

DARBAS ATLIKTAS FARMACINIŲ TECHNOLOGIJŲ INSTITUTE

PATVIRTINIMAS APIE ATLIKTO DARBO SAVARANKIŠKUMĄ

Patvirtinu, kad įteikiamas magistro baigiamasis darbas „Karčiųjų kiečių žaliavų (*Artemisia absinthium* L.) fenolinių junginių ir antioksidantinio aktyvumo tyrimai“.

1. Yra atliktas mano paties (pačios).
2. Nebuvo naudotas kitame universitete Lietuvoje ir užsienyje.
3. Nenaudojau šaltinių, kurie nėra nurodyti darbe, ir pateikiu visą naudotos literatūros sąrašą.

Elektroniniu laišku patvirtinu, o darbas bus pasirašytas pasibaigus karantino ir ekstremaliosios situacijos dėl COVID-19 pandemijos Lietuvos Respublikoje laikotarpiui.

2020-05-05

Živilė Leonaitė

(data)

(autorius vardas, pavardė)

(parašas)

PATVIRTINIMAS APIE ATSAKOMYBĘ UŽ LIETUVIŲ KALBOS

TAISYKLINGUMĄ ATLIKTAME DARBE

Patvirtinu lietuvių kalbos taisyklumą atliktame darbe.

Elektroniniu laišku patvirtinu, o darbas bus pasirašytas pasibaigus karantino ir ekstremaliosios situacijos dėl COVID-19 pandemijos Lietuvos Respublikoje laikotarpiui.

2020-05-05

Živilė Leonaitė

(data)

(autorius vardas, pavardė)

(parašas)

MAGISTRO BAIGIAMOJO DARBO VADOVO IŠVADA DĖL DARBO GYNIMO

Elektroniniu laišku patvirtinu, o darbas bus pasirašytas pasibaigus karantino ir ekstremaliosios situacijos dėl COVID-19 pandemijos Lietuvos Respublikoje laikotarpiui.

(data)

(autorius vardas, pavardė)

(parašas)

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS APROBUOTAS KATEDROJE (KLINIKOJE, INSTITUTE)

Elektroniniu laišku patvirtinu, o darbas bus pasirašytas pasibaigus karantino ir ekstremaliosios situacijos dėl COVID-19 pandemijos Lietuvos Respublikoje laikotarpiui.

2020-05-21

Prof.dr. Valdas Jakštas

(aprobacijos data)

(katedros (klinikos, instituto) vedėjo (-os) (vadovo (-ės))

(parašas)

vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo recenzentas

Elektroniniu laišku patvirtinu, o darbas bus pasirašytas pasibaigus karantino ir ekstremaliosios situacijos dėl COVID-19 pandemijos Lietuvos Respublikoje laikotarpiui.

(vardas, pavardė)

(parašas)

Baigiamųjų darbų gynimo komisijos įvertinimas:

(data)

(gynimo komisijos sekretoriaus (-ės) vardas, pavardė)

(parašas)

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMACINIŲ TECHNOLOGIJŲ INSTITUTAS

ŽIVILĖ LEONAITĖ

**KARČIŲJŲ KIEČIŲ ŽALIAVŲ (*A.ABSINTHIUM* L.) FENOLINIŲ
JUNGINIŲ IR ANTIOKSIDANTINIO AKTYVUMO TYRIMAI**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovė
Prof., dr. Lina Raudonė

KAUNAS, 2020

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMACINIŲ TECHNOLOGIJŲ INSTITUTAS

TVIRTINU:

Farmacijos fakulteto dekanė prof. dr. Ramunė Morkūnienė

Data

**KARČIŲJŲ KIEČIŲ ŽALIAVŲ (*A.ABSINTHIUM* L.) FENOLINIŲ
JUNGINIŲ IR ANTIOKSIDANTINIO AKTYVUMO TYRIMAI**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovė

Prof., doc. Lina Raudonė

Data

Recenzentas

Data

Darbą atliko

Magistrantė

Živilė Leonaitė

Data

KAUNAS, 2020

TURINYS

SANTRAUKA	5
SUMMARY	6
SANTRUMPOS	7
ĮVADAS.....	8
DARBO TIKSLAS IR DARBO UŽDAVINIAI.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Kiečio (<i>Artemisia</i> L.) genties taksonominė įvairovė, paplitimas	11
1.2. Karčiųjų kiečių (<i>Artemisia absinthium</i> L.) augavietės, paplitimas ir morfologiniai požymiai...	12
1.3. Karčiųjų kiečių (<i>Artemisia absinthium</i> L.) augalinių žaliavų: lapų, žiedų, žolės, stiebų kaupiamos veikliosios medžiagos	13
1.4. Fenolinių junginių savybės ir ekstrakcija.....	16
1.5. Karčiųjų kiečių (<i>Artemisia absinthium</i> L.) farmakologinės savybės ir panaudojimas	17
1.6. Oksidacinis stresas ir antioksidacinis aktyvumas.....	18
1.7. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas	19
2. TYRIMO METODIKA.....	21
2.1. Tyrimo objektas.....	21
2.2. Tyrimo reagentai	22
2.3. Tyrimui naudota aparatūra	22
2.4. Tyrimų metodika	23
2.4.1. Tiriamojo ekstrakto gamyba.....	23
2.4.2. <i>A. absinthium</i> žaliavų ekstraktų bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas Folin- Ciocalteu metodu.....	23
2.4.3. ABTS metodas antiradikalinio aktyvumo nustatymui	24
2.4.4. FRAP metodas redukcinio aktyvumo nustatymui.....	26
2.4.5. <i>A. absinthium</i> žaliavų ekstraktų fenolinių junginių kiekybinės sudėties nustatymas ESC metodu.....	28
2.5. Tyrimo duomenų analizė.....	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	29

3.1. Tirpiklio koncentracijos nustatymas augalinės žaliavos ekstrakcijai.....	29
3.2. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas, Lietuvoje augančių karčiųjų kiečių (<i>A. absinthium</i> L.) ėminiuose.....	30
3.2.1. Fenolinių junginių kiekio nustatymas skirtinguose augalo organuose.....	30
3.2.2. Karčiųjų kiečių fenolinių junginių kiekio kitimas skirtingose morfologinėse augalo dalyse, surinktose iš skirtingų augaviečių	31
3.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas, Lietuvoje auginamų karčiųjų kiečių (<i>A. absinthium</i> L.) ėminiuose, FRAP ir ABTS metodais	35
3.3.1. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas skirtinguose augalo organuose.....	35
3.3.2. Karčiųjų kiečių antioksidacinio aktyvumo kitimas skirtingose morfologinėse augalo dalyse, surinktose iš skirtingų augaviečių	36
3.4. Individualių fenolinių junginių kitimas skirtinguose augalo organuose	40
3.4.1. Karčiuosiuose kiečiuose nustatytų individualių fenolinių junginių kitimas, skirtingose morfologinėse augalo dalyse, surinktose iš skirtingų augaviečių	43
3.5. Koreliacinių ryšių analizė.....	49
3.6. Tyrimų rezultatų apibendrinimas	51
4. IŠVADOS.....	52
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	54

SANTRAUKA

Ž. Leonaitės magistro baigiamasis darbas/ mokslinė vadovė prof., dr. Lina Raudonė; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Farmacijos fakulteto, Farmacinių technologijų institutas. - Kaunas.

