktyvumas.
3. Hidroksilo pakaitų padėties aromatiname žiede. Meta- padėtyje esantys hidroksilo pakaitai pasižymi stipriausiu antioksidantiniu poveikiu.
4. Pakaitų esterifikacijos. Esterifikuojant karboksilo ($-\text{COOH}$) grupę, antioksidantinis aktyvumas sumažėja.

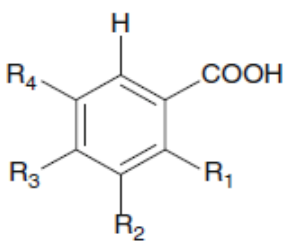
5. Metoksi (-CH₃O) pakaitų aromatiniame žiede. Esant šiems pakaitams, antioksidantinis aktyvumas mažėja (34).

Hidroksicinamono rūgščių antioksidantinis aktyvumas priklauso nuo:

1. CH=CH-COOH grupės. Dėl šios grupės hidroksicinamono rūgštys lengviau atiduoda vandenilio atomą radikalams, dėl to stipriau mažinamas laisvųjų radikalų poveikis.
2. Metoksi (-CH₃O) pakaitų. Hidroksilo pakaitą 3 padėtyje pakeitus metoksi pakaitu (pvz, ferulo rūgštyje), padidėja antioksidantinis aktyvumas (hidroksibenzenkarboksirūgštyse metoksi pakaitai mažina antioksidantinį aktyvumą).
3. Hidroksilo pakaitų skaičiaus aromatiniame žiede. Esant daugiau nei vienam hidroksilo pakaitui, didėja antioksidantinis aktyvumas (34).

Dažniausios hidroksibenzenkarboksirūgštys yra galo, p-hidroksibenzenkarboksirūgštis, protokatecho, vanilino, siringo, salicilo rūgštys, o hidroksicinamono – kavos, ferulo, p-kumaro, cinamono, chlorogeno (1, 2 lentelės) (25). Randamas hidroksibenzenkarboksirūgšties kiekis yra labai mažas, tačiau šios rūgšties randama juodosios arbatos lapuose, juoduosiuose ridikuose, svogūnuose. Hidroksicinamono rūgštis yra dažnesnė nei hidroksibenzenkarboksirūgštis. Hidroksicinamono rūgšties randama kavoje, vyšniose, mėlynėse, kiviuose. Fenolinės rūgštys dažniausiai būna glikozilintos, laisvos formos pasitaiko retai (39). Fenolinės rūgštys augaluose atlieka svarbų vaidmenį: jos padeda įsisavinti maisto medžiagas, dalyvauja baltymų sintezėje (37).

1 lentelė. Hidroksibenzenkarboksirūgščių klasifikacija (37)

Hidroksibenzenkarboksirūgštis 	Pavadinimas	Pakaitai			
		R1	R2	R3	R4
	p-hidroksibenzenkarboksirūgštis	H	H	OH	H
	Vanilino rūgštis	H	CH ₃ O	OH	H
	Galo rūgštis	H	OH	OH	OH
	Protokatecho	H	OH	OH	H
	Siringo rūgštis	H	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
	Salicilo rūgštis	OH	H	H	H

2 lentelė. Hidroksicinamono rūgščių klasifikacija (37)

Hidroksicinamono rūgštis	Pavadinimas	Pakeitimai			
		R1	R2	R3	R4
	Cinamono rūgštis	H	H	H	H
	p-kumaro rūgštis	OH	H	H	H
	Ferulo rūgštis	H	CH ₃ O	OH	H
	Kavos rūgštis	H	OH	OH	H

1.5. *Artemisia vulgaris* L. farmakologinės savybės

Paprastųjų kiečių žolė naudojama virškinimo sistemos sutrikimams gydyti: esant sumažėjusiam skrandžio sulčių rūgštingumui, susilpnėjusiam apetitui. Lapų nuovirai naudojami esant kirmėlinėms ligoms (17). Rytų medicinoje paprastųjų kiečių žolė naudota kaip anestezinis augalas (4). Filipinuose šio augalo žolė naudota kaip antihipertenzinė, priešuždegiminė, antispazminė priemonė. Ji buvo naudojama ir dismenorėjai gydyti bei sukelti abortą (15).

Tyrimais įrodyti šie *Artemisia vulgaris* L. farmakologiniai poveikiai:

- **Antioksidantinis.** Šį poveikį lemia fenoliniai junginiai – antioksidantinis veikimas pagrįstas keliais mechanizmais: jie suriša laisvuosius radikalus, apsaugo kitus antioksidantus nuo oksidacinio poveikio arba suriša pereinamųjų metalų jonus (29, 35). *In vivo* nustatyta, kad *Artemisia vulgaris* L. lapų ekstraktas žiurkių kraujyje reikšmingai padidino antioksidacinių fermentų – superoksido dismutazės ir glutatono peroksidazės aktyvumą. Fermentų padidėjimas rodo, kad *Artemisia vulgaris* L. slopina oksidacijos procesus organizme (40).
- **Priešuždegiminis.** Flavonoidai slopina uždegimo fermentus (fosfolipazę, ciklooksigenazę-2, lipoksigenazę), slopina azoto oksido sintezę ir uždegimo mediatorių sintezę (leukotrienų, prostaglandinų). Mažėjant uždegiminiams procesams, mažėja laisvųjų radikalų gamyba (41). Įrodyta, kad *Artemisia vulgaris* L. lapų ekstraktas slopina fermentą – azoto oksido sintetazę – taip galima paaiškinti priešuždegiminį veikimą. Mažėjant azoto oksido kiekiui, jis mažiau reaguoja su laisvaisiais radikalais, dėl to susidaro mažiau peroksido, ląstelės mažiau žalojamos (41, 42). Indijoje atliktas tyrimas, siekiant išsiaiškinti *Artemisia vulgaris* L. priešuždegiminį poveikį. Žiurkėms kirkšnyse po oda implantuotos medvilninės granulės. Po 8 dienų medvilninės granulės, kartu su granuliaciniais audiniais, atsargiai išpjautos ir pasvertos. Žiurkėms buvo duodamas *Artemisia vulgaris* L. lapų metanolinis ekstraktas, medvilninės

granulės svoris nustatytas 55 proc. mažesnis lyginant su žiurkėmis, kurioms nebuvo duodama *Artemisia vulgaris* L. ekstrakto. Medvilninės granulės svoris yra uždegimo indikatorius – esant uždegimui, formuojasi granuliaciniai audiniai, dėl to medvilninės granulės sveria daugiau (43).

- **Teigiamas poveikis širdies ir kraujagyslių sistemai.** Atliktas tyrimas sveikoms žiurkėms – joms duota *A.vulgaris* L. lapų ekstrakto. Po 10 minučių atlikti matavimai parodė, jog ekstraktas neturėjo reikšmingo poveikio kraujo spaudimui ir širdies ritmui, tačiau sumažino leukocitų adheziją – taip gerino organų kraujotaką. Taip pat dėl sumažėjusios leukocitų adhezijos lėtėja aterosklerozės vystymasis (42).
- **Estrogeninis veikimas.** Nustatyta, kad metanolinis *Artemisia vulgaris* L. lapų ekstraktas pasižymi estrogeniniu veikimu. Ektrakto duodama nesubrendusioms žiurkėms – po 10 dienų padidėjo reprodukcinio organų svoris, taip pat kitų gyvybiškai svarbių organų (kepenų, inkstų, blužnies) svoris. Taip pat *Artemisia vulgaris* L. lapų ekstrakto (koncentracijos 600 mg·kg⁻¹) duodama apvaisintoms žiurkėms. Ekstraktas sutrikdė estrogeno-progesterono pusiausvyrą, todėl slopindama apvaisintų kiaušialąsčių implantaciją, nutrūko nėštumas. Kuomet žiurkėms duodama mažesnė koncentracija ekstrakto (300 mg·kg⁻¹), nėštumas nutrūko 50% mažiau žiurkių (44).
- **Antihistamininis.** Jungtinėje Karalystėje ištirta, kad *Artemisia vulgaris* L. lapų ekstraktas veikia kaip histamino H1 receptorių antagonistas – virškinamajame trakte ir trachėjoje atpalaiduoja lygiuosius raumenis. Ši savybė naudojama gydant žarnyno spazmus, viduriavimą. Taip pat *Artemisia vulgaris* L. lapų ekstraktas gali būti naudojamas astmos simptomams lengvinti – blokuoja cholinerginius, histamino H1 receptorius. Šį poveikį (lygiųjų raumenų atpalaidavimą) lemia *Artemisia vulgaris* L. lapuose esantys seskviterpeniniai laktonai (45).
- **Antihelmininis.** Turkijoje ištirta, kad 300 mg/kg dozė metanolinio *Artemisia vulgaris* L. lapų ekstrakto sumažino apvaliųjų kirmėlių, kurios sukelia spiralinę trichiną (lot. *Trichinella spiralis*), lervų skaičių žiurkėse. Liežuvio raumenyse lervų skaičius sumažėjo iki 75,6 proc, diafragmos raumenyse iki 53,4 proc. (46).

1.6. Oksidacinis stresas, antioksidantai, antioksidantinio poveikio nustatymas

Laisvieji radikalai yra labai reaktyvūs junginiai. Jų susidarymą žmogaus organizme skatina uždegimas, rūkymas, UV ar radiacinė spinduliuotė, aplinkos užterštumas (40). Laisvieji deguonies radikalai (ROS – anglų k. – *reactive oxygen species*), tokie kaip superoksido (O₂•-), hidroksilo (OH•), alkoksilo (RO•), hidroperoksilo (HO₂•) radikalai, pažeidžia struktūrines organizmo makromolekules: lipidus, nukleorūgštis, baltymus. Kuomet antioksidantai neapsaugo nuo laisvųjų radikalų poveikio, lipidai, nukleorūgštys, baltymai nuolat patiria oksidacinius pažeidimus – ši būseną vadinama

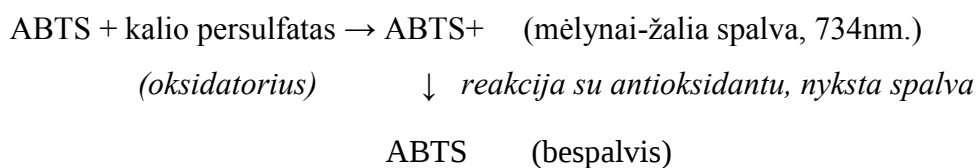
oksidaciniu stresu. Oksidacinis stresas susijęs su tokiais sveikatos sutrikimais kaip vėžys, aterosklerozė, diabetas, insultas, neurodegeneracinės ligos, senėjimas (4).

Žmogaus organizme kelios antioksidantinės sistemos saugo nuo laisvųjų radikalų poveikio. Viena jų – fermentinė (superoksido dismutazė, katalazė ir glutationo peroksidazė), kita – ne fermentinė (askorbo rūgštis, glutationas ir alfa tokoferolis). Šios antioksidantinės sistemos apsaugo nuo laisvųjų radikalų poveikio, tačiau susilpnėjus imuninei sistemai organizmas pats apsiginti nuo laisvųjų radikalų poveikio negali (40). Antioksidantų trūkumo kompensavimui naudojami sintetiniai antioksidantai, tačiau yra duomenų apie jų galimą kancerogeninį poveikį (4). *In vitro* ir *in vivo* tyrimais nustatyta, kad daržinių ciberžolių (lot. *Curcuma longa* L.) ekstraktas, siauralapių bazilikų (lot. *Ocimum tenuiflorum* L.) ekstraktas, paprastųjų runkelių (lot. *Beta vulgaris* L.) ekstraktas, paprastųjų miežių (lot. *Hordeum vulgare* L.) ekstraktas, paprastųjų apynių (lot. *Humulus lupulus* L.) ekstraktas suriša laisvuosius radikalus (11, 47). Taip pat *In vivo* ir *In vivo* tyrimų metu *Artemisia vulgaris* L. žolėje nustatytas antioksidantinis aktyvumas, kuris siejamas su sudėtyje esančiais fenoliniais junginiais (40).

Antioksidantinio nustatymo metodikos gali būti pagįstos vandenilio atomo arba elektrono perdavimo reakcijomis. Vandenilio atomo perdavimo reakcija pagįsta ORAC (deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas) metodu. Antioksidantinio nustatymo metodikos pagrįstos elektronų perdavimo reakcijomis – tai DPHH (radikalų surišimo metodas), ABTS (radikalų – katjonų surišimo metodas), FRAP (geležies jonų redukcinio aktyvumo metodas), CUPRAC (vario jonų redukcinio aktyvumo įvertinimas), Folino metodai. Šių reakcijų metu pasikeičia tirpalų spalvos. Spalvų pokytis priklauso nuo antioksidantų kiekio tiriamuose mėginiuose, kuris įvertinamas spektrofotometriškai (48).

ABTS radikalų – katjonų surišimo įvertinimo metodas

Antioksidantinis aktyvumas nustatomas pagal tiriamos medžiagos gebėjimą neutralizuoti 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS+) laisvuosius radikalus. Oksidatorius kalio persulfatas oksiduoja bespalvę ABTS molekulę į mėlynai-žalios spalvos ABTS+ radikalą. Radikalas šioje formoje stabilus apie dvi dienas, jeigu laikomas tamsioje vietoje, kambario temperatūroje (49). Įdėjus antioksidanto, šis tiesiogiai reaguoja su ABTS+ radikalu, dėl to ABTS+ radikalas vėl virsta bespalve ABTS molekule. Matuojama tirpalo absorbcija, įvertinamas pokytis. Tirpalo absorbcija priklauso nuo nesureagavusio ABTS+ kiekio, kuris liko tirpale (6 pav.) (48).



6 pav. ABTS metodo veikimo schema (48)

FRAP redukcinio aktyvumo įvertinimo metodas

Antioksidantinis aktyvumas nustatomas panaudojant geležies gebėjimą redukuotis. Šio metodo esmė, kad antioksidantas redukuoja trivalenį geležies joną (Fe^{3+}) į divalentį geležies (Fe^{2+}) joną. Taigi tiriamasis ekstraktas redukuoja $[\text{Fe}(\text{III})-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ kompleksą, susidaro mėlynos spalvos $[\text{Fe}(\text{II})-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ kompleksas, kurio absorbcija matuojama spektrofotometru, esant 593 nm bangos ilgiui (6). Esant antioksidantams, absorbcija padidėja dėl susidariusio $[\text{Fe}(\text{II})-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ komplekso (50).

2. TYRIMO METODIKA

2.1. Tyrimų objektas

Paprastųjų kiečių (*A.vulgaris* L.) žolė, surinkta iš 6 skirtingų Lietuvos regionų 2014 ir 2015 metais liepos mėnesį (masinis žydėjimas). Žaliava rinkta 2015 metais Girininkų kaime (Kauno rajonas) nuo birželio 13d. iki rugsėjo 10d. (3 lentelė). Žaliava rinkta vegetacijos laikotarpiu, džiovinta kambario temperatūroje, gerai vėdinamoje patalpoje, apsaugota nuo tiesioginių saulės spindulių. Išdžiovinta žaliava laikyta popieriniuose maišeliuose, laikyta tokiomis pat sąlygomis kaip ir džiovinta.