Darbo pavadinimas: karčiųjų kiečių žaliavų (lot. *Artemisia absinthium* L.) fenolinių junginių ir antioksidantinio aktyvumo tyrimai.

Tyrimo tikslas: nustatyti Lietuvoje augančių karčiųjų kiečių (*Artemisia absinthium* L.), surinktų skirtingose augavietėse, fenolinių junginių kiekį ėminių ekstraktuose ir įvertinti jų antioksidacinį aktyvumą.

Tyrimo uždaviniai: parinkti tinkamiausią ekstrahavimo tirpiklį karčiųjų kiečių augalinei žaliavai; nustatyti bendrą fenolinių junginių kiekį karčiųjų kiečių lapuose, stiebuose, žieduose ir žolėje spektrofotometrinio Folin-Ciocalteu metodu; įvertinti karčiųjų kiečių lapų, stiebų, žiedų ir žolės antiradikalinį aktyvumą ABTS metodu ir redukcinį aktyvumą FRAP metodu; ištirti individualius fenolinius junginius, karčiųjų kiečių lapuose, stiebuose, žieduose ir žolėje, efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

Tyrimo objektas ir metodai: karčiųjų kiečių žaliavos, surinktos iš 14-likos skirtingų Lietuvos Dzūkijos etnografinio regiono vietų 2018 metais liepos ir rugpjūčio mėnesiais. Bendras fenolinių junginių kiekis augalinėje žaliavoje įvertintas spektrofotometrinio Folin-Ciocalteu metodu, antioksidantinis aktyvumas nustatytas FRAP ir ABTS metodais. Individualūs fenoliniai junginiai nustatyti efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

Tyrimo rezultatai ir išvados: didžiausias fenolinių junginių kiekis ($173,49 \pm 5,82$ mg GRE/g, $p < 0,05$) nustatytas vaistinės augalinės žaliavos ekstraktuose, ekstrahentu naudojant 70% (V/V) etanolį. Lietuvoje natūraliai augančių karčiųjų kiečių (*A. absinthium* L.) vaistinėje žaliavoje vidutiniškai yra randama $23,90 \pm 0,49$ mg GRE/g fenolinių junginių. Daugiausia fenolinių junginių nustatyta karčiųjų kiečių žieduose – $29,97 \pm 0,79$ mg GRE/g ($p < 0,05$). FRAP metodu nustatytas vidutinis redukcinis aktyvumas – $63,93 \pm 3,78$ μ mol TE/g, o ABTS metodu įvertintas antiradikalinis – $72,77 \pm 11,07$ μ mol TE/g. Stipriausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas FRAP ir ABTS metodais yra *A. absinthium* žieduose, atitinkamai – $87,23 \pm 4,87$ μ mol TE/g, $100,73 \pm 3,95$ μ mol TE/g. Visose tirtose karčiųjų kiečių etanolinėse ištraukose identifikuoti 5 fenoliniai junginiai: 3,4-dikafeoilchino, 3,5-dikafeoilchino, 4-O-kafeoilchino rūgštys, chlorogeno ir neochlorogeno rūgštys. Daugiausiai nustatyta 3,5-dikafeoilchino rūgštis, kurios kiekis augalo organuose varijuoja nuo $439,507 \pm 54,17$ μ g/g ($p < 0,05$, stiebuose) iki $6769,923 \pm 478,71$ μ g/g ($p < 0,05$, lapuose).

SUMMARY

Ž. Leonaitė final master's thesis/ research supervisor prof., dr. Lina Raudonė; Lithuanian University of Health Sciences, Academy of Medicine, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Technology. – Kaunas.

Title: research on phenolic compounds and antioxidant activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) raw material.

The aim of the research: to investigate the amount of total phenolic compounds in sample extracts of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) growing in Dzukija Ethnographic region locations in Lithuania and evaluate their antioxidant activity.

The objectives of the research: select the most suitable extraction solvent for the wormwood plant material; to determine the amount of total phenolic compounds in wormwood leaves, stems, flowers and herb by Folin-Ciocalteu spectrophotometric method; to evaluate antioxidant activity using ABTS method and reducing activity using FRAP method of wormwood leaves, stems, flowers and herb; to investigate individual phenolic compounds in wormwood leaves, stems, flowers and herb by high performance liquid chromatography.

Object and methods: wormwood raw materials collected from 14 different locations in Lithuania's Dzukija Ethnographic region locations in July and August 2018. The content of total phenolic compounds in plant extracts determined by Folin-Ciocalteu spectrophotometric method. Antioxidant activity were determined by FRAP and ABTS methods. Individual phenolic compounds were determined by high performance liquid chromatography.

Results and conclusions: the highest amounts of total phenolic compounds (173.49 ± 5.82 mg GRE / g) were determined in the extracts of wormwood with 70% ethanol as extractant. On the average, 23.90 ± 0.49 mg GRE / g phenolic compounds were determined in the wormwood (*A. absinthium* L.) in Lithuania. The highest amount of total phenolic compounds was determined in the sample of wormwood flowers – 29.97 ± 0.79 mg GRE / g ($p < 0.05$). The FRAP method determined the average of reducing activity – 63.93 ± 3.78 μ mol TE / g. The radical scavenging activity was evaluated by the ABTS method – 72.77 ± 11.07 μ mol TE / g. The strongest antioxidant activities were determined by FRAP and ABTS methods in *A. absinthium* flowers, – 87.23 ± 4.87 μ mol TE / g, 100.73 ± 3.95 μ mol TE / g, respectively. 5 phenolic acids were identified in all ethanolic extracts of wormwood: 3,4-dicaffeoylquinic, 3,5-dicaffeoylquinic, 4-O-caffeoylquinic acids, chlorogenic and neochlorogenic acids. The highest amount of 3,5-dicaffeoylquinic acid is found in different plant organs and varies from 439.507 ± 54.17 μ g / g ($p < 0.05$, in stems) to 6769.923 ± 478.71 μ g / g ($p < 0.05$, leaves).