3 lentelė. Paprastųjų kiečių žaliavos rinkimo vieta ir laikas

2014-2015m žaliavos	Rinkimo data	Vegetacijos tarpsnis
Kauno rajonas, Girininkų kaimas, pieva (žolė) 2015m.	13.Bir	Vegetatyvinis augimas
Kauno rajonas, Girininkų kaimas, pieva (žolė) 2015m.	02.Lie	Butonizacija
Kauno rajonas, Girininkų kaimas, pieva (žolė) 2015m.	15.Lie	Žydėjimas
Kauno rajonas, Girininkų kaimas, pieva (žolė) 2015m.	02.Rgp	Žydėjimas
Kauno rajonas, Girininkų kaimas, pieva (žolė) 2015m.	10.Rgp	Žydėjimas
Kauno rajonas, Girininkų kaimas, pieva (žolė) 2015m.	16.Rgp	Žydėjimas
Kauno rajonas, Girininkų kaimas, pieva (žiedai) 2015m.	16.Rgp	Žydėjimas
Kauno rajonas, Girininkų kaimas, pieva (lapai) 2015m.	16.Rgp	Žydėjimas
Kauno rajonas, Girininkų kaimas, pieva (stiebai) 2015m.	16.Rgp	Žydėjimas
Kauno rajonas, Girininkų kaimas, pieva (žolė) 2015m.	26.Rgp	Žydėjimas
Kauno rajonas, Girininkų kaimas, pieva (žolė) 2015m.	10.Rgs	Sėklų branda

Klaipėdos miestas, pieva (žolė) 2015m.	23.Lie	Žydėjimas
Plungės rajonas, Platelių miestelis, pieva (žolė) 2015m.	24.Lie	Žydėjimas
Kauno rajonas, Domeikavos kaimas, pieva (žolė) 2015m.	16.Lie	Žydėjimas
Šilutės rajonas, Mingės kaimas, pieva (žolė) 2015m.	21.Lie	Žydėjimas
Anykščių miestas, pieva (žolė) 2015m.	25.Lie	Žydėjimas
Kupiškio miestas, pieva (žolė) 2014m.	18.Lie	Žydėjimas

2.2. Naudoti reagentai

Etanolis (96,3 proc. V/V) (AB „Stumbras“, Kaunas, Lietuva), natrio karbonatas (Carl Roth, Karlsruhe, Vokietija), Folin-Ciocalteu fenolio reagentas (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Šveicarija), Galo rūgšties monohidratas („Sigma-Aldrich“, Honkongas, Kinija), aliuminio (III) chlorido heksahidratas (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Vokietija), acto rūgštis (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Šveicarija), heksametilentetraminas (Lachema, Čekija), kvercetas, ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninė rūgštis, „Alfa Aesar“, Masačiusetas, JAV), kalio persulfatas („Sigma-Aldrich Chemie GmbH“, Steinheim, Vokietija), natrio acetato trihidratas (Scharlau, Ispanija), acto rūgštis (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Šveicarija), vandenilio chlorido rūgštis iš „Sigma-Aldrich Chemie GmbH“ (Buchs, Šveicarija), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas, Carl Roth, Karlsruhe, Vokietija), geležies (III) chlorido heksahidratas (Vaseline-Fabrik Rhenania, Bonn, Vokietija), vandenilio chlorido rūgštis iš „Sigma-Aldrich Chemie GmbH“ (Buchs, Šveicarija), Trolox® (troloksas) 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilinė rūgštis (Fluka, Seelze, Vokietija).

2.3. Naudota aparatūra

Vaistinės žaliavos smulkinimui naudotas elektroninis malūnėlis. Vaistinė augalinė žaliava sverta elektroninėmis svarstyklėmis „Sartorius AG“ (Göttingen, Vokietija). Žaliavos nuodžiūvis

įvertintas „Precisa HA 300“ (Šveicarija) prietaisu. Ekstrakcijos atliktos ultragarso bangų vonelėje „Elmasonic P“ (Elma, Vokietija). Spektrofotometriniais tyrimams (bendro flavonoidų kiekio, fenolinių junginių kiekio, antioksidantinio aktyvumo ABTS metodu, redukcinio aktyvumo FRAP metodu nustatymams) naudotas spektrofotometras BECKMAN DU®-70 (Kalifornija, JAV).

2.4. Tyrimų metodika

Tiriamajo ekstrakto gamyba

Vaistinė augalinė žaliava (*A.vulgaris*) susmulkinama elektrine smulkintuve. Apskaičiuojamas augalinės žaliavos nuodžiūvis. Ekstraktų ruošimas: atsveriam 0,20 g susmulkintos žaliavos miltelių, suberiama į tamsaus stiklo 25 ml buteliuką, užpilama 20ml 70% (V/V) etanolio ir ekstrahuojama ultragarso vonelėje 30min kambario temperatūroje. Ultragarso stipris – 480 W. Gauti ekstraktai laikomi tamsaus stiklo buteliukuose, tamsioje vietoje.

2.4.1. Spektrofotometriniai metodai

2.4.1.1. *Suminis fenolinių junginių nustatymas Folin-Ciocalteu metodu*

Darbinio reagento gamyba. Folin-Ciocalteu reagento tirpalas praskiedžiamas 10 kartų distiliuotu vandeniu (9 dalys distiliuoto vandens ir 1 dalis reagento).

7,5% natrio karbonato tirpalo paruošimas. Atsveriam 7,5 g natrio karbonato, kuris ištirpinamas 100 ml distiliuoto vandens.

Metodika. 200 µl tiriamojo ekstrakto tirpalo sumaišoma su 1000 µl darbinio Folin-Ciocalteu reagentu ir dedama 800 µl 7,5% natrio karbonato tirpalo. Gautas mišinys gerai sumaišomas ir paliekamas tamsoje 60 minučių, esant kambario temperatūrai.

Palyginamasis tirpalas ruošiamas taip pat, tačiau vietoj ekstrakto pilamas tirpiklis – 70% etanolis. Esant 765 nm bangos ilgiui spektrofotometru matuojama tirpalo absorbcija. Suminis fenolinių junginių kiekis išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentu gramui žaliavos, kuris apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{GAE} = c \times V/m, \text{ mg/g}$$

Čia:

C – galo rūgšties koncentracija nustatyta iš kalibracinės kreivės mg/ml;

V – ekstrakto tūris;

M – tikslus atsvertas žaliavos kiekis

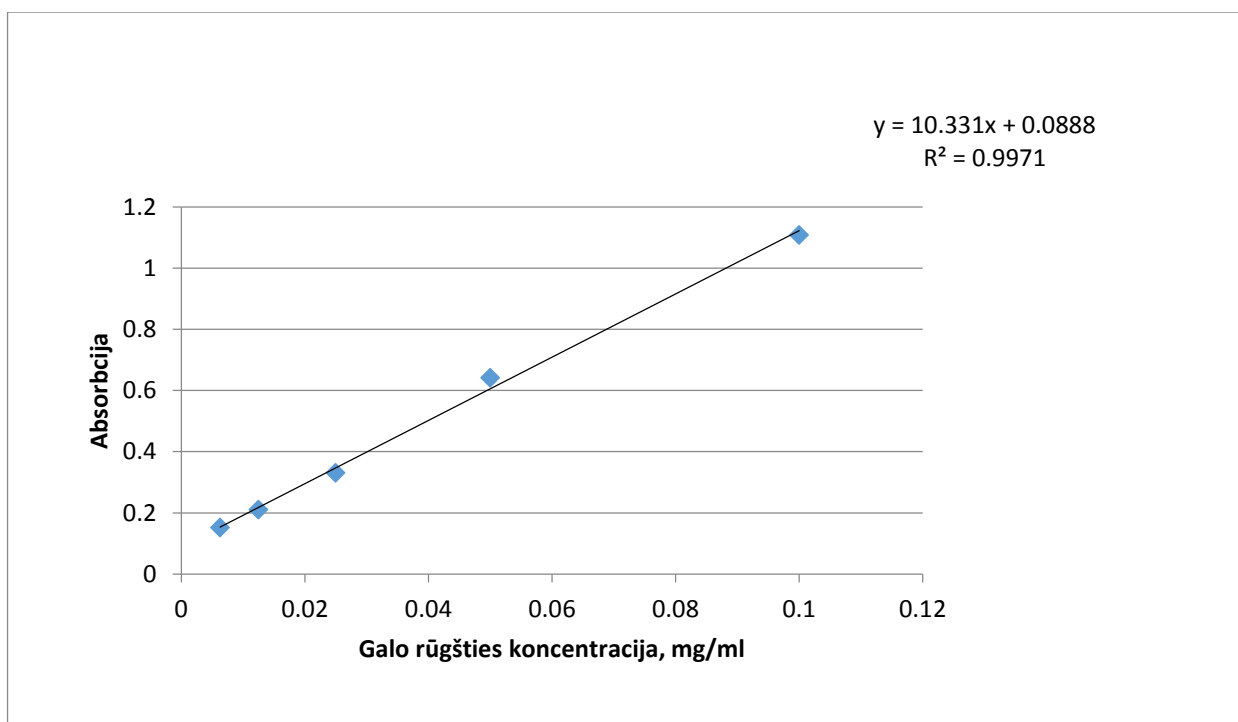
Galo rūgšties standartinių tirpalų gamyba.

Darbinių galo rūgšties tirpalų gamyba. Gaminami 5 skirtingų koncentracijų galo rūgšties darbiniai tirpalai: 0,1mg/ml, 0,05mg/ml, 0,025mg/ml, 0,0125mg/ml, 0,00625mg/ml.

Metodika. Imama 200 µl galo rūgšties tirpalo (kiekvienos koncentracijos), sumaišoma su 1000 µl darbinio Folin-Ciocalteu reagentu ir dedama 800 µl 7,5% natrio karbonato tirpalo. Gautas mišinys gerai sumaišomas ir paliekamas tamsoje 60 minučių, esant kambario temperatūrai. Esant 765 nm bangos ilgiui spektrofotometru matuojama tirpalų absorbcija.

Palyginamasis tirpalas ruošiamas taip pat, tik vietoj galo rūgšties pilamas tirpiklis – 70% proc. V/V etanolis. Suminis fenolinių junginių kiekis išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentu gramui žaliavos, kuris apskaičiuojamas pagal formulę pateiktą aukščiau.

Galo rūgšties kalibracinė kreivė pavaizduota 7 paveiksle.



7 pav. Galo rūgšties kalibracinė kreivė

2.4.1.2. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometrijos metodu

Tiriamo tirpalo gamyba: į 5 ml matavimo kolbutę pilama 0,2 ml *A.vulgaris* ekstrakto, 2 ml 96 proc. V/V etanolio, 0,1 ml 30 proc. acto rūgšties tirpalo, 0,3 ml 10 proc. aliuminio chlorido tirpalo, 0,4 ml 5 proc. heksametilentetramino tirpalo. Kolbutės turinys praskiedžiamas išgrynintu vandeniu iki

žymės, sumaišomas, laikomas 30 min. tamsoje. Matuojamas 10 mm tirpalo sluoksnio absorbcijos dydis ir lyginamas su palyginamuoju tirpalu esant bangos ilgiui 407 nm.

Palyginamojo tirpalo gamyba: į 5 ml matavimo kolbutę įpilama 0,2 ml *A.vulgaris* ekstrakto, 2 ml 96 proc. V/V etanolio, 0,1 ml 30 proc. acto rūgšties tirpalo ir kolbutės turinys praskiedžiamas išgrynintu vandeniu iki žymės.

Suminis flavonoidų kiekis išreiškiamas kvercetino ekvivalentais gramui sausos žaliavos. Apskaičiuojama remiantis formule:

$$X = \frac{C \times V}{m}; mg/g$$

C – kvercetino koncentracija (mg/ml), nustatyta iš kalibracinės kreivės (pagal formulę $y=kx+b$); V – ekstrakto tūris (ml); m – vaistinės augalinės žaliavos asvertas kiekis (g).

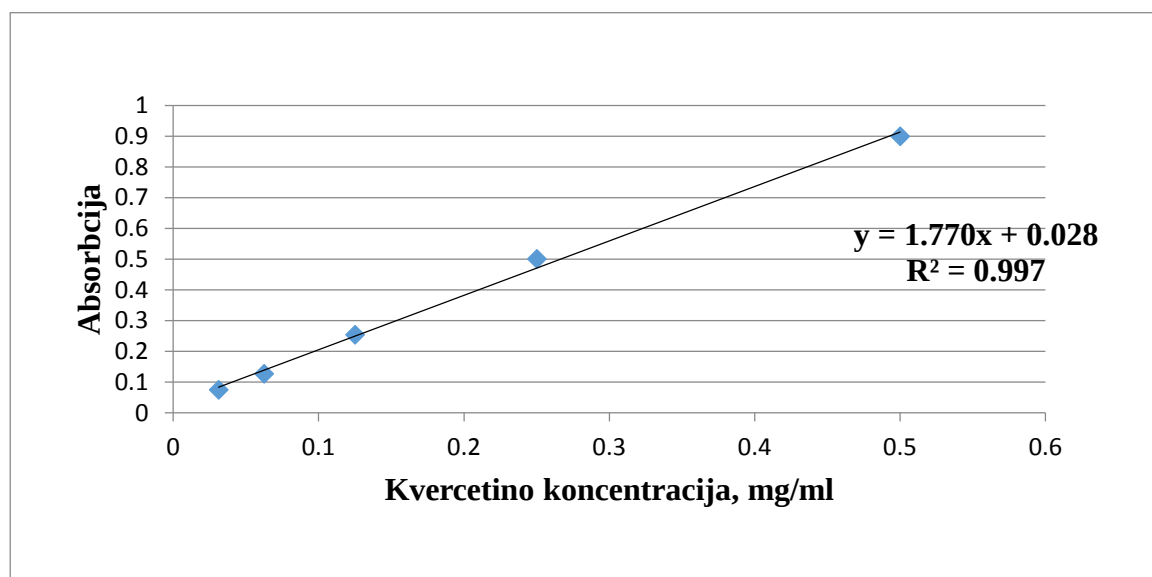
Kvercetino standartinių tirpalų gamyba

Darbinių kvercetino tirpalų gamyba. Gaminami 5 skirtingų koncentracijų kvercetino darbiniai tirpalai: 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml, 0,0625mg/ml, 0,03125mg/ml.

Metodika. Kvercetino tiriamieji ir palyginamieji tirpalai ruošiami kaip ir tiriamieji tirpalai, tačiau skirtingai nuo tiriamojo tirpalo, vietoj 0,2 ml *A.vulgaris* ekstrakto pilama 0,2 ml etaloninio kvercetino tirpalo. Bendras flavonoidų kiekis vertinamas pagal etalono kvercetino kalibracinę kreivę.

Suminis flavonoidų kiekis išreiškiamas kvercetino ekvivalentu gramui žaliavos, kuris apskaičiuojamas pagal formulę pateiktą aukščiau.

Kvercetino kalibracinė kreivė pavaizduota 8 paveiksle.



8 pav. Kvercetino kalibracinė kreivė

2.4.1.3. ABTS metodas laisvųjų radikalų surišimo įvertinimui

Pirminio tirpalo paruošimas. Atsveriami 0,548 g ABTS miltelių, jie suberiami į tamsaus stiklo buteliuką ir užpilama 50 ml distiliuoto vandens, milteliai ištirpinami. Į gautą tirpalą dedama 0,0095 g kalio persulfato. Mišinys sumaišomas ir laikomas tamsoje 16 valandų.

Darbinio tirpalo paruošimas. Pirminis ABTS tirpalas skiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 0,800 absorbcijos vienetų esant 734 nm bangos ilgiui. Palyginamasis tirpalas naudojamas distiliuotas vanduo.

Tyrimo metodika. Imama 3 ml darbinio ABTS tirpalo, pridedama 20 µl tiriamojo ekstrakto, gerai sumaišoma ir laikoma kambario temperatūroje 60 minučių. Spektrofotometru išmatuojama absorbcija esant 734 nm bangos ilgiui.

Pokytis apskaičiuojamas iš darbinio ABTS tirpalo absorbcijos atėmus tiriamų ekstraktų absorbciją. Šis pokytis parodo, kiek tiriami ekstraktai surišo ABTS radikalus –katijonus.

Laisvųjų radikalų surišimo geba išreiškiama standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentais (TE) gramui žaliavos. Apskaičiuojama pagal formulę:

$$\text{TEAC(ABTS)} = c \times V/m, \mu\text{mol/g}$$

c – trolokso koncentracija ($\mu\text{mol/L}$) nustatyta iš kalibracinės kreivės;

V – *A.vulgaris* ekstrakto tūris (ml);

m – tikslus atvertas žaliavos kiekis (g).

Trolokso standartinių tirpalų gamyba

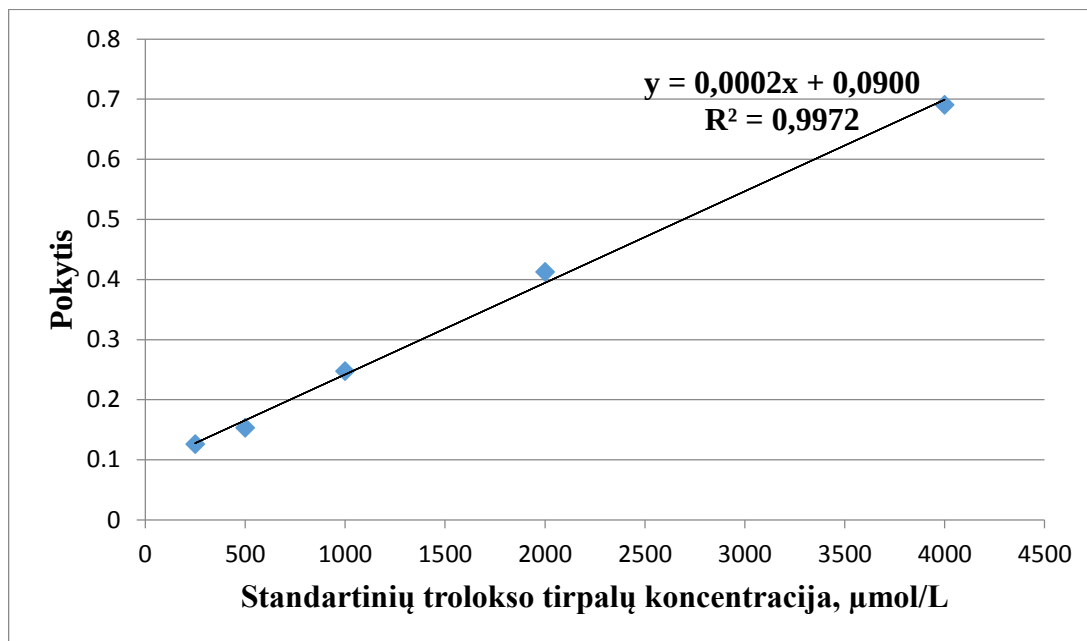
Darbinių trolokso tirpalų gamyba. Gaminami 5 skirtingų koncentracijų trolokso darbiniai tirpalai: 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml, 0,0625mg/ml.

Tyrimo metodika. Imama 3 ml darbinio ABTS tirpalo, pridedama 20 µl tiriamojo trolokso tirpalo (kiekvienos koncentracijos), gerai sumaišoma ir laikoma kambario temperatūroje 60 minučių. Spektrofotometru išmatuojama absorbcija nustačius 734 nm bangos ilgį.

Pokytis apskaičiuojamas iš darbinio ABTS tirpalo absorbcijos atėmus trolokso tirpalų absorbciją. Šis pokytis parodo, kiek trolokso tirpalai surišo ABTS radikalus – katijonus.

Laisvųjų radikalų surišimo geba išreiškiama antioksidanto trolokso ekvivalentais gramui žaliavos ir apskaičiuojama pagal formulę pateiktą aukščiau.

Trolokso kalibracinė kreivė ABTS metodui pavaizduota 9 paveiksle.



9 pav. Trolokso kalibracinė kreivė (ABTS laisvųjų radikalų surišimo įvertinimo metodui)

2.4.1.4. FRAP metodas redukcinio aktyvumo nustatymui

Paruošiami šie reagentai:

a) 300 mM acetatinis buferis: atsveriamas 3,1 g natrio acetato, suberiamas į 1000 ml matavimo kolbą, įpilama 16 ml ledinės acto rūgšties ir skiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės (pH 3,6).

b) Į 50 ml distiliuoto vandens įpilama 0,1695 ml koncentruotos druskos rūgšties. Gautame 40 mM druskos rūgšties tirpale tirpinami atsverti 0,1562 g TPTZ milteliai. Gaunamas 10 mM TPTZ tirpalas.

c) Atsveriamas 0,2703 g geležies (III) chlorido heksahidrato ir ištirpinama 50 ml distiliuoto vandens. Gaunamas 20mM geležies (III) chlorido heksahidrato tirpalas.

Darbinis FRAP reagentas ruošiamas sumaišant a), b), ir c) reagentus santykiu 10:1:1 (10 dalių acetatinio buferio, 1 dalis TPTZ tirpalo ir 1 dalis geležies (III) chlorido heksahidrato tirpalo).

Imama 3 ml darbinio FRAP reagento ir pridedama 20 μl tiriamo ekstrakto. Mišinys laikomas tamsoje, kambario temperatūroje 1 val. Spektrofotometru išmatuojamas mišinio absorbcija esant 593 nm bangos ilgiui (palyginamasis tirpalas ruošiamas taip pat, tačiau vietoj ekstrakto dedama tirpiklio).

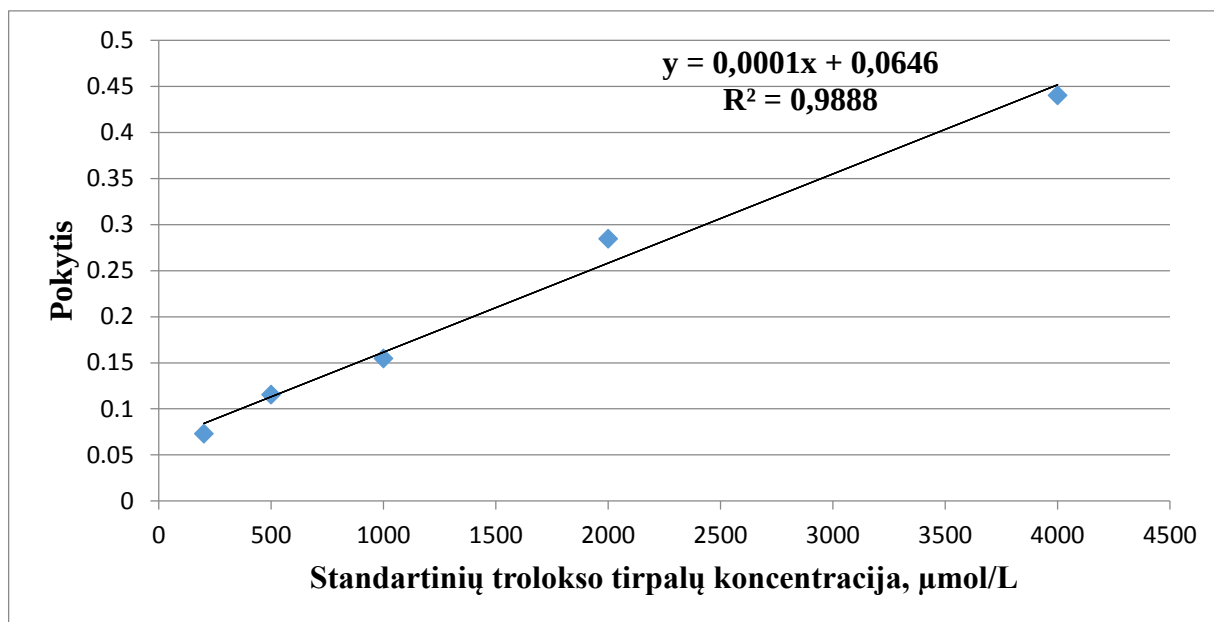
Redukcinio aktyvumo galia išreiškiama standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentais (TE) gramui žaliavos. Apskaičiuojama pagal formulę:

$$\text{TE}_{\text{FRAP}} = c \times V / m, \text{ mg/g}$$

c – trolokso koncentracija mg/ml nustatyta iš kalibracinės kreivės;

V – ekstrakto tūris ml;

m – tikslus atvertas žaliavos kiekis g.



10 pav. Trolokso kalibracinė kreivė (FRAP redukcinio aktyvumo įvertinimo metodui)

2.5. Tiriamojo laikotarpio meteorologinės sąlygos

Vegetacijos eigoje birželio – rugsėjo mėnesiais 2015 metais meteorologinės sąlygos:

1. Birželio mėnesis (vegetatyvinis augimas) – vidutinė birželio mėnesio oro temperatūra – 14,9 °C, kritulių kiekis 26mm.
2. Liepos mėnesio pradžia (butonizacija) ir liepos mėnesio vidurys (žydėjimas) – vidutinė liepos mėnesio oro temperatūra – 17,0 °C, kritulių kiekis – 84 mm. Lyginant su birželio mėnesiu, oro temperatūra pakilo 1,1 karto, kritulių kiekis padidėjo 3,2 karto. Liepos mėnesio 3-6d. užfiksuota kaitra (kai 1-2 dienas aukščiausia oro temperatūra siekia 30 °C ir daugiau).
3. Rugpjūčio mėnesis (žydėjimas) – vidutinė rugpjūčio mėnesio oro temperatūra – 19,3 °C , kritulių kiekis – 12mm. Lyginant su liepos mėnesiu, oro temperatūra pakilo 1,1 karto, kritulių kiekis sumažėjo 7 kartus. Rugpjūčio mėnesio 3-12 d. užfiksuota kaitra.
4. Rugsėjo mėnesio pradžia (sėklų branda) – vidutinė rugsėjo pradžios temperatūra 13,1 °C, kritulių kiekis 59mm. Lyginant su rugpjūčio mėnesiu, oro temperatūra nukrito 1,47 karto, o kritulių padidėjo 4,92 karto (51).

2.6. Efektyvioji skysčių chromatografija

ESC analizė atlikta naudojant Waters 2695 chromatografą (Milford, USA) su diodų matricos detektoriumi Waters 2998 (Milford, USA). Chromatografinis skirstymas atliktas naudojant 5- μ m ACE C18 analitinę kolonėlę (250 $\times$ 4.6 mm) su prieškolone 5- μ m ACE C18 (20 $\times$ 4.0 mm) (Aberdeen, Scotland), 25 °C temperatūroje. Eliuentų sistema: 1% (v/v) skruzdžių rūgšties (A) ir acetonitrilo (B). Eliucijos sistema: 10–15% tirpiklis B 0–20 min, 15% tirpiklis B 20–30 min, 15–30% tirpiklis B 30–45 min, 30–40% tirpiklis B 45–55 min. Judrios fazės tėkmės greitis 1 ml/min, injekcijos tūris - 10 μ l. Fenoliniai junginiai identifikuoti pagal smailių sulaikymo trukmę ir UV spektrą (λ = 200–600 nm) palyginant juos su žinomais standartais. Kiekybinis fenolinių junginių įvertinimas atliktas pagal standartų kalibracines kreives.

2.7. Duomenų statistinis įvertinimas

Duomenų statistinis įvertinimas atliktas „Microsoft Office Excel 2007“ (Microsoft, JAV) kompiuterine programa bei „SPSS Statistics 20“ (IBM, JAV) statistiniu paketu. Visi bandymai buvo atlikti tris kartus, išvestas gautų rezultatų matematinis vidurkis, apskaičiuota standartinė paklaida. Tiesinis regresijos modelis buvo panaudotas priklausomybės ryšiui tarp kintamųjų nustatyti. Koreliacinio ryšio stiprumas įvertintas Pirsono koreliacijos koeficientu (R). Reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$. Rezultatų statistinis patikimumas įvertintas taikant TTEST funkciją. Skirtumas laikomas statistiškai patikimu, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas paprastųjų kiečių ekstraktuose spektrofotometrinio metodu

Bioktyvių junginių komplekso sudėtis charakterizuoja augalinės žaliavos kokybę. Komplekso kokybinė ir kiekybinė sudėtis priklauso nuo daug veiksnių, tokių kaip augalo genetiniai faktoriai, evoliucija, meteorologinės sąlygos, dirvožemio cheminė sudėtis, užterštumas, žaliavos rinkimo laikas (10, 11, 19, 25, 26). Tad labai svarbu įvertinti natūraliose augavietėse augančių paprastųjų kiečių augalinės žaliavos fenolinių junginių komplekso ypatumus, nustatyti fenolinių junginių kiekių svyravimus.

3.1.1. Fenolinių junginių kiekio kitimas vegetacijos eigoje

Atlikti Girininkų kaime augančių paprastųjų kiečių žolės bendro fenolinių junginių kiekio tyrimai vegetacijos eigoje. Rezultatai pavaizduoti 11 pav.

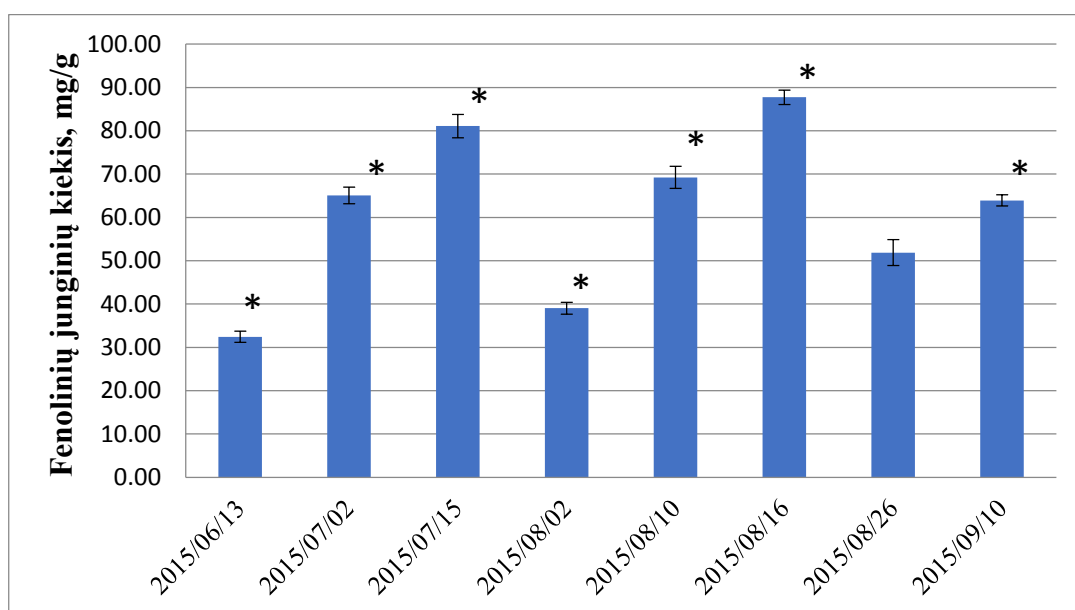
Artemisia vulgaris L. žolės didžiausias ($p < 0,05$) fenolinių junginių kiekis nustatytas rugpjūčio 16d. (masinio žydėjimo metu) rinktoje žaliavoje – $87,74 \pm 1,66$ mg/g. Mažiausias ($p < 0,05$) fenolinių junginių kiekis nustatytas birželio 13d. (vegetatyvinio augimo metu) rinktoje žaliavoje – $32,44 \pm 1,30$ mg/g.