SANTRUMPOS

ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-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 (III) redukcijos antioksidacinė galia (angl. *Ferric reducing antioxidant power*);

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

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;

IVADAS

Kartusis kietis (lot. *Artemisia absinthium* L.) – astrinių šeimos (Asteraceae) žolinis, daugiametis, aromatinis, vaistinis augalas, augantis visoje Lietuvos teritorijoje, tačiau dažnesnis pietinėje dalyje [1, 2]. Dėl plataus biologinio aktyvumo, nuo seno *A. absinthium* buvo vertinama ir naudojama liaudies medicinoje [3]. Tradicinėje liaudies medicinoje vaistinė žaliava naudojama kaip virškinimą gerinanti, apetitą skatinanti, pilvo pūtimą mažinanti, tulžies išskyrimą skatinanti priemonė [4, 5]. Pagal eterinių aliejų kiekį karčiųjų kiečių augalinės žaliavos kokybę reglamentuoja Europos farmakopėja. Augalinėje žaliavoje randamas eterinis aliejus pasižymi antihelminėmis, antiparazitinėmis ir antiseptinėmis savybėmis [3, 6, 7]. Karčiųjų kiečių eteriniame aliejuje yra randamas biciklinis monoterpenas – tujonas, kuris turi insekticidinį ir fungicidinį poveikį prieš kenkėjus [6]. Literatūros duomenys rodo, kad kartieji kiekiai kaupia ne tik eterinį aliejų, bet ir nemažai kitos cheminės prigimtės junginių. Didelę dalį sudaro fenoliniai junginiai, tokie kaip flavonoidai ir fenolinės rūgštys. Fenoliniai junginiai pasižymi priešuždegiminiu, antimikrobiniu, antibakteriniu, priešvėžiniu ir antivirusiniu poveikiu [6, 8]. Karčiųjų kiečių bioaktyvių junginių kokybinio ir kiekybinio profilio variacijos natūraliose augavietėse yra labai plačios. Fenolinių junginių vidutiniškai yra nustatoma nuo 18,14 mg GAE/g iki 194,9 mg GAE/g, priklausomai nuo geografinės padėties [9, 10]. Platus ir individualių fenolinių junginių profilis. Moksliniuose tyrimuose nustatyta: tanino rūgšties, vanilino rūgšties, ferulo rūgšties, rozmarino rūgšties, chlorogeno ir neochlorogeno rūgšties, 3,5-dikafeilchino rūgšties įvairūs kiekiai [7, 11, 12]. Atliktų *in vivo* ir *in vitro* tyrimų metu buvo ištirta, jog *A. absinthium* L. žolė pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu, su kuriuo susijęs fenolinių junginių ir flavonoidų buvimas [12, 13]. Antioksidantai yra cheminės medžiagos, kurios apsaugo nuo laisvųjų radikalų sukeltų oksidacinių pažeidimų, todėl kartieji kiekiai yra puikus natūralių antioksidantų šaltinis [13].

Kartieji kiekiai natūraliai auga ir plačiai paplitę pietinėje Lietuvos dalyje [2]. Lietuvoje daugiausia buvo atlikta karčiųjų kiečių (*A. absinthium* L.) kaupiamų eterinių aliejų cheminės sudėties ir toksiškumo tyrimai, tačiau nepavyko rasti duomenų apie Lietuvos klimato sąlygomis natūraliai augančių karčiųjų kiečių fenolinių junginių sudėtį bei jų pasiskirstymą skirtinguose augalo organuose [14, 15]. Karčiųjų kiečių fenolinių junginių tyrimų stoka Lietuvoje skatina atlikti tyrimus, kurių metu būtų palyginti fenolinių junginių kiekiai, skirtingose *Artemisia absinthium* L. žaliavų morfologinėse dalyse (lapuose, stiebuose, žieduose, žolėje) bei skirtingose augavietėse. Taip pat nėra atlikti antioksidacinio aktyvumo tyrimai su karčiųjų kiečių žaliavomis, todėl tikslinga įvertinti antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą. Gauti tyrimų rezultatai padės nustatyti individualius fenolinius junginius karčiųjų kiečių augalinėse žaliavose, įvertinti kiekių dėsningumą atsižvelgiant į skirtingas augalo dalis ir augavietes. Suteiks naujos ir aktualios informacijos vertinant žaliavų kokybę ir padės užtikrinti racionalų natūraliųjų resursų panaudojimą

Šio darbo tikslas nustatyti Lietuvoje augančių karčiųjų kiečių (*Artemisia absinthium* L.), surinktų skirtingose augavietėse, fenolinių junginių kiekį ėminių ekstraktuose ir įvertinti jų antioksidacinį aktyvumą.

DARBO TIKSLAS IR DARBO UŽDAVINIAI

Darbo tikslas – nustatyti Lietuvoje augančių karčiųjų kėčių (*Artemisia absinthium* L.), surinktų skirtingose augavietėse, fenolinių junginių kiekį ėminių ekstraktuose ir įvertinti jų antioksidacinį aktyvumą.

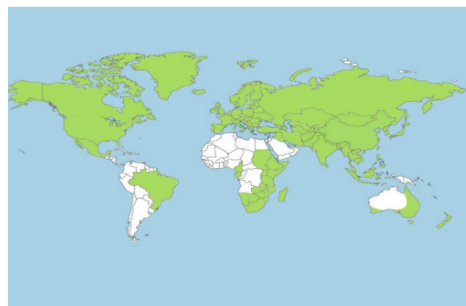
Darbo uždaviniai:

1. Parinkti tinkamiausią ekstrahavimo tirpiklį karčiųjų kėčių augalinei žaliavai.
2. Nustatyti bendrą fenolinių junginių kiekį karčiųjų kėčių lapuose, stiebuose, žieduose ir žolėje spektrofotometrinio Folin-Ciocalteu metodu.
3. Įvertinti karčiųjų kėčių lapų, stiebų, žiedų ir žolės antiradikalinį aktyvumą ABTS spektrofotometrinio metodu.
4. Įvertinti karčiųjų kėčių lapų, stiebų, žiedų ir žolės redukcinį aktyvumą FRAP spektrofotometrinio metodu.
5. Nustatyti individualius fenolinius junginius, karčiųjų kėčių lapuose, stiebuose, žieduose ir žolėje, efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kiečio (*Artemisia* L.) genties taksonominė įvairovė, paplitimas

Kiečio gentis yra viena didžiausių astrinių šeimos genčių [1]. *Artemisia* gentis pavadinta Artemidės, Graikijos skaistybės ir gimdymo deivės vardu. *Artemisia* gentis pasižymi dideliu geografinio pasiskirstymo spektru ir buveinių įvairove, todėl yra kilusi ir paplitusi Europoje, įskaitant ir visoje Lietuvos teritorijoje, tačiau dažnesnė pietinėje dalyje [1, 4]. Kiečio genties augalų galima rasti Laplandijoje, šiaurės ir pietų Amerikoje, Naujojoje Zelandijoje [4]. Kiečio genties paplitimas pasaulyje pavaizduotas 1 paveikslėlyje [16].



1 pav. *Artemisia* genties paplitimas [16]

Gentis pasižymi didžiuliu ekologiniu plastiškumu: rūšys yra išsidėsčiusios nuo jūros lygio platumų iki aukštų kalnų bei nuo sausringų zonų iki pelkių [6]. *Artemisia* gentyje yra apie 500 rūšių iš jų 11 rūšių auga Lietuvoje. Populiariausios ir labiausiai paplitusios yra: diamedis (*A. abrotanum*), kartusis kietis arba pelynas (*A. absinthium*), dirvoninis (*A. campestris*), vaistinis kietis arba peletrūnas (*A. dracunculus*) ir paprastasis kietis (*A. vulgaris*) [6, 17]. Karčiųjų kiečių taksonominė hierarchija pavaizduota 1-oje lentelėje.