Birželio mėnesį (vegetatyvinio augimo metu), paprastųjų kiečių žolėje, nustatytas mažiausias fenolinių junginių kiekis. Liepos pradžioje (butonizacijos metu) ir liepos viduryje (žydėjimo metu) nustatytas reikšmingas fenolinių junginių kiekio padidėjimas: fenolinių junginių liepos pradžioje rasta 2 kartus (50,15 proc.) daugiau, o liepos viduryje 2,5 karto (59,99 proc.) daugiau nei birželio mėnesį. Rugpjūčio mėnesio pradžioje (žydėjimo metu) pastebimas reikšmingas fenolinių junginių kiekio sumažėjimas. Fenolinių junginių sumažėjo 2,08 karto (51,85proc.), lyginant su liepos mėnesio viduriu. Rugpjūčio mėnesio viduryje fenolinių junginių kiekis nustatytas 2,2 karto (55,51 proc.) didesnis nei rugpjūčio mėnesio pradžioje. Reikšmingas fenolinių junginių skirtumas nenustatytas tarp žydėjimo pabaigoje (rugpjūčio pabaigoje) ir sėklų brandos metu (rugsėjo viduryje) rinktuose paprastųjų kiečių žolės mėginiuose. Rugsėjo pradžioje (sėklų brandos metu) nustatytas reikšmingai didesnis fenolinių junginių kiekis nei birželio mėnesį (vegetatyvinio augimo metu) – rugsėjo mėnesį fenolinių junginių nustatyta 1,9 karto (49,26 proc.) daugiau nei birželio mėnesį.

Nustatyta, kad besikeičiantys vegetacijos tarpsniai lemia fenolinių junginių kiekį. Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad mažiausias fenolinių junginių kiekis nustatomas vegetatyvinio augimo

metu, o žydėjimo metu nustatomas didžiausias fenolinių junginių kiekis (58). Šį dėsnumą patvirtina ir mūsų atlikti tyrimai.

Fenolinių junginių kiekio įvairavimą gali įtakoti ir aplinkos meteorologiniai veiksniai. Kaitra (kai 1-2 dienas aukščiausia oro temperatūra siekia 30 °C ir daugiau) užfiksuota liepos mėnesio 3-6d. ir rugpjūčio mėnesio 3-12 d (51). Po šių kaitros epizodų, tame pačiame vegetacijos tarpsnyje – žydėjimo metu, liepos mėnesio viduryje ir rugpjūčio mėnesio viduryje paprastųjų kiečių žolės ekstraktuose nustatytas reikšmingas fenolinių junginių kiekių šuolis. Po kaitros epizodo liepos mėnesį fenolinių junginių nustatyta 1,25 karto (19,75 proc) daugiau, o rugpjūčio mėnesį 1,77 karto (46,62 proc.) daugiau nei prieš kaitrą. Vegetacijos tarpsniai ir besikeičiantys aplinkos veiksniai lemia fenolinių junginių kaupimosi dėsningumus (52).



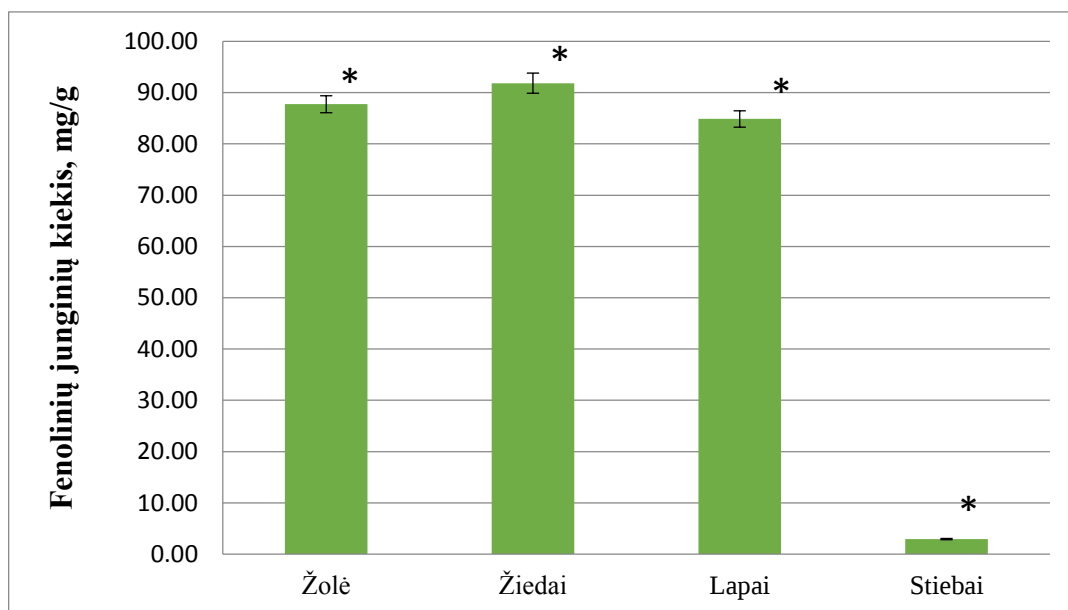
11 pav. Fenolinių junginių kiekio (mg/g) kitimas *A. vulgaris* L. žolės ekstraktuose vegetacijos eigose birželio – rugsėjo mėnesiais (n=3), *p<0,05

Užsienio mokslininkai yra atlikę fenolinių junginių kiekio tyrimų su paprastųjų kiečių žaliavomis (žole, lapais). Egipte augančių paprastųjų kiečių metanoliniuose žolės ekstraktuose nustatyta $19 \pm 0,16$ mg/g fenolinių junginių (40). Bulgarijoje augančiuose – $135,0 \pm 1,0$ mg/g (53), Nepale – $321,23 \pm 1,06$ mg/g fenolinių junginių (54). Ispanijoje metanoliniuose lapų ekstraktuose nustatytas fenolinių junginių kiekis $7,92 \pm 0,20$ mg/g (8), Pietų Afrikos Respublikoje augančių paprastųjų kiečių etanoliniuose žolės ekstraktuose nustatytas fenolinių junginių kiekis $28,62 \pm 0,05$ mg/g (55). Lietuvoje augančių paprastųjų kiečių žolės etanoliniuose ekstraktuose, vidutiniškai yra $61,30 \pm 1,98$ mg/g fenolinių junginių. Daug didesnis fenolinių junginių kiekis, lyginant su Lietuvoje augančia paprastųjų kiečių žole, yra Bulgarije, Nepale augančiuose paprastųjų kiečių žolėse. Ispanijoje,

Pietų Afrikos Respublikoje augančių paprastųjų kiečių žaliavos ekstraktuose nustatytas fenolinių junginių kiekis yra mažesnis nei Lietuvoje.

3.1.2. Fenolinių junginių kiekio kitimas skirtinguose augalo organuose

Atlikti paprastųjų kiečių skirtingų augalo organų bendro fenolinių junginių kiekio tyrimai masinio žydėjimo metu. Nustatyta, kad daugiausia ($p < 0,05$) fenolinių junginių yra žieduose – $91,85 \pm 1,95$ mg/g, žolėje ir lapuose nustatyta atitinkamai $87,74 \pm 1,66$ mg/g ir $84,87 \pm 1,60$ mg/g fenolinių junginių. Reikšmingai skyrėsi fenolinių junginių kiekis stiebuose – juose nustatyta tik $2,94 \pm 0,13$ mg/g. (12 pav.).



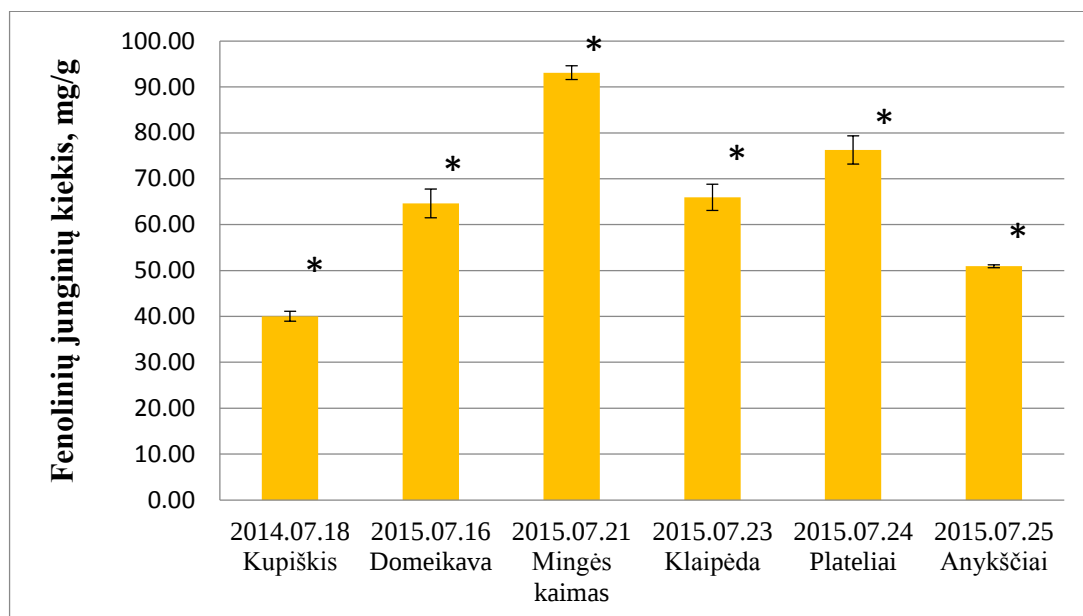
12 pav. Fenolinių junginių kiekio (mg/g) kitimas skirtinguose *A. vulgaris* augalo organuose (žolė, žiedai, lapai, stiebai) masinio žydėjimo metu ($n=3$), $*p < 0,05$

Marcinkevičienė ir kiti aprašė 2012 metais tirtų fenolinių junginių kiekį skirtingose augalo morfologinėse dalyse. Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas paprastųjų kiečių lapuose – $1,93$ mg/g (žolė tirta nebuvo). Mažiausias fenolinių junginių kiekis aptiktas stiebuose – $0,88$ mg/g. Žieduose fenolinių junginių kiekis nustatytas apie 20 procentų mažesnis nei lapuose – $1,55$ mg/g (9). Tyrimas patvirtina, kad mažiausiai fenolinių junginių nustatoma *A.vulgaris* stiebuose. Marcinkevičienė ir kiti daugiausia fenolinių junginių nustatė lapuose. Mūsų tyrimais nustatyta žieduose fenolinių junginių 7,6 procentais daugiau nei lapuose.

3.1.3. Fenolinių junginių kiekio kitimas skirtingose augavietėse.

Fenolinių junginių kiekis nustatytas iš 6 skirtingų Lietuvos augaviečių, masinio žydėjimo metu. Bendras fenolinių junginių kiekis varijuoja nuo $40,01 \pm 1,08$ mg/g iki $93,12 \pm 1,49$ mg/g.

Vidutinis fenolinių junginių kiekis $65,16 \pm 2,00$ mg/g. Didžiausias ($p < 0,05$) fenolinių junginių kiekis *Artemisia vulgaris* L. žolės ekstraktuose nustatytas Šilutės rajone, Mingės kaime rinktoje paprastųjų kiečių žolėje – $93,12 \pm 1,49$ mg/g. Mažiausias ($p < 0,05$) fenolinių junginių kiekis nustatytas Kupiškio mieste rinktoje paprastųjų kiečių žolėje – $40,01 \pm 1,08$ mg/g ir Anykščių mieste rinktoje žolėje – $50,93 \pm 0,34$ mg/g. Fenolinių junginių kiekio kitimas skirtingose augavietėse pavaizduotas 13 pav.



13 pav. Fenolinių junginių kiekio (mg/g) kitimas skirtingose *A. vulgaris* augalo augavietėse (Kupiškis, Domeikava, Mingės kaimas, Klaipėda, Plateliai, Anykščiai) ($n=3$), $*p < 0,05$

3.2. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas paprastųjų kiečių ekstraktuose spektrofotometrinio metodu

3.2.1. Flavonoidų kiekio kitimas vegetacijos eigoje

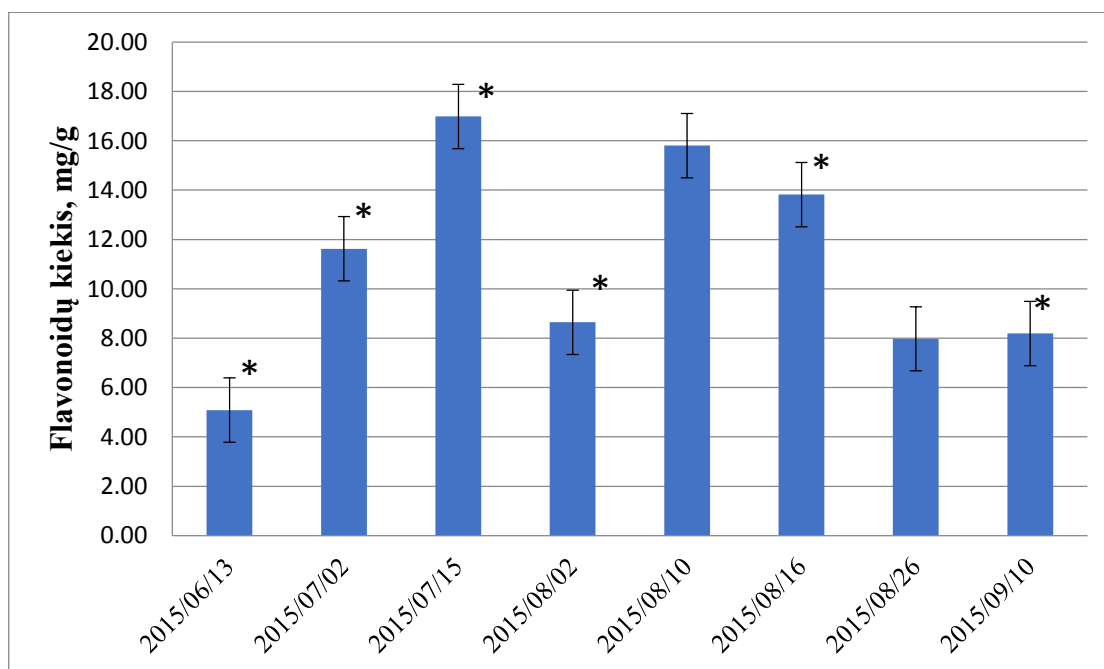
Didžiausias ($p < 0,05$) flavonoidų kiekis nustatytas liepos 15d. (masinio žydėjimo metu) rinktoje žaliavoje – $16,98 \pm 0,13$ mg/g. Mažiausias ($p < 0,05$) flavonoidų kiekis nustatytas birželio 13d. (vegetatyvinio augimo metu) rinktoje žaliavoje – $5,08 \pm 0,26$ mg/g. Rezultatai pavaizduoti 14 pav.

Flavonoidų kiekio kitimas vegetacijos eigoje panašus į fenolinių junginių kitimo dėsningumus. Liepos mėnesio pradžioje (butonizacijos metu) ir liepos mėnesio viduryje (žydėjimo metu) nustatytas reikšmingas flavonoidų kiekio padidėjimas: liepos mėnesio pradžioje flavonoidų nustatyta 2,29 karto (56,28 proc.) daugiau negu birželio mėnesį, o liepos mėnesio viduryje net 3,34 karto (70,07 proc.) daugiau nei birželio mėnesį (vegetatyvinio augimo metu). Rugpjūčio mėnesio pradžioje (žydėjimo metu) nustatytas reikšmingas flavonoidų kiekio sumažėjimas – flavonoidų kiekis paprastųjų kiečių žolėje nustatytas 1,96 karto (49,08 proc.) mažesnis nei liepos mėnesio viduryje.

Reikšmingas flavonoidų skirtumas nenustatytas tarp žydėjimo pabaigoje (rugpjūčio pabaigoje) ir sėklų brandos metu (rugsėjo viduryje) rinktų paprastųjų kiečių žolės mėginių. Rugsėjo pradžioje (sėklų brandos metu) nustatytas reikšmingai didesnis (1,6 karto (37,96 proc.)) flavonoidų kiekis nei birželio mėnesį (vegetatyvinio augimo metu). Flavonoidų kiekį lemia besikeičiantys vegetacijos tarpsniai. Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad didžiausias flavonoidų kiekis nustatomas žydėjimo metu, o mažiausias flavonoidų kiekis nustatomas vegetatyvinio augimo metu. Literatūros duomenimis, flavonoidų kiekis sėklų brandos metu nustatomas didesnis nei vegetatyvinio augimo metu (56). Tokie dėsningumai nustatyti ir mūsų tyrimuose.

Flavonoidų kiekio kitimą įtakoja ne tik besikeičiantys vegetacijos tarpsniai, bet ir aplinkos meteorologiniai veiksniai. Kaitra užfiksuota liepos mėnesio 3-6d. ir rugpjūčio mėnesio 3-12 d. (51). Po šių kaitros epizodų, tame pačiame vegetacijos tarpsnyje – žydėjimo metu liepos mėnesio viduryje ir rugpjūčio mėnesio viduryje paprastųjų kiečių žolės ekstraktuose pastebėtas reikšmingas flavonoidų, kaip ir fenolinių junginių, kiekų šuolis. Po kaitros epizodo liepos mėnesį flavonoidų nustatyta 1,46 karto (31,55 proc) daugiau, o rugpjūčio mėnesį 1,60 karto (37,43 proc.) daugiau flavonoidų nei prieš kaitrą.

Flavonoidų, kaip ir fenolinių junginių, maksimumas nustatytas žydėjimo metu. Tačiau skirtingai nei fenolinių junginių (jų maksimumas nustatytas rugpjūčio mėnesio viduryje), flavonoidų maksimumas pasiektas liepos mėnesio viduryje. Liepos mėnesio viduryje nustatyta 1,23 karto (18,63 proc.) daugiau flavonoidų nei rugpjūčio mėnesio viduryje.

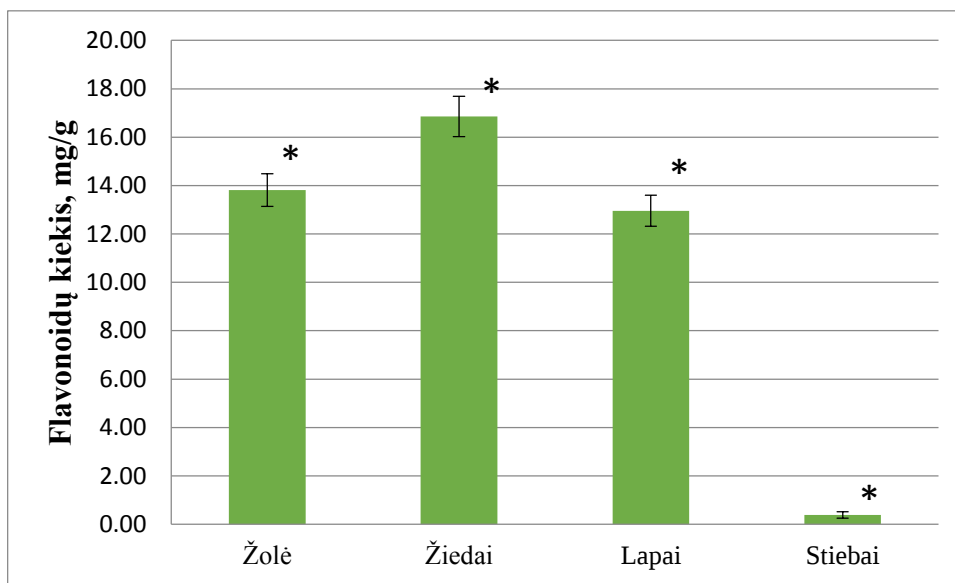


14 pav. Flavonoidų kiekio (mg/g) kitimas *A. vulgaris* L. žolės ekstraktuose vegetacijos eigoje birželio – rugsėjo mėnesiais (n=3), *p<0,05

Užsienio mokslininkai yra atlikę flavonoidų kiekio tyrimų su paprastųjų kiečių žaliavomis (žole, lapais). Egipte augančių paprastųjų kiečių metanoliniuose žolės ekstraktuose nustatyta $7,96 \pm 0,76$ mg/g flavonoidų (40), Bulgarijoje augančiuose – $103,7 \pm 0,4$ mg/g flavonoidų. (53), Nepale – $100,33 \pm 1,53$ mg/g flavonoidų (54). Lietuvoje vidutinis flavonoidų kiekis vegetacijos eigoje yra $11,02 \pm 0,41$ mg/g. Bulgarijoje, Nepale esantis flavonoidų (kaip ir fenolinių junginių) kiekis paprastųjų kiečių žolėje didesnis, o Lenkijoje mažesnis nei Lietuvoje rinktoje žolėje.

3.2.2. Flavonoidų kiekio kitimas skirtinguose augalo organuose

Nustatytas didžiausias ($p < 0,05$) flavonoidų kiekis žieduose – $16,86 \pm 0,83$ mg/g. Žolėje nustatyta $13,82 \pm 0,67$ mg/g flavonoidų, lapuose – $12,96 \pm 0,64$ mg/g. Stiebuose nustatytas reikšmingai mažiausias flavonoidų kiekis, lyginant su kitomis morfologinėmis dalimis – $0,38 \pm 0,13$ mg/g. Flavonoidų kiekis skirtingose morfologinėse dalyse pavaizduotas 15 pav.

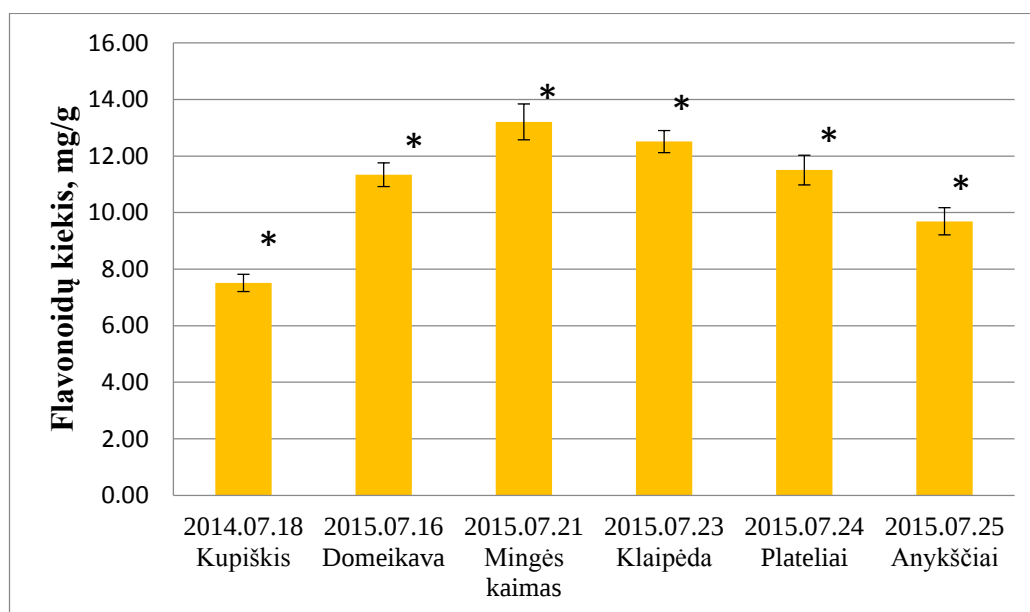


15 pav. Flavonoidų kiekio (mg/g) kitimas skirtinguose *A. vulgaris* augalo organuose (žolė, žiedai, lapai, stiebai) masinio žydėjimo metu ($n=3$), $*p < 0,05$

Tirti flavonoidų kiekio įvairavimai skirtingose paprastojo kiečio (augančio Serbijoje) morfologinėse dalyse (žolė tirta nebuvo). Nustatyta, kad flavonoidų koncentracija didžiausia žieduose, lapuose šiek tiek mažesnė nei žieduose. Mažiausia koncentracija nustatyta stiebuose (56). Mokslininkų duomenys patvirtina mūsų tyrimo metu gautus rezultatus ir galima teigti, kad didžiausius flavonoidų kiekius kaupia paprastųjų kiečių žiedai.

3.2.3. Flavonoidų kiekio kitimas skirtingose augavietėse

Bendras flavonoidų kiekis varijuoja nuo $7,5 \pm 0,3$ mg/g. iki $13,21 \pm 0,63$ mg/g. Vidutinis flavonoidų kiekis $10,96 \pm 0,46$ mg/g. Didžiausias ($p < 0,05$) flavonoidų kiekis *Artemisia vulgaris* L. žolės ekstraktuose nustatytas Šilutės rajone, Mingės kaime rinktoje paprastųjų kiečių žolėje – $13,21 \pm 0,63$ mg/g. Mažiausias ($p < 0,05$) flavonoidų kiekis nustatytas Kupiškio mieste rinktoje paprastųjų kiečių žolėje – $7,5 \pm 0,3$ mg/g ir Anykščių mieste rinktoje žolėje – $9,69 \pm 0,48$ mg/g. Flavonoidų kiekio kitimas skirtingose augavietėse pavaizduotas 16 pav.



16 pav. Flavonoidų kiekio (mg/g) kitimas skirtingose *A. vulgaris* augalo augavietėse (Kupiškis, Domeikava, Mingės kaimas, Klaipėda, Plateliai, Anykščiai) ($n=3$), $*p < 0,05$

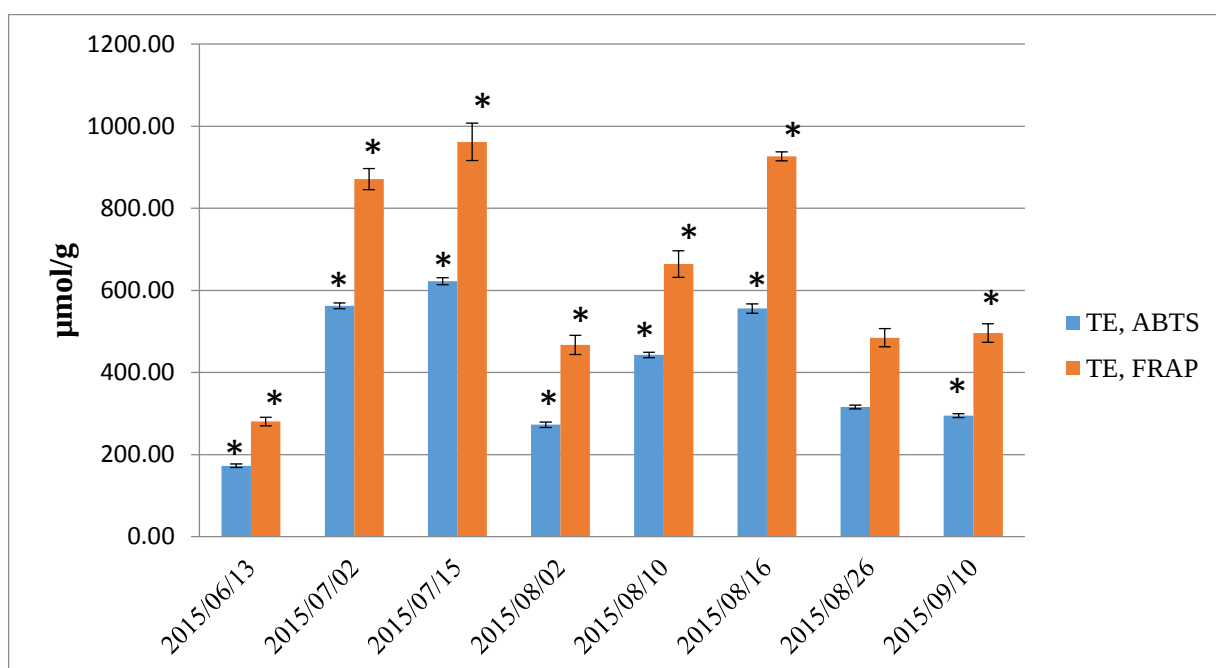
3.3. Antioksidantinio aktyvumo nustatymas ABTS ir FRAP metodais

3.3.1. Antioksidantinio aktyvumo įvairavimas paprastųjų kiečių žolės ekstraktuose vegetacijos eigoje

Nustatyta, kad vegetacijos eigoje antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas atitinkamai įvairuoja nuo $172,77 \pm 4,21$ $\mu\text{mol/g}$ iki $622,43 \pm 8,52$ $\mu\text{mol/g}$ ir nuo $280,50 \pm 10,33$ $\mu\text{mol/g}$ iki $961,86 \pm 45,48$ $\mu\text{mol/g}$. Didžiausias ($p < 0,05$) antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas nustatytas masinio žydėjimo metu liepos 15d. – $622,43 \pm 8,52$ $\mu\text{mol/g}$ (antiradikalinis aktyvumas) ir $961,86 \pm 45,48$ $\mu\text{mol/g}$ (redukcinis aktyvumas). Mažiausias ($p < 0,05$) antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas nustatytas vegetatyvinio augimo metu birželio 13d. – $172,77 \pm 4,21$ $\mu\text{mol/g}$ (antiradikalinis aktyvumas) ir $280,50 \pm 10,33$ $\mu\text{mol/g}$ (redukcinis aktyvumas) (17 pav.). Butonizacijos metu (liepos

pradžioje) ir žydėjimo metu (liepos viduryje) nustatytas reikšmingas antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo padidėjimas, lyginant su birželio viduriu (vegetatyvinio augimo metu). Tame pačiame vegetacijos tarpsnyje (žydėjimo metu) liepos viduryje ir rugpjūčio pradžioje, nustatytas reikšmingas antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo sumažėjimas. Reikšmingas antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas nenustatytas tarp žydėjimo pabaigoje (rugpjūčio pabaigoje) ir sėklų brandos metu (rugsėjo viduryje) rinktų paprastųjų kiečių žolės mėginių. Rugsėjo pradžioje (sėklų brandos metu) nustatytas reikšmingai didesnis antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas nei birželio mėnesį (vegetatyvinio augimo metu).