1 lentelė Taksonominė hierarchija

Karalystė	Augalai - Plantae
Skyrius	Induočiai - Tracheophyta
Klasė	Magnolijainiai - Magnoliopsida
Poklasis	Asteražiedžiai - Asteranae
Eilė	Astriečiai - Asterales
Šeima	Astrinių - Asteraceae
Gentis	Kietis - <i>Artemisia</i> L.
Rūšis	Kartusis kietis - <i>Artemisia absinthium</i> L. [6].

Kiečio rūšys auginamos dėl jų sidabriškai žalios lapijos ir dėl aromatinių, kulinarinių ir vaistinių savybių. Pastaraisiais metais mokslininkai ir farmacijos pramonė daug dėmesio skyrė šios genties fitocheminiams ir biologinio poveikio tyrimams, kurių metu buvo rasta naujų cheminių junginių ir tikrinamas jų terapinis potencialas bei šalutinis poveikis. Šių bioaktyviųjų junginių veiksmingumo bandymai padės sukurti naujus augalinius vaistus, skirtus pagerinti žmonių sveikatą. Todėl daroma prielaida, kad kiečio gentis galėtų būti perspektyvus vystymosi šaltinis mirtinų ligų, tokių kaip AIDS, vėžys, širdies ir kraujagyslių bei inkstų ligų gydymo strategijoms kurti [16].

1.2. Karčiųjų kiečių (*Artemisia absinthium* L.) augavietės, paplitimas ir morfologiniai požymiai

Kartusis kietis (2 pav.) (lot. *Artemisia absinthium* L.) – astrinių (Asteraceae Bercht. & J.Presl) šeimos žolinis, daugiametis, vaistinis aromatinis augalas [1]. Jis minimas beveik visose Rytų ir Vakarų pasaulio vaistažolių knygose bei yra aprašytas visų Europos šalių farmakopėjose [6, 18].



2 pav. *Kartusis kietis* (lot. *Artemisia absinthium* L.) [19]

Kartieji kiečiai natūraliai auga laukų ar uolų slaituose, žemumose ar įkalnėse, sausame smėlyje ar dirvožemyje, dykvietėse, pakelėse, pėsčiųjų takų bei laukų pakraščiuose [11, 20]. Labiausiai tose vietose, kuriose yra daugiausiai šviesos [11, 21]. Augalas labiausiai paplitęs Europoje, Šiaurės Afrikoje, Kanadoje bei šiaurės Amerikoje [22]. Vaistinė augalinė žaliava – natūraliai augančių žolinių augalų, karčiųjų kiečių, žydėjimo metu surinkta ir išdžiovinta žolė. Renkama masinio žydėjimo metu – nuo liepos iki rugsėjo ar spalio mėnesio [4, 20]. Kartieji kiečiai auga nuo 40 iki 150 cm aukščio [4]. Tai sidabriškai žalios spalvos žolinis augalas. Šaknys daugiametės, iš kurių iškyla šakoti, tvirti, lapiniai stiebai. Stiebai vos briaunuoti, lapuoti, prie pamato sumedėję. Stiebo lapai pražanginiai, 2-3 kartus plunksniškai suskaidyti su balkšvais šilkiniais plaukeliais, pilkai sidabriški. Stiebai ir lapai apaugę

baltais plaukeliais. Viršutinė lapo pusė - pilkšvai žalsva, o apatinė – pilkai sidabriška. Lapo ilgis iki 10 cm. Ant viršutinių stiebo šakelių išsidėstę smulkūs 2,5-4 mm geltonos spalvos graižai. Graižai nusvirę, prisigėję prie 1 ar 2 dengiamųjų lapelių. Graižą sudaro išoriniai, smulkūs vamzdiški piesteliniai žiedai, vidiniai piltuviški – dvilyčiai žiedai. Žiedynai maždaug 3 mm skersmens, nulinkę, rutuliški graižai, sukrauti ant trumpų šakučių į vienašales kekes, kurios sudaro šluotelę. Visi žiedai vamzdiški, geltoni, smulkūs, taurelės nėra. Vainikėliai šviesiai geltonos spalvos [1, 6, 23].

1.3. Karčiųjų kiečių (*Artemisia absinthium* L.) augalinių žaliavų: lapų, žiedų, žolės, stiebų kaupiamos veikliosios medžiagos

Mokslininkų atlikti karčiųjų kiečių fitocheminiai tyrimai rodo, kad augalinėje žaliavoje gausu biologiškai aktyvių junginių [6]. Daugiausiai nustatyta fenolinių junginių, tokių kaip – flavonoidai, fenolinės rūgštys, kofeilchino rūgštys, taninai, kumarinai. Taip pat aptinkama riebalų rūgščių, angliavandenių, baltymų, sterolių, acetilenų ir eterinių aliejų [6, 8].

Fenoliniai junginiai – natūralios fitocheminės medžiagos, randamos daugelyje žolinių augalų. Šie junginiai turi didelę fiziologinę reikšmę augaluose [24]. Labiausiai karčiuosiuose kiečiuose paplitę, natūralūs biologiškai aktyvūs junginiai, tokie kaip fenoliai ir flavonoidai yra svarbūs augalų antriniai metabolitai, pasižymintys savybėmis, kurios turi įtakos augalinio maisto išvaizdai, kvapui, skoniui bei kokybei [8, 24]. Atliktuose tyrimuose nustatyta, kad didžiausias kiekis fenolinių junginių yra randamas karčiųjų kiečių lapuose [25].

Fenolinės rūgštys. Rūgštys gali būti suskirstytos į dvi grupes pagal savo struktūrą: hidroksibenzenkarboksi ir hidroksicinamono rūgštys [26]. Dominuojančios hidroksicinamono rūgštys *A.absinthium* žaliavoje yra chlorogeno rūgštis, kavos rūgštis, ferulo rūgštis, sinapo rūgštis ir p-kumaro rūgštis. Hidroksibenzenkarboksi – vanilino rūgštis, salicilo rūgštis, p-hidroksifenolio rūgštis. Šios fenolinės rūgštys lemia karčiųjų kiečių priešuždegiminį terapinį poveikį [6].

Flavonoidai. Jie priklauso natūralių medžiagų grupei su skirtingomis fenolinėmis struktūromis. Plačiai paplitę augaluose ir yra pagrindinė biologiškai ir chemiškai įvairi antrinių metabolitų grupė [27]. Jų gausu įvairiuose vaisiuose, daržovėse, grūduose, žievėje, arbatoje, vyne. Taip pat didžiausi kiekiai aptinkami vaistinių augalų šaknyse, stiebuose bei žieduose [28]. Vyraujantys flavonoidų junginiai karčiuosiuose kiečiuose dažniausiai yra rutinas, kvercetas ir kiti flavonoidiniai glikozidai, įskaitant kvercetin-3-O-d-gliukozidą, izokercitriną, kvercetin-3-O-ramnogliukozidą, izorhamnetin-3-gliukozidą, izorhamnetin-3-O-ramnogliukozidą [6].