Liepos viduryje, esant didžiausiam antiradikaliniam ir redukciniam aktyvumui, nustatytas didžiausias flavonoidų kiekis. Remiantis šiais duomenimis, paprastųjų kiečių žolė vertingiausia liepos viduryje, masinio žydėjimo metu.



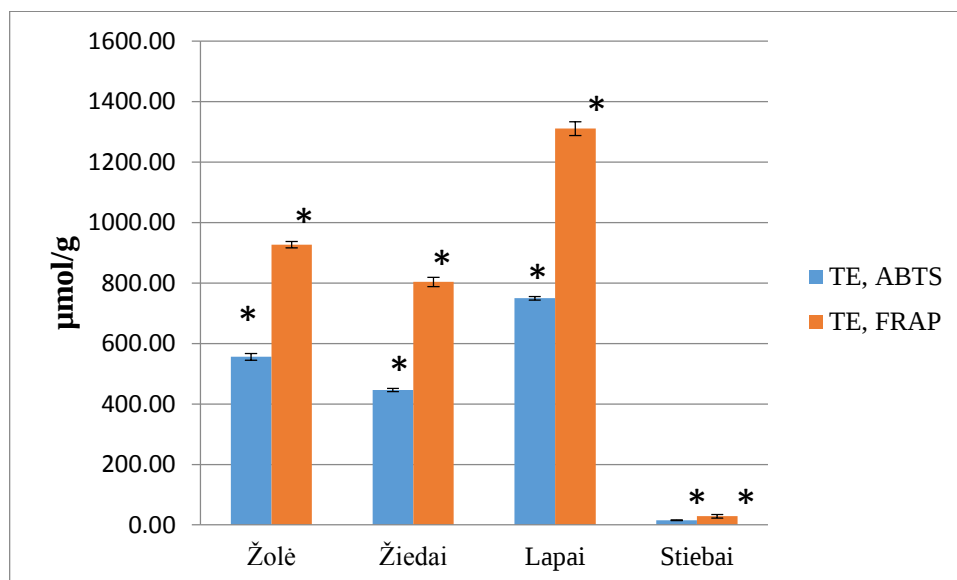
17 pav. Antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo (TE, $\mu\text{mol/g}$) kitimas *A. vulgaris L.* žolės ekstraktuose vegetacijos eigoje birželio – rugsėjo mėnesiais ($n=3$), $*p<0,05$

3.3.2. Antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas skirtinguose augalo organuose

Didžiausias ($p<0,05$) antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas nustatytas paprastųjų kiečių lapuose – $749,54 \pm 5,90 \mu\text{mol/g}$ (antiradikalinis aktyvumas) ir $1310,68 \pm 22,98 \mu\text{mol/g}$ (redukcinis aktyvumas). Žolėje nustatytas antiradikalinis aktyvumas – $555,79 \pm 11,30 \mu\text{mol/g}$, redukcinis aktyvumas – $926,65 \pm 10,93 \mu\text{mol/g}$. Žieduose antiradikalinis aktyvumas nustatytas $445,99 \pm 5,45 \mu\text{mol/g}$, redukcinis – $803,51 \pm 15,16 \mu\text{mol/g}$. Mažiausias ($p<0,05$) antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas nustatytas paprastųjų kiečių stiebuose – tesiekia $15,58 \pm 0,84 \mu\text{mol/g}$ (antiradikalinis

aktyvumas) ir $28,81 \pm 5,79 \mu\text{mol/g}$ (redukcinis aktyvumas). Paprastųjų kiečių lapuose nustatytas didžiausias antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas, daug fenolinių junginių taip pat nustatyta lapuose. Stiebuose nustatytas mažiausias antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas – juose nustatyti mažiausi fenolinių junginių ir flavonoidų kiekiai.

Antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas skirtingose morfologinėse dalyse pavaizduotas 18 pav.

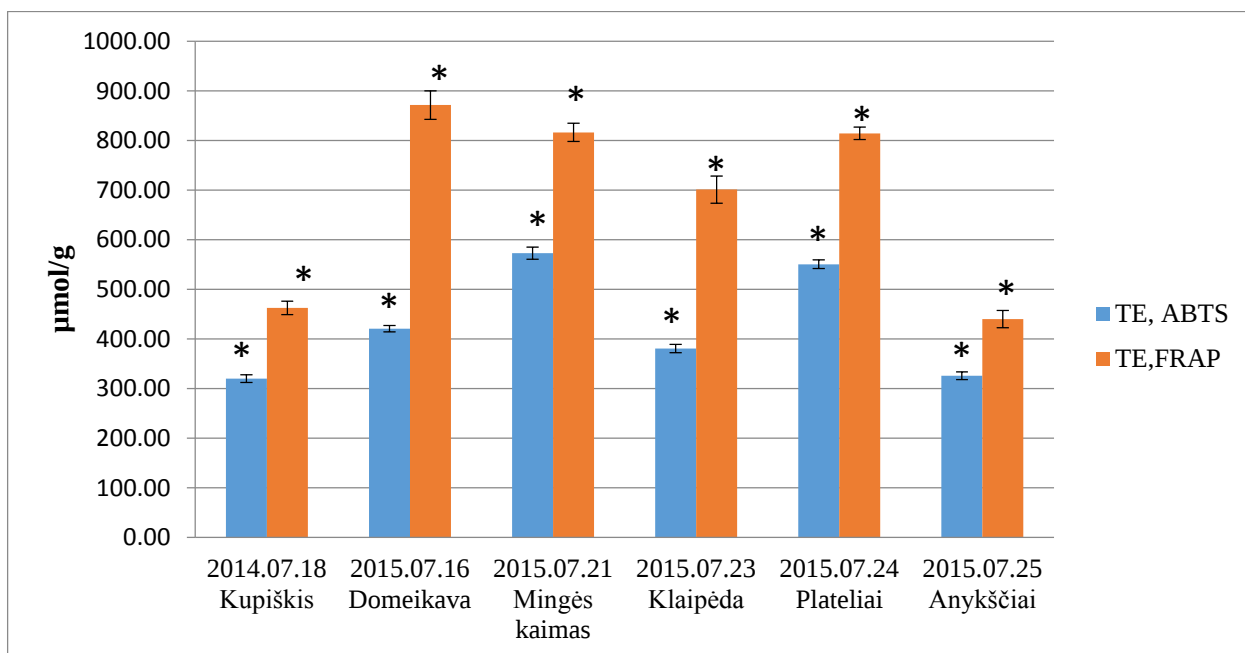


18 pav. Antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas (TE, $\mu\text{mol/g}$) *A. vulgaris* augalo organuose (žolė, žiedai, lapai, stiebai) masinio žydėjimo metu ($n=3$), * $p<0,05$

3.3.3. Antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo įvairavimas paprastųjų kiečių žolės ekstraktuose, surinktuose iš skirtingų augaviečių

Nustatyta, kad antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas paprastųjų kiečių žolės ekstraktuose, surinktuose iš skirtingų augaviečių, įvairuoja atitinkamai nuo $320,16 \pm 7,78 \mu\text{mol/g}$ iki $573,03 \pm 12,06 \mu\text{mol/g}$ ir nuo $440,02 \pm 17,34 \mu\text{mol/g}$ iki $871,56 \pm 28,66 \mu\text{mol/g}$. Didžiausias ($p<0,05$) antiradikalinis aktyvumas nustatytas Šilutės rajone, Mingės kaime rinktoje paprastųjų kiečių žolėje – $573,03 \pm 12,06 \mu\text{mol/g}$, mažiausias ($p<0,05$) antiradikalinis aktyvumas nustatytas Anykščių mieste rinktoje žolėje – $325,92 \pm 7,47 \mu\text{mol/g}$. ir Kupiškio mieste rinktoje žolėje – $320,16 \pm 7,78 \mu\text{mol/g}$. Didžiausias ($p<0,05$) redukcinis aktyvumas nustatytas Kauno rajone, Domeikavos kaime rinktoje žolėje – $871,56 \pm 28,66 \mu\text{mol/g}$. Mažiausias ($p<0,05$) redukcinis aktyvumas nustatytas Anykščių mieste rinktoje žolėje – $440,02 \pm 17,34 \mu\text{mol/g}$. ir Kupiškio mieste rinktoje žolėje – $462,89 \pm 13,53 \mu\text{mol/g}$. (19 pav.). Šilutės rajone, Mingės kaime rinktoje žolėje nustatytas didžiausias antiradikalinis aktyvumas, didžiausi fenolinių junginių ir flavonoidų kiekiai taip pat nustatyti Mingės kaime rinktoje žolėje. Mažiausias

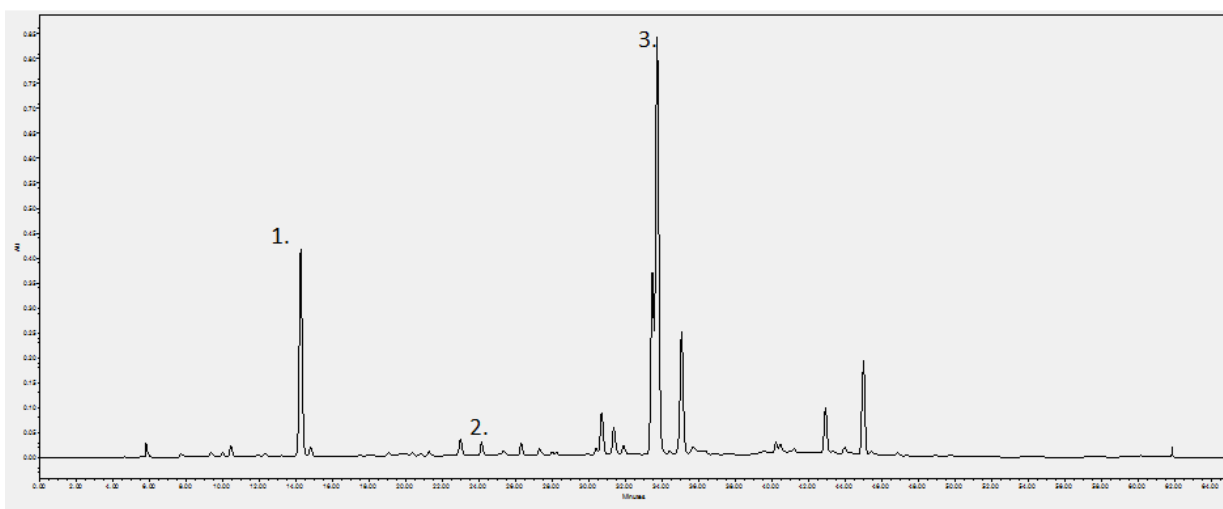
antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas nustatytas Anykščių mieste ir Kupiškio mieste rinktose žolėse, šiuose miestuose taip pat nustatytas mažiausias kiekis fenolinių junginių ir flavonoidų.



19 pav. Antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo (TE, $\mu\text{mol/g}$) įvairavimas paprastųjų kiečių žolės ekstraktuose, surinktuose iš įvairių Lietuvos regionų ($n=3$), $*p<0,05$

3.4. Fenolinių junginių nustatymas paprastųjų kiečių augalinėje žaliavoje ESC metodu

Efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodas yra taikomas fenolinių junginių komplekso identifikavimui, kiekybiniam įvertinimui ir dominuojančių junginių nustatymui (24). Atlikus ESC analizę paprastųjų kiečių žaliavų etanoliniuose ekstraktuose nustatyti šie junginiai: 3,5-dikafeilchino rūgštis, chlorogeno rūgštis, rutinas (20 pav.).

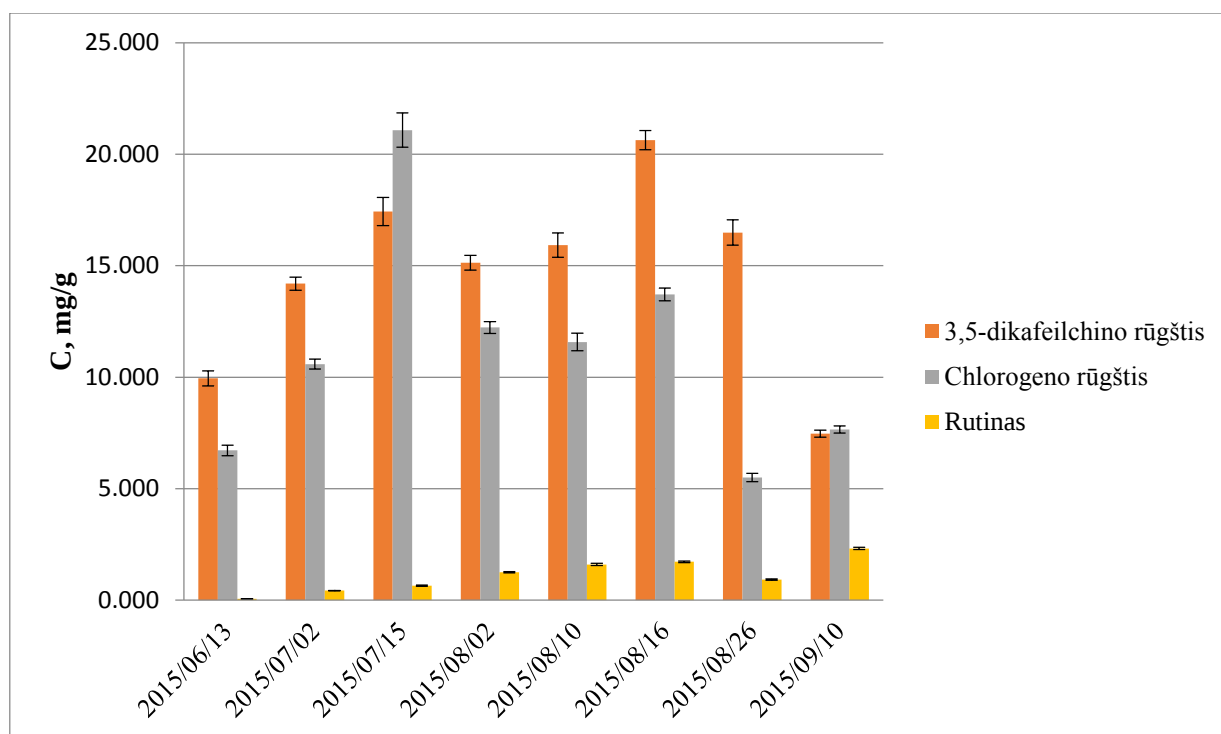


20 pav. Paprastųjų kiečių žolės etanolinio ekstrakto ESC chromatograma. 1 - chlorogeno rūgštis, 2 – rutinas, 3 - 3,5-dikafeilchino rūgštis

3.4.1. Fenolinių junginių kiekio įvairavimo nustatymas *Artemisia vulgaris* L. žolės ekstraktuose vegetacijos metu, naudojant ESC metodą

3,5-dikafeilchino rūgšties kiekis varijuoja nuo $7,46 \pm 0,16$ mg/g iki $20,69 \pm 0,43$ mg/g, Chlorogeno rūgšties kiekis varijuoja nuo $5,50 \pm 0,19$ mg/g iki $21,09 \pm 0,77$ mg/g, rutino kiekis – nuo $0,057 \pm 0,002$ mg/g iki $2,32 \pm 0,05$ mg/g. Didžiausias 3,5-dikafeilchino rūgštis kiekis nustatytas rugpjūčio 16d. (masinio žydėjimo metu) rinktoje žolėje – $20,63 \pm 0,43$ mg/g. Chlorogeno rūgšties daugiausia nustatyta liepos 15d. (masinio žydėjimo metu) rinktoje žolėje – $21,09 \pm 0,77$ mg/g. Rutino didžiausia koncentracija nustatyta rugsėjo 10d. (sėklų brandos metu) – $2,32 \pm 0,05$ mg/g. (21 pav.).

Vegetatyvinio augimo metu 3,5-dikafeilchino rūgšties randama 1,49 karto (32,82 proc.) daugiau nei chlorogeno rūgšties ir 174,46 karto (99,43 proc.) daugiau nei rutino. Butonizacijos metu 3,5-dikafeilchino rūgštis taip pat dominuojanti – jos randama 1,34 karto (25,43 proc.) daugiau nei chlorogeno rūgšties ir 32,25 karto (97,00 proc.) daugiau nei rutino. Masinio žydėjimo metu (liepos mėnesio viduryje), dominuojantis junginys tampa chlorogeno rūgštis – jo randama 1,21 karto (17,30 proc.) daugiau nei 3,5-dikafeilchino rūgšties ir 32,74 kartus (96,95 proc.) daugiau nei rutino. Rugpjūčio mėnesį (masinio žydėjimo metu) dominuojantis junginys vėl tampa 3,5-dikafeilchino rūgštis. 3,5-dikafeilchino rūgšties žydėjimo pabaigoje (rugpjūčio mėnesio pabaigoje) randama 2,30 karto (66,64 proc.) daugiau nei chlorogeno rūgšties ir 17,87 karto (94,40 proc.) daugiau nei rutino. Sėklų brandos metu (rugsėjo mėnesio viduryje) 3,5-dikafeilchino rūgšties ir chlorogeno rūgšties kiekiai tampa labai panašūs - chlorogeno rūgšties randama tik 1,03 karto (2,5 proc.) daugiau nei 3,5-dikafeilchino rūgšties ir 3,31 karto (69,74 proc.) daugiau nei rutino. Apibendrinant, 3,5-dikafeilchino rūgšties koncentracija beveik visame vegetacijos laikotarpyje didžiausia, išskyrus liepos vidury, žydėjimo metu, kuomet dominuojantis junginys tampa chlorogeno rūgštis, o sėklų brandos metu 3,5-dikafeilchino rūgšties ir chlorogeno rūgšties koncentracija supanašėja. Rutino kiekis vegetacijos laikotarpiu vis didėja, maksimumą pasiekia sėklų brandos metu. Paprastųjų kiečių žolėje chlorogeno rūgšties didžiausia koncentracija randama liepos viduryje, kuomet nustatytas maksimalus bendras flavonoidų kiekis. 3,5-dikafeilchino rūgštis maksimumą pasiekia rugpjūčio viduryje, kuomet nustatytas maksimalus bendras fenolinių junginių kiekis.

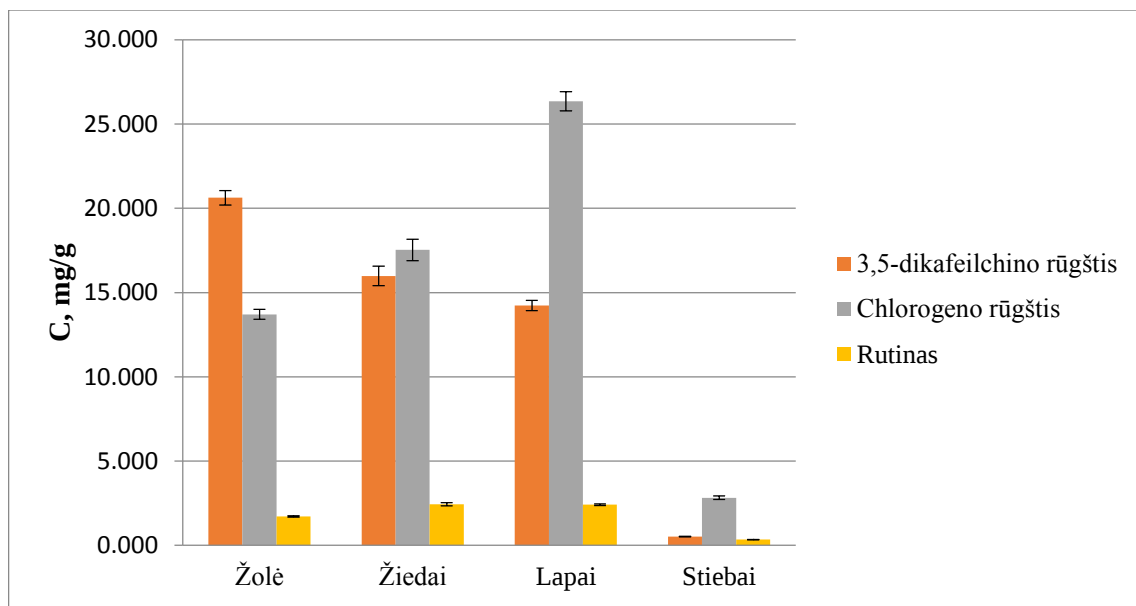


21 pav. 3,5-dikafeilchino rūgšties, chlorogeno rūgšties, rutino (mg/g) kitimas *A. vulgaris* žolės ekstraktuose vegetacijos eigoje birželio – rugsėjo mėnesiais (n=3)

Bulgarijoje augančių paprastųjų kiečių žolės metanoliniuose ekstraktuose daugiausia nustatyta chlorogeno rūgštis – $1,70 \pm 0,10$ mg/g, rutino – $0,87 \pm 0,06$ mg/g (23), Indijoje augančiuose paprastųjų kiečių lapų metanoliniuose ekstraktuose – kumarino klasės junginių (eskuletino, skopolino) (4). Serbijoje augančių paprastųjų kiečių metanoliniuose lapų ekstraktuose daugiausia nustatyta 3,5-dikafeilchino rūgštis – 26 ± 2 mg/g (24). Lenkijoje tirtų paprastųjų kiečių žolėje daugiausiai aptikta p-kumaro rūgštis – $3,04 \pm 0,01$ mg/g (6).

3.4.2. Fenolinių junginių kiekio nustatymas skirtinguose augalo organuose ESC metodu

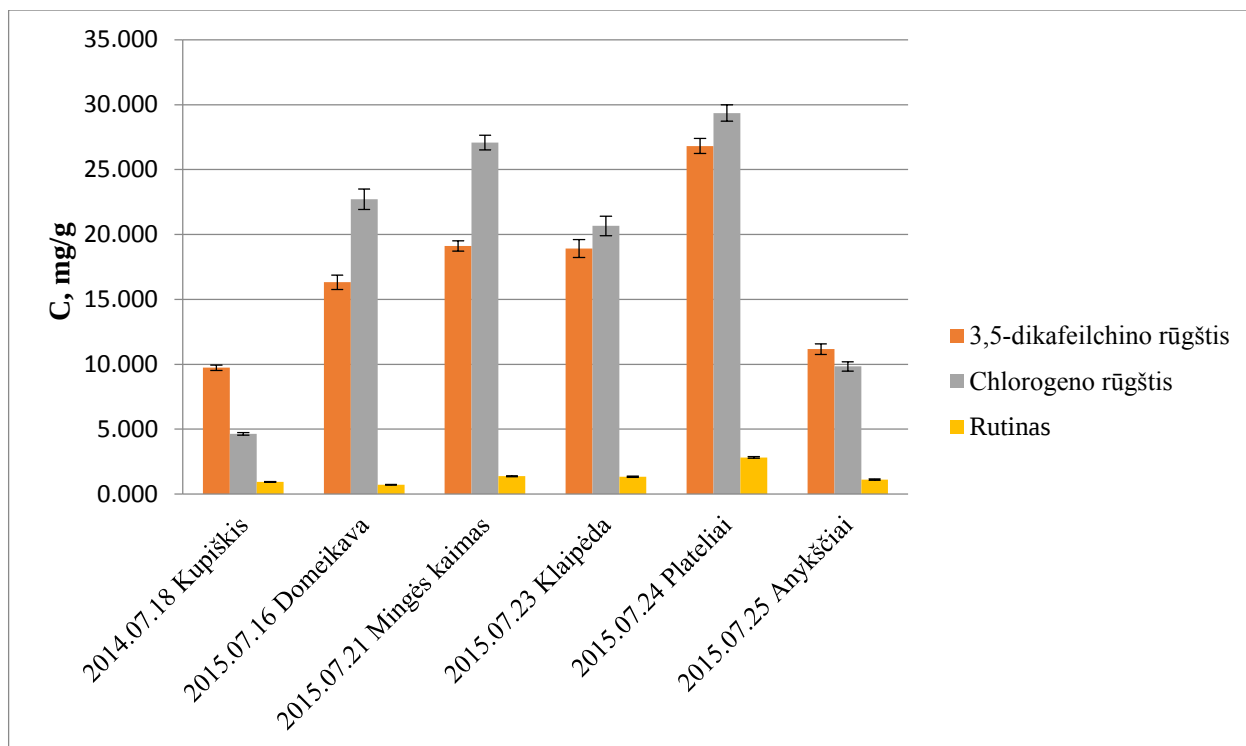
Nustatytas reikšmingas bioaktyvių junginių pasiskirstymas skirtinguose *A. vulgaris* augalinėse žaliavose. Didžiausias 3,5-dikafeilchino rūgštis kiekis nustatytas paprastųjų kiečių žolėje ($20,63 \pm 0,43$ mg/g), chlorogeno rūgštis – lapuose ($26,35 \pm 0,57$ mg/g), rutino – žieduose ($2,42 \pm 0,05$ mg/g). (22 pav.).



22 pav. 3,5-dikafeilchino rūgšties, chlorogeno rūgšties, rutino kiekio (mg/g) kitimas skirtinguose A. vulgaris augalo organuose (žolė, žiedai, lapai, stiebai) masinio žydėjimo metu (n=3)

3.4.3. Fenolinių junginių kiekio kitimo nustatymas skirtingose augavietėse ESC metodu

Dominuojantis junginys paprastųjų kiečių žolėje, surinktoje iš skirtingų augaviečių masinio žydėjimo metu, yra chlorogeno rūgštis. Jos kiekis varijuoja nuo $4,64 \pm 0,10$ mg/g iki $29,36 \pm 0,63$ mg/g. 3,5-dikafeilchino rūgšties ir rutino kiekis varijuoja atitinkamai nuo $9,74 \pm 0,21$ mg/g iki $26,82 \pm 0,58$ mg/g ir nuo $0,71 \pm 0,02$ mg/g iki $2,82 \pm 0,06$ mg/g. Lyginant skirtingose augavietėse augančių paprastųjų kiečių ekstraktuose kaupiamų medžiagų kiekį, didžiausias chlorogeno rūgšties, 3,5-dikafeilchino rūgšties, rutino kiekis nustatytas Plungės rajone, Platelių miestelyje rinktoje paprastųjų kiečių žolėje, atitinkamai: $29,36 \pm 0,63$ mg/g, $26,82 \pm 0,58$ mg/g, $2,82 \pm 0,06$ mg/g. Mažiausias chlorogeno rūgšties ir 3,5-dikafeilchino rūgšties kiekis nustatytas Kupiškio mieste rinktoje žolėje: atitinkamai $4,64 \pm 0,10$ mg/g ir $9,74 \pm 0,21$ mg/g, mažiausias rutino kiekis nustatytas Kauno rajone, Domeikavos kaime rinktoje žolėje ($0,71 \pm 0,02$ mg/g).



23 pav. 3,5-dikafeilchino rūgšties, chlorogeno rūgšties, rutino kiekio (mg/g) kitimas skirtingose A. vulgaris augalo augavietėse (Kupiškis, Domeikava, Mingės kaimas, Klaipėda, Plateliai, Anykščiai) (n=3)

3.5. Koreliacinių ryšių analizė

Koreliacijos koeficientai pavaizduoti 4 lentelėje.

4 lentelė. Koreliacijos koeficientai

	Bendras fenolinių junginių kiekis, mg/g	Bendras flavonoidų kiekis, mg/g	ABTS (TE, $\mu\text{mol/g}$)	FRAP (TE, $\mu\text{mol/g}$)	3,5-dikafeilchino rūgšties kiekis, mg/g	Chlorogeno rūgšties kiekis, mg/g	Rutino kiekis, mg/g
Bendras fenolinių junginių kiekis, mg/g	1	0,903	0,881	0,867	0,732	0,734	0,608
Bendras flavonoidų kiekis, mg/g	0,903	1	0,816	0,804	0,700	0,736	0,451
ABTS (TE, $\mu\text{mol/g}$)	0,881	0,816	1	0,996	0,709	0,752	0,462
FRAP (TE, $\mu\text{mol/g}$)	0,967	0,804	0,966	1	0,754	0,772	0,468

Labai stiprūs tarpusavio ryšiai nustatyti tarp: bendro fenolinių junginių kiekio ir redukcinio aktyvumo (0,967), antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo (0,966), bendro fenolinių junginių ir bendro flavonoidų kiekio (0,903). Silpniausias tarpusavio ryšys nustatytas tarp rutino ir antiradikalinio aktyvumo (0,468), rutino ir redukcinio aktyvumo (0,468). Visos priklausomybės yra statistiškai reikšmingos.

Remiantis atliktais tyrimais ir gautais koeficientais galima teigti, kad antioksidantinis aktyvumas paprastųjų kiečių žolėje labiausiai priklauso nuo fenolinių junginių kiekio. Taigi stipriausias antioksidantinis aktyvumas paprastųjų kiečių žolėje vegetacijos metu būdingas masinio žydėjimo metu, kuomet augalas kaupia daugiausia fenolinių junginių.