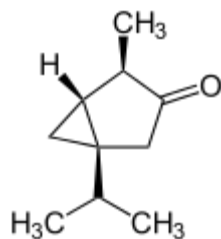
Riebalų rūgštys. Pagrindinės riebalų rūgštys aptinkamos karčiųjų kiečių žolėje yra linolo (44,8 proc.) ir oleino (30 proc.) rūgštys. Taip pat gausu palmitino rūgšties, arachidono rūgšties, laurino, stearino rūgščių [29].

Amino rūgštys. Kazachstane atliktame tyrime, karčiųjų kiečių žaliavoje buvo nustatyta dvidešimt amino rūgščių, iš kurių daugiausia - glutamato, aspartato ir alanino [29].

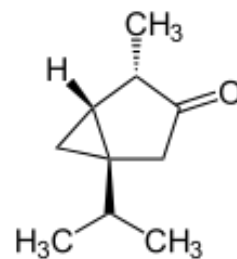
Makro- ir mikroelementų sudėtis. Mikroelementai ir makroelementai yra būtini gyviesiems organams. Norint užtikrinti normalią gyvenimo veiklą *A. absinthium* pelenuose buvo nustatyti aštuoni makro- ir mikroelementai – kalis, magnis, kalcis, geležis, cinkas, varis, natriis ir manganas [29].

Eteriniai aliejai. Viena iš svarbiausių karčiųjų kiečių kaupiamųjų veikliųjų medžiagų yra eterinis aliejus, kuris išgaunamas iš augalinių liaukų – trichomų. Karčiųjų kiečių eterinio aliejaus cheminė sudėtis lemia augalo chemotaksonomiją [30]. Eterinio aliejaus kiekis augalo žaliavoje priklauso nuo karčiųjų kiečių geografinės kilmės. Europos regionuose didžiausias kiekis eterinio aliejaus buvo nustatytas Tunise – 1,10 – 1,46 proc., o Graikijoje išeiga gauta 0,31 proc. [4]. Kartieji kiekiai auginami skirtinguose regionuose, turi skirtingą eterinių aliejų sudėtį. Lietuvoje auginamų karčiųjų kiečių eteriniuose aliejuose gausu tujonų ir trans-sabinil acetato [2]. Tadžikistane pagrindiniai aliejaus komponentai – mircenas ir cis-chrizanteno acetatas [31]. Tunise ištirto eterinio aliejaus kiekis karčiųjų kiečių žaliavose buvo didesnis žieduose (2,98 proc.) nei lapuose (1,87 proc.) [25].

Tačiau karčiųjų kiečių augalinėje žaliavoje nustatomas ne tik skirtingas eterinio aliejaus kiekis, bet ir skirtinga jų spalva. Atliekant džiovintos žaliavos hidrodistiliaciją gaunamas tamsiai mėlynos spalvos eterinis aliejus. O aliejus, išskirtas iš džiovintų lapų ir žydinčių žiedų, gaunamas nuo tamsiai žalios iki rudos ar rusvai žalios spalvos. Aliejaus spalva priklauso nuo karčiųjų kiečių cheminės sudėties – azuleno darinių [4]. Karčiųjų kiečių eteriniame aliejuje yra randamas biciklinis monoterpenas – tujonas, kuris yra vienas iš pagrindinių komponentų, nulemiančių eterinio aliejaus biologines toksines savybes [3, 7]. Karčiųjų kiečių žaliavoje yra abi izomerinės formos: α -tujonas (3 pav.) ir β -tujonas (4 pav.) [32]. Tačiau pastarojo koncentracija yra didesnė, nei α -tujono [4].

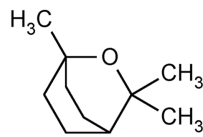


3 pav. α -tujonas

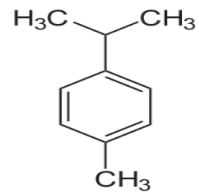


4 pav. β -tujonas

Be biciklinių monoterpenų yra randama ir monocikliniai monoterpenai – 1,8 cineolis (5 pav.) ir p-cimenas (6 pav.) [16].

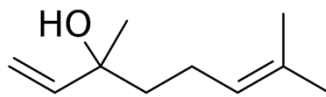


5 pav. 1,8 cineolis



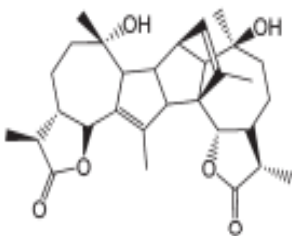
6 pav. p-cimenas

Iš aciklinių monoterpenų daugiausiai nustatyta – linalolio (7 pav.) [16].

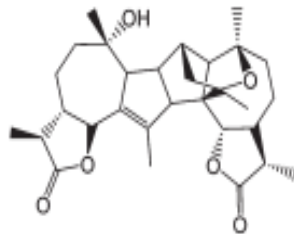


7 pav. Linalolis

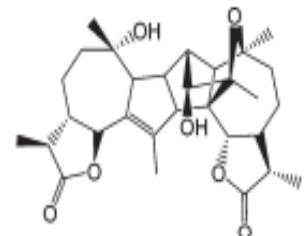
Dėl didelės lakiųjų terpenų koncentracijos esančios lapuose ir žieduose eterinis aliejus turi stiprų aromatinių kvapą [30]. Žolės kartus skonis ir aštrus kvapas priklauso nuo terpenoidų ir sekviterpeninių laktonų, esančių augalo ekstraktuose. Pagrindinės cheminės medžiagos, kurios sukelia kartų skonį, yra – absintinas (8 pav.), anabsintinas (9 pav.), anabsinas (10 pav.) [33]



8 pav. Absintinas [33]



9 pav. Anabsintinas [33]



10 pav. Anabsinas [33]

Aukštos kokybės karčiuosiuose kiečiuose turėtų būti ne mažiau kaip 0,2% triterpeninio laktono (absintino) [18].

Aliejų antioksidacinis aktyvumas taip pat priklauso nuo žaliavos kokybinių charakteristikų, kurias lemia tokie veiksniai kaip koncentracija, temperatūra, šviesa, substrato rūšis ir fizinė sistemos būseną [31]. Karčiųjų kiečių eterinio aliejaus išskyrimui dažniausiai yra naudojami šie metodai: hidrodistiliacija (HD), mikrobangų ekstrahavimas be tirpiklių (SFME), dujų chromatografija (GC), dujų chromatografija-masių spektrometrija (GC / MS) [6, 33].

Grynas karčiųjų kiečių aliejus yra labai nuodingas, tačiau tinkamas jo vartojimas nekelia jokio pavojaus [29]. Amerikos augalinių produktų asociacija (AHPA) nurodo, kad karčiųjų kiečių žolės negalima vartoti labai ilgą laiką, taip pat yra kontraindikuotina nėštumo ar žindymo metu [34]. Tačiau

dėl biologiškai aktyvių medžiagų – tujonų, vartojant šį augalą yra tikimybė jo perdozuoti, nes per didelė karčiųjų kiečių dozė gali sukelti vėmimą, traukulius, atminties netekimą, silpnaprotyškumą, haliucinacijas, aklumą ar kitus CNS pakitimus [4, 35]. Būtent veiklioji medžiaga – tujonas sukelia haliucinogeninį poveikį. Šalutinis poveikis gali pasireikšti neritmingu kvėpavimu, putojimu burnoje ir inkstų nepakankamumu. Yra teigiama, kad šis poveikis pastebimas tik panaudojus karčiųjų kiečių aliejų [6].

1.4. Fenolinių junginių savybės ir ekstrakcija

Fenoliniai junginiai dėl antioksidacinio aktyvumo pasižymi antikarcinogeninėmis, antimikrobinėmis, antivirusinėmis, antimutageninėmis savybėmis. Labai svarbi fenolinių junginių savybė – jų gebėjimas oksiduotis, veikiant fermentams (polifenoloksidazei, peroksidazei). Veikiant oro deguoniui, šarminėje aplinkoje, esant intensyviai apšvietimui, oksidacija greitėja. Gebėjimas oksiduotis priklauso nuo OH grupių skaičiaus ir jų išsidėstymo. Didėjant OH grupių skaičiui, oksidacija gerėja, tačiau orto padėties OH grupės oksiduojasi greičiau nei p-padėties [36]. Dėl fenoliniams junginiams būdingų skirtingų poliškumo, rūgštingumo savybių, hidroksilinių grupių ir aromatinių žiedų skaičiaus turi būti parenkami skirtingi optimizuoti specifiniai ekstrakcijos metodai [12]. Įprasti ekstrakcijos procesai, tokie kaip šildymas, virimas gali būti naudojami fenoliniams junginiams išgauti. Tačiau naudojant įprastinius ekstrakcijos metodus atsiranda trūkumų, tokių kaip: fenolinių junginių praradimas dėl oksidacijos, hidrolizės, jonizacijos ir ilgas ekstrahavimo laikas [12]. Ekstrakcijos trukmės optimizavimui ekstrakcijos procesas skatinamas mikrobangomis, ultragarsu ar purtyklėje. Jie yra nebrangūs, paprasti ir efektyvūs palyginus su tradiciniais ekstrakcijos metodais.

Ekstrahavimas organiniais ar neorganiniais tirpikliais yra pagrindinis metodas, naudojamas fenoliniams junginiams ekstrahuoti [37]. Pagrindiniai parametrai, turintys įtakos fenolinių junginių kiekiui, yra ekstrahavimo laikas, temperatūra, ekstrakcijų pakartojimų kiekis bei tirpiklio tipas. Būtent ekstrahentų, tokių kaip vanduo, acetonas, etilo acetatas, alkoholiai (metanolis, etanolis ir propanolis) ir jų mišinių pasirinkimas turės didžiausią įtaką ekstrahuotų fenolių išeigai [38]. Ghafoori, H. atliktame tyrime buvo parinkta tinkamiausia metanolio koncentracija *A. absinthium* ekstrakcijai atlikti. Didžiausia fenolinių junginių išeiga gauta naudojant 75% metanolį, mažiausia – išgrynintą vandenį [37]. Craciunescu O. karčiųjų kiečių ekstrakcijai pasirinko 70% etanolinį tirpiklį [11]. Singh R. palygino vandeninius, 95% etanolinius ir chloroforminius karčiųjų kiečių ekstraktus, iš kurių etanoliniai ekstraktai pasižymėjo gausiausiu kiekiu fenolinių junginių, o chloroforminiai ekstraktai – mažiausiu [8].

Tikslinga parinkti optimalias sąlygas ekstrakcijai atlikti, nes fenolinių junginių ekstrakcijos procesas yra svarbus žingsnis norint išgauti biologiškai aktyvias medžiagas iš augalinės žaliavos prieš atliekant analizę [12, 38].

1.5. Karčiųjų kiečių (*Artemisia absinthium* L.) farmakologinės savybės ir panaudojimas

Augalų biologinis aktyvumas dažnai susijęs su antioksidaciniu aktyvumu. Aromatiniai ir vaistiniai augalai yra natūralių antioksidantų šaltinis [7]. Kinijos tyrinėtoja Tu Youyou 2015 metais laimėjo Nobelio premiją už vaistą, kurį ji sukūrė maliarijai gydyti panaudodama karčiųjų kiečių žolę [29]. Todėl išaugo didelis susidomėjimas šią augalinę žaliavą pritaikyti medicinos ir farmacijos pramonėje, vaistinių preparatų bei maisto papildų gamyboje. Ši rūšis gali būti tinkama priemonė tolesniems tyrimams, kuriant naujus antioksidantus bei juos panaudojant farmacijos pramonėje [25].

Maisto ir gėrimų pramonėje. Šveicarijoje, XIX a. pradžioje, karčiųjų kiečių žolė buvo pradėta naudoti maisto pramonėje spiritinio gėrimo – absento gamyboje. Jis tapo vienu populiariausiu spiritiniu gėrimu Europoje ir buvo vadinamas „Žaliąja fėja“, veikiančia centrinę nervų sistemą [4]. Dėl savo karčiųjų ir aromatinių savybių, šiais laikais šio augalo ekstraktai yra plačiai naudojami kaip kvapiosios medžiagos maisto pramonėje, gaminant alkoholinius gėrimus, tokius kaip vynas, vermutas bei kitus karčiųuosius spiritinius gėrimus. Taip pat yra pritaikomas gaminant gaiviuosius gėrimus ir kai kuriuos maisto produktus, ypač konditerijos gaminiuose ir desertuose [31].

Žemės ūkyje. Kartieji kiečiai atpažįstami dėl būdingo specifinio aštraus kvapo, todėl jų galima naudoti purškiant biologinius kenkėjus. Eteriniuose aliejuose randamas tujonas turi insekticidinį ir fungicidinį poveikį [6]. Todėl ekologinėje žemdirbystėje karčiųjų kiečių vandeninė suspensija naudojama kovai su skruzdėlėmis, vikšrais, Kolorado vabalais ir amarais [30]. Taip pat gali būti panaudojama trąšų pramonėje siekiant užkirsti kelią piktžolių augimui, nes karčiųjų kiečių šaknys išskiria medžiagas, kurios slopina aplinkinių augalų augimą [39, 40].