3.6. Tyrimo rezultatų apibendrinimas

Apibendrinant atliktų tyrimų rezultatus galima teigti, kad vegetacijos eigoje fenolinių junginių ir flavonoidų kiekis, antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas kinta priklausomai nuo vegetacijos tarpsnio: vegetatyvinio augimo metu nustatyti mažiausi bioktyvių junginių kiekiai ir žaliavos pasižymi silpniausiu antioksidantiniu aktyvumu, butonizacijos ir žydėjimo metu nustatytas reikšmingas bioaktyvių junginių ir antioksidantinio aktyvumo padidėjimas. Sėklų brandos metu fenolinių junginių ir flavonoidų kiekis reikšmingai didesnis nei vegetatyvinio augimo metu, nustatyti reikšmingai didesni antioksidantinio aktyvumo įverčiai. Įvertinus gautus tyrimo rezultatus galima teigti, kad paprastųjų kiečių žolė vertingiausia žydėjimo metu, kadangi tuomet nustatytas didžiausias fenolinių junginių, flavonoidų, kiekis, žolė pasižymi didžiausiu antiradikaliniu ir redukciniu aktyvumu.

Paprastųjų kiečių žaliavose nustatyti šie junginiai: 3,5-dikafeilchino rūgštis, chlorogeno rūgštis, rutinas. Rutino kiekis vegetacijos laikotarpiu didėja, maksimumą pasiekia sėklų brandos metu. Nustatyta, kad 3,5-dikafeilchino rūgštis yra dominuojantis junginys visu vegetacijos laikotarpiu, išskyrus žydėjimo metu, liepos viduryje, kuomet dominuojantis junginys tampa chlorogeno rūgštis. Sėklų brandos metu 3,5-dikafeilchino rūgšties ir chlorogeno koncentracija reikšmingai nesisikiria.

Tyrimo metu nustatyta, kad daugiausia fenolinių junginių ir flavonoidų paprastųjų kiečių žolė kaupia žieduose, tačiau didžiausiu antiradikaliniu ir redukciniu aktyvumu pasižymi lapai.

Įvertinus koreliacinę ryšį, nustatyta stipri teigiama koreliacija tarp fenolinių junginių kiekio, flavonoidų kiekio, antiradikalinio aktyvumo, redukcinio aktyvumo.

4. IŠVADOS

1. Nustatyta, kad didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis yra rugpjūčio viduryje (masinio žydėjimo metu) rinktoje žaliavoje – $87,74 \pm 1,66$ mg/g. Mažiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas birželio viduryje (vegetatyvinio augimo metu) rinktoje žolėje – $32,44 \pm 1,30$ mg/g. Didžiausias fenolinių junginių kiekis *Artemisia vulgaris* L. žolės ekstraktuose nustatytas Šilutės rajone, Mingės kaime rinktoje paprastųjų kiečių žolėje – $93,12 \pm 1,49$ mg/g.
2. Nustatyta, kad didžiausias flavonoidų kiekis yra liepos viduryje (masinio žydėjimo metu) rinktoje žaliavoje – $16,98 \pm 0,13$ mg/g. Mažiausias flavonoidų kiekis nustatytas birželio viduryje (vegetatyvinio augimo metu) rinktoje žaliavoje – $5,08 \pm 0,26$ mg/g. Didžiausias flavonoidų kiekis *Artemisia vulgaris* L. žolės ekstraktuose nustatytas Šilutės rajone, Mingės kaime rinktoje paprastųjų kiečių žolėje – $13,21 \pm 0,63$ mg/g.
3. Ištirta, kad didžiausiu antiradikaliu aktyvumu pasižymi liepos viduryje (masinio žydėjimo metu) augančių paprastųjų kiečių žolė – $622,43 \pm 8,52$ μ mol/g. Mažiausiu antiradikaliu aktyvumu pasižymi birželio viduryje (vegetatyvinio augimo metu) augančių paprastųjų kiečių žolė – $172,77 \pm 4,21$ μ mol/g. Didžiausias ($p < 0,05$) antiradikalinis nustatytas Šilutės rajone, Mingės kaime rinktoje paprastųjų kiečių žolėje – $573,03 \pm 12,06$ μ mol/g.
4. Ištirta, kad didžiausiu redukciniu aktyvumu pasižymi liepos viduryje (masinio žydėjimo metu) augančių paprastųjų kiečių žolė – $961,86 \pm 45,48$ μ mol/g. Mažiausiu redukciniu aktyvumu pasižymi birželio viduryje (vegetatyvinio augimo metu) augančių paprastųjų kiečių žolė – $280,50 \pm 10,33$ μ mol/g. Didžiausias ($p < 0,05$) redukcinis aktyvumas nustatytas Kauno rajone, Domeikavos kaime rinktoje paprastųjų kiečių žolėje – $871,56 \pm 28,66$ μ mol/g.
5. Atlikus ESC analizę paprastųjų kiečių žaliavų etanoliniuose ekstraktuose nustatyti šie junginiai: 3,5-dikafeilchino rūgštis, chlorogeno rūgštis, rutinas. Nustatyta, kad daugiausia 3,5-dikafeilchino rūgštis yra rugpjūčio mėnesį (masinio žydėjimo metu) rinktoje žolėje – $20,63 \pm 0,43$ mg/g. Chlorogeno rūgštis daugiausia nustatyta liepos mėnesį (masinio žydėjimo metu) rinktoje žolėje – $21,09 \pm 0,77$ mg/g. Rutino didžiausia koncentracija nustatyta rugsėjo mėnesį (sėklų brandos metu) – $2,32 \pm 0,05$ mg/g. Didžiausias 3,5-dikafeilchino rūgštis kiekis nustatytas paprastųjų kiečių žolėje ($20,63 \pm 0,43$ mg/g), chlorogeno rūgštis – lapuose ($26,35 \pm 0,57$ mg/g), rutino – žieduose ($2,42 \pm 0,05$ mg/g).

5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Ištyrus paprastųjų kiečių žolės ekstraktus vegetacijos metu galima teigti, kad kad paprastųjų kiečių žolė vertingiausia žydėjimo metu, kadangi tuomet nustatytas didžiausias fenolinių junginių kiekis, flavonoidų kiekis, žolė pasižymi didžiausiu antiradikaliniu ir redukciniu aktyvumu.

Tikslinga atlikti tolimesnius tyrimus, siekinat išsiaiškinti daugiamečių fenolinių junginių kiekio ir antioksidantinio aktyvumo įvairavimus vegetacijos laikotarpiu, bei palyginti su mūsų tyrimo metu gautais rezultatais. Taip pat būtų tikslinga nustatyti, kaip vegetacijos laikotarpiu kinta paprastųjų kiečių žolės fenolinių junginių kiekis ir antioksidantinis aktyvumas, priklausomai nuo hidrometeorologinių sąlygų.

6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

- (1) Judžientienė A, Buzelytė J. Chemical composition of essential oils of *Artemisia vulgaris* L. (mugwort) from North Lithuania. 2006:12-15.
- (2) Nikolova M, Ivancheva S. Quantitative flavonoid variations of *Artemisia vulgaris* L. and *Veronica chamaedrys* L. in relation to altitude and polluted environment. 2005:29-32.
- (3) Chanaj-Kaczmarek J, Wysocki M, Karachitos A. Effects of plant extract antioxidative phenolic compounds on energetic status and viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells undergoing oxidative stress. 2015:365.
- (4) Haniya K, Padma P. Phytochemical investigation of methanolic extract of *Artemisia vulgaris*, l. leaves. 2014 April:184.
- (5) Embuscado ME. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. 2015:811-819.
- (6) Wojdyło A, Oszmianski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. 2007:940-949.
- (7) Dobiáš P, Pavlíková P, Adam M. Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. 2010:87-95.
- (8) Melguizo MD, Diaz-de-Cerio E, Quirantes-Piné R, Švarc-Gajić J. The potential of *Artemisia vulgaris* leaves as a source of antioxidant phenolic compounds. 2014:192-200.
- (9) Marcinkevičienė A, Eimutytė E, Antanavičienė G. Paprastojo kiečio (*Artemisia vulgaris* L.) alelopatinis poveikis žieminiams kviečiams ir vasariniams miežiams. 2014:201-208.
- (10) A. Vičkutė. PASTARASTOJO KIEČIO (*Artemisia vulgaris* L.) BIOLOGINIŲ SAVYBIŲ PRIKLAUSOMYBĖ NUO AUGAVIETĖS EDAFINIŲ IR KLIMATINIŲ YPATUMŲ. Kaunas: Lietuvos žemės ūkio universitetas; 2009.
- (11) Martins N, Barros L, C.F.R. Ferreira I. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. 2015:1-12.
- (12) *Artemisia vulgaris* L. Prieiga internete:
http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=35505.
 (2016.03.08)
- (13) Kryževičienė A, Šarūnaitė L, Stukonis V. Daugiamečių kiečių (*Artemisia vulgaris* L. ir *Artemisia dubia* Wall.) potencialo biokuro gamybai įvertinimas. 2010:32-40.
- (14) Turi CE, Shipley PR, Murch SJ. North American *Artemisia* species from the subgenus *Tridentatae* (Sagebrush): A phytochemical, botanical and pharmacological review. 2014:10.
- (15) Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules*. 2012:2542-2566.

- (16) Barney J, Hay A, Weston L. Isolation and characterization of allelopathic volatiles from mugwort (*Artemisia vulgaris*). 2004:248.
- (17) Gudžinskas Z, Balvočiūtė J. Lietuvos vaistiniai augalai. Kaunas; 2007. p. 72-73.
- (18) Jaskonis J. Augalai - mūsų gyvenimas. Vilnius; 1996. p. 144.
- (19) Barney JN, DiTommaso A. The biology of Canadian weeds. 118. *Artemisia vulgaris* L. 2002:205-2015.
- (20) Thao N, Thuy N, Hoi T. *Artemisia vulgaris* L. from Vietnam: Chemical Variability and Composition of the Oil Along the Vegetative Life of the Plant. 2011:357-361.
- (21) Jerkovic I, Mastelic J, Milos M, Juteau F. Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia. 2002:436-440.
- (22) Zhigzhitzhapova SV, Radnaeva LD, Gao Q. Chemical composition of volatile organic compounds of *Artemisia vulgaris* L. (Asteraceae) from the Qinghai–Tibet Plateau. 2015:469.
- (23) Dagnon S, Ivanov I, Bojilov D, Docheva M, Statkova S. Evaluation of the Main Polyphenolic Compounds in Aromatic Plants of Asteraceae and Solanaceae Families of Bulgarian Origin. 2013:76.
- (24) Melguizo-Melguizo D, Diaz-de-Cerio E, Quirantes-Piné R. The potential of *Artemisia vulgaris* leaves as a source of antioxidant phenolic compounds. 2014:192-200.
- (25) Martins S, Mussatto IS, Martínez-Avila G. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. 2011:365-373.
- (26) Riedel H, Cai Z, Kütük O, Smetanska I. Obtaining phenolic acids from cell cultures of various *Artemisia* species. 2010:8805.
- (27) Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. 2013:2328.
- (28) Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. 1998:317.
- (29) Penny M, Hecker KD, Bonanome A. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. 2002:71.
- (30) Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. 2005:192.
- (31) Serafin M, Peluso I, Raguzzini A. Antioxidants and the immune system. Flavonoids as anti-inflammatory agents. 2009:273.
- (32) Liu RH. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. 2004:3479.
- (33) Tsimogianni D, Oreopoulou V. Defining the Role of Flavonoid Structure on Cottonseed Oil Stabilization: Study of A- and C-Ring Substitution. 2007:129-136.

- (34) Rice-Evans CA, Miller NJ, Pagana G. STRUCTURE-ANTIOXIDANT ACTIVITY RELATIONSHIPS OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS. 1995:933.
- (35) Nijveldt RJ, Nood E, Hoor D, Boelens PG, Norren K. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. 2001:418.
- (36) Heleno S, Martins A, Queiroz M. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. 2015:501-513.
- (37) Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazo'n J. Phenolic Acids. 2013:1951.
- (38) Benguo L, Yuxiang M, Yang L, Zhen Y, Liping Z. Ultrasonic-Assisted Extraction and Antioxidant Activity of Flavonoids from *Adinandra nitida* Leaves. 2013:1045.
- (39) Manach C, Scalbert A, Morand C. Polyphenols: food sources and bioavailability. 2004:727-747.
- (40) A. Temraz, W. H. E. Tantawy. Characterization of antioxidant activity of extract from *artemisia vulgaris*. Nasr City, Cairo, Egypt: Pharmacognosy Department, Faculty of Pharmacy for Girls, Al-Azhar University; 2000.
- (41) Garcia-Lafuente A, Guillamo'n E, Villares A, Rostagno MA, Martí'nez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. 2009:537.
- (42) Tigno X, Gumila E. In vivo microvascular actions of *Artemisia vulgaris* L. in a model of ischemia-reperfusion injury in the rat intestinal mesentery. 2000:159-165.
- (43) Afsar SK, Rajesh Kumar K, Venu Gopal J, Raveesha P. Assessment of anti-inflammatory activity of *Artemisia vulgaris* leaves by cotton pellet granuloma method in Wistar albino rats. 2013:464-467.
- (44) Shaik A, Kanhere SR, Cuddapah R. Antifertility activity of *Artemisia vulgaris* leaves on female Wistar rats. 2014:180-184.
- (45) Natividad GM, Broadley KJ, Kariukib B. Actions of *Artemisia vulgaris* extracts and isolated sesquiterpene lactones against receptors mediating contraction of guinea pig ileum and trachea. 2011:808-816.
- (46) Caner A, Döşkaya M, Değirmenci A. Comparison of the effects of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia absinthium* growing in western Anatolia against trichinellosis (*Trichinella spiralis*) in rats. 2008:173-179.
- (47) Dall'Acqua S, Stocchero M, Boschiero I. New findings on the in vivo antioxidant activity of *Curcuma longa* extract by an integrated ¹H NMR and HPLC–MS metabolomic approach. 2015:125-131.
- (48) Schaich MK, Tian X, Xie J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. 2015:784-786.
- (49) Karaçelik A, Küçük M, Iskefiyeli Z. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods. 2015:108.

- (50) Esin Celik S, Özyürek M, Guclu K, Apak R. Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. 2010:1300-1309.
- (51) Lietuvos valstybinių miškų 2015 m. sanitarinės būklės apžvalga. 2016(Valstybinė miškų tarnyba. Miško sanitarinės apsaugos skyrius.):43-75.
- (52) Akula R, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. 2011:1720.
- (53) Karabegovic I, Nikolova M, Veličkovici D. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia* sp. Recovered by Different Extraction Techniques. 2011:504.
- (54) Ghimire BK, Seong ES, Kim EH. A comparative evaluation of the antioxidant activity of some medicinal plants popularly used in Nepal. 2010:1884.
- (55) Oyedemi SO, Cooposamy RM. Preliminary Studies on the Antibacterial and Antioxidative Potentials of Hydroalcoholic Extract from the Whole Parts of *Artemisia vulgaris* L. 2015:561-567.
- (56) Nikolova M, Veličkovici D. Phenological Variations in the Surface Flavonoids of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia absinthium* L. 2006:459.
- (57) Kasiulevičius V, Denapienė G. Statistikos taikymas mokslinių tyrimų analizėje. 2008(Gerontologija):176-180.
- (58) Yuhang C, Zaibiao Z, Qiaosheng G. Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Prunella vulgaris* L. related to plant parts and phenological stages. 2012:171-175.

7. PRIEDAI

1 priedas. Magistro baigiamasis darbas pristatytas „Jaunųjų mokslininkų ir tyrėjų konferencijoje“ 2016 m. gegužės 26 d. Farmacijos fakulteto sekcijoje.