Medicinoje. Karčiųjų kiečių augalinė žaliava nuo seno naudojama tradicinėje liaudies medicinoje. Jau egiptiečiai *A. absinthium* vartojo kaip antiseptiką, tonizuojantį vaistą, priemonę nuo karščiavimo ir menstruacijų skausmo. Viduramžiais augalas buvo naudojamas kaspinočiams naikinti. Paracelsas skatino naudoti profilaktikai nuo jūros ligos [41]. Liaudies medicinoje karčiųjų kiečių žaliava buvo žinoma kaip apetitą didinanti, virškinimą gerinanti, pilvo pūtimą slopinanti, tulžies išskyrimą skatinanti priemonė [4, 41]. Ekstraktai buvo naudojami kaip raumenų atpalaidavimo priemonė, turėjo švelnų raminamąjį poveikį ir buvo taikomi nerimui, psichologiniam išsekimui ir depresijai gydyti [4, 25]. Vienas iš populiariausių karčiųjų kiečių žolės panaudojimų yra arbatos užpilas. Rekomenduojama

2 g džiovintos žolės užpilti 150 ml verdančio vandens ir palaikyti 5 minutes. Tuo remiantis per dieną būtų galima išgerti 22 puodelius arbatos neviršijant nustatytos toksinės ribos [32]. Remiantis literatūros duomenimis arbatos užpilas skiriamas vartoti esant apetito praradimui, dispepsiniams negalavimams, tokiems kaip nedideli virškinimo trakto spazmai, vidurių pūtimas ir tulžies takų funkciniais sutrikimams gydyti [41].

Kai kurios karčiųjų kiečių augalo dalys yra naudojamos ruošiant skystus preparatus odos žaizdų gydymui, nudegimams, sumušimams, burnai skalauti ar opoms gydyti [11, 42]. Europos medicinos agentūra ir augalinių vaistų komitetas rekomenduoja karčiųjų kiečių žolę naudoti apetito skatinimui, esant lėtiniam gastritui, sergant kepenų ligoms, gelta ir diabetu [41]. Maisto papildai, į kurių sudėtį įeina karčiųjų kiečių augalinė žaliava, stiprina imunitetą, sumažina oksidacinius pažeidimus ląstelių membranos lipidams bei baltymams [8]. Karčiųjų kiečių žaliavoje esantys fenolio ir flavonoidų junginiai yra natūralūs antioksidantai, turintys antimutageninių, kardioprotekcinų savybių [31]. Nustatyta, kad kartieji kiečiai be antimaliarinio aktyvumo, turi ir priešvėžinį poveikį. Pasaulyje vyksta daug įvairių tyrimų su šiuo vaistiniu augalu, siekiant ištirti jo priešvėžinį poveikį. Robertas Jay R. Rowenas 2002 m. moksliniame straipsnyje teigė, kad kiečių žolė „gali būti saugi, netoksiška ir nebrangi komplementari priemonė krūties vėžiui ir leukemijai sergantiems pacientams“ [6]. Tradiciniai kinų medicinos specialistai karčiųjų kiečių augalus naudoja gydant ūminę dizenteriją, vėžį ir neurodegeneracines ligas [43, 44]. Italijoje ir Tunise kartieji kiečiai dažnai naudojami maliarijos karščiavimui mažinti t. y. pasižymi anipiretinio poveikiu [35]. Irane tradiciškai šį augalą naudoja leukemijai ar sklerozei gydyti [9, 37]. Turkijos liaudies medicinoje vaistinė augalinė žaliava naudojama kaip diuretikas, antihelmininė priemonė ar skrandžio skausmui slopinti [45]. Etnofarmakologinė literatūra dokumentuoja žolės panaudojimą Pakistane kaip kepenų uždegimą mažinančią, atmintį gerinančią ir padedančią atstatyti blogėjančią psichinę būseną priemonę [25].

Eterinių aliejų panaudojimas. Augaliniai eteriniai aliejai turi platų biologinio aktyvumo spektrą, nes cheminiai ingredientai gali veikti įvairiais būdais [6]. Iš karčiųjų kiečių žaliavos išskiriamas eterinis aliejus pasižymi priešuždegiminėmis, antimikrobinėmis, antihelmininėmis, antiseptinėmis, antiparazitinėmis savybėmis [3, 4, 30]. Augalų aliejus gali būti naudojamas kaip širdies stimulatorius, siekiant pagerinti kraujotaką [6].

1.6. Oksidacinis stresas ir antioksidacinis aktyvumas

Laisvieji deguonies radikalai (ROS) lengvai sukelia oksidacinius pažeidimus įvairioms biomolekulėms, įskaitant baltymus, lipidus, lipoproteinus ir DNR. Pažeidimai dažniausiai atsiranda dėl išorinių veiksnių poveikio veikiamos žmogaus odos. Veiksniai, kurie turi daugiausiai įtakos audinių

pažeidimams, yra spinduliuotė, rūkymas, teršalai, pesticidai [11]. Baltymų, DNR molekulių ir lipidų oksidaciniai pažeidimai yra susiję su lėtinėmis degeneracinėmis ligomis, įskaitant kataraktą, vėžį, reumatoidinį artritą ir koronarinę širdies ligą [46, 47]. Oksidacinis stresas apibūdinamas kaip reaktyviųjų deguonies rūšių ir natūralių antioksidantų pusiausvyros sutrikimas biologinėse sistemose, dėl kurio pažeidžiamos makromolekulės [6]. Ši būseną, kuomet makromolekulės patiria oksidacinius pažeidimus, vadinama oksidaciniu stresu. Būtent jis yra susijęs su laisvųjų radikalų, tokių kaip superoksidas, hidroksilas, hidroperoksilas, poveikiu audiniuose [13].

Antioksidantai yra cheminės medžiagos, kurios apsaugo nuo laisvųjų radikalų sukeltų oksidacinių pažeidimų [13]. Visi aerobiniai organizmai, įskaitant žmones, turi antioksidantų apsaugą, apsaugančią organizmą nuo oksidacinių pažeidimų, atsiradusių dėl oksidacinio streso bei kitos žalos molekulėms ir ląstelėms [46, 48]. Yra žinoma keletas sintetinių antioksidantų junginių, tokių kaip butilintas hidroksitoluenas (BHT) ir butilintas hidroksianizolis (BHA), kurie paprastai naudojami perdirbtuose maisto produktuose, tačiau jie sukelia daug nepageidaujamų reakcijų [48]. Fenoliniai junginiai taip pat veikia kaip antioksidantai chelatuojant metalo jonus ir taip neleidžiant susidaryti laisviesiems radikalams bei papildyti endogeninę sistemą [13]. Manoma, kad tokios fenolinės medžiagos kaip flavonoliai, cinamono rūgštys, kumarinai ir kavos rūgšties dariniai turi antioksidacinių savybių, kurios gali atlikti svarbų vaidmenį saugant ląsteles ir organus nuo oksidacinės degeneracijos [6]. Epidemiologiniais tyrimais paremtos rekomendacijos teigia, kad vaisiai, daržovės ir mažiau perdirbti maisto produktai užtikrina geriausią apsaugą nuo ligų, kurias sukelia oksidacinis stresas. Nustatyta, kad vaisių sultyse, šaltuose ir karštuose gėrimuose yra didelis kiekis antioksidantų, tokių kaip polifenoliai, vitaminas C, vitaminas E [49].

Karčiųjų kiečių ekstraktai pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu [12]. Ypač dideliu antioksidaciniu potencialu pasižymi jų lapai [16]. *In vivo* ir *in vitro* tyrimų metu buvo nustatyta, jog *A. absinthium* L. žolėje randami fenoliniai junginiai ir flavonoidai susiję su antioksidaciniu aktyvumu [13]. Oksidacinis stresas turi įtakos ligų ir medžiagų apykaitos sutrikimų etiologijoje, todėl antioksidantai turi teigiamą poveikį palaikant sveikatą ar ligų prevenciją [39].

1.7. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas

Antioksidacinio aktyvumo nustatymui gali būti pritaikyti įvairūs analitiniai metodai, kurie yra skirstomi į tris kategorijas: spektrofotometrinius, elektrocheminius metodus, chromatografinius. Dažniausiai antioksidaciniam aktyvumui nustatyti vaistinėje augalinėje žaliavoje, moksliniuose tyrimuose yra naudojami spektrofotetriniai metodai: FRAP, ABTS, DPPH, CUPRAC ir kiti [49].

DPPH ((2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-hidratas)) kolorimetriniu metodu nustatomas antioksidacinis aktyvumas. Kai DPPH reaguoja su vandenilio donoru, vyksta elektronų mainai, kurių metu gaunamas violetinis tirpalas. Reakcija vyksta matuojant absorbcijos pokyčius esant 520 nm bangos ilgiui [49].

Redukcinio aktyvumo nustatymui naudojamas FRAP spektrofotometrinis metodas. Šis metodas yra pagrįstas geležies gebėjimu redukuotis iš trivalenčio geležies jono (Fe^{3+}) į divalentį geležies (Fe^{2+}) joną ir sudaryti mėlynos spalvos kompleksą. Ši reakcija yra stebima matuojant absorbcijos pokyčius esant 593 nm bangos ilgiui [39].

Antiradikalinį aktyvumą galima įvertinti ABTS spektrofotometrinio metodu, kuriuo yra nustatomas laisvųjų radikalų surišimas [37]. ABTS metodas yra kolorimetrinis tyrimas, kurio metu ABTS radikalas patiria spalvos sumažėjimą, kai yra antioksidantų [39]. Metodo metu įvertinamas pradinių junginių ir reakcijos produktų antiradikalinis aktyvumas [37]. Vienas iš pagrindinių parametru antioksidacinių junginių įvertinimui yra tirpiklio poveikis. Skirtingų poliarizacijų tirpiklių pasirinkimas gali turėti poveikį antioksidacinėms reakcijoms [47].

CUPRAC metodu įvertinant antioksidacinį aktyvumą ekstraktai sumaišomi su CuSO_4 ir neokuproinu. Po 30 minučių absorbcija išmatuojama esant 450 nm bangos ilgiui. Tyrime Cu (II) redukuojamas į Cu (I) veikiant elektronus skleidžiantiems antioksidantams [49].

Antioksidantų aktyvumui įvertinti turi būti naudojamas ne vienas, bet keli skirtingi analitiniai *in vitro* metodai, kurie padėtų tiksliau ir kokybiškiau įvertinti antioksidantų kiekį vaistinėje augalinėje žaliavoje [50]. Įvairūs *in vitro* metodai, naudojami antioksidantiniam aktyvumui įvertinti, funkcionuoja skirtingais veikimo mechanizmais. Todėl nustatant keliais metodais galima įvertinti bioaktyvių junginių skirtingus antioksidacinio poveikio mechanizmus [51].

2. TYRIMO METODIKA

2.1. Tyrimo objektas

Karčiųjų kiečių (lot. *Artemisia absinthium* L.) žaliavos, surinktos iš 14-ikos skirtingų Lietuvos Dzūkijos etnografinio regiono vietų 2018 metais rugpjūčio mėnesį (1 lentelė). Augalinė žaliava buvo renkama masinio žydėjimo metu, įvairiose augavietėse: pievose, miške, pakelėse, pievoje prie upės, toliau nuo gyvenamųjų ir pramoninių objektų. Skirtingose vietovėse surinkti augalinių žaliavų mėginiai buvo suskirstyti į lapus, žiedus, stiebus, žolę. Skirtingos augalo žaliavos, džiovintos kambario temperatūroje, gerai vėdinamoje patalpoje, apsaugotoje nuo tiesioginių saulės spindulių ir drėgmės. Išdžiovinti lapai, stiebai, žiedai ir žolė laikyti popieriniuose maišeliuose, identiškėmis sąlygomis kaip ir džiovinta.

2 lentelė. Karčiųjų kiečių žaliavos rinkimo vieta, vietovių koordinatės

Karčiųjų kiečių žaliavų rinkimo vieta	Koordinatės		Augimo vieta
	Šiaurės plotuma	Rytų ilguma	
Varėnos rajonas, Milioniškės kaimas 2018m.	54°11'	24°22'	Pakelė
Varėnos rajonas, Salovartės kaimas 2018m.	54°14'	24°29'	Pieva prie pakelės
Varėnos rajonas, Dubininko kaimas 2018m.	54°05'	24°16'	Miškas
Varėnos rajonas, Puvočių kaimas 2018m.	54°06'	24°18'	Miškas
Varėnos rajonas, Senosios Varėnos kaimas 2018m.	54°14'	24°32'	Pieva prie upės
Varėnos rajonas, Varėnos miestas 2018m.	54°13'	24°34'	Smėlinga pieva
Varėnos rajonas, Mančiagirės kaimas 2018m.	54°07'	24°27'	Smėlėtas miškas prie pakelės
Varėnos rajonas, Žiūrų kaimas 2018m.	54°08'	24°24'	Pieva prie pakelės
Varėnos rajonas, Trasininkų kaimas 2018m.	54°06'	24°16'	Smėlinga pieva
Varėnos rajonas, Kasčiūnų kaimas 2018m.	54°06'	24°16'	Smėlinga pieva

Varėnos rajonas, Kašėtos kaimas 2018m.	54°06'	24°20'	Pieva
Varėnos rajonas, Gudelių kaimas 2018m.	54°05'	24°09'	Pakelė
Varėnos rajonas, Merkinė kaimas 2018m.	54°09'	24°11'	Pakelė
Varėnos rajonas, Perlojos kaimas 2018m.	54°12'	24°25'	Pieva prie upės

2.2. Tyrimo reagentai

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

2.3. Tyrimui naudota aparatūra

Vaistinė augalinė žaliava susmulkinta elektroniniu malūnėliu (Binatone, Jungtinė Karalystė). Žaliavos svertos elektroninėmis svarstyklėmis „Sartorius AG“ (Göttingen, Vokietija). Pagaminti ekstraktai buvo purtomi automatinėje purtyklėje „IKA®KS“ 130 Basic, (IKA-WERKE, Vokietija). Centrifūgavimas atliktas naudojant „SIGMA3-18KS“. Spektrofotometriniams tyrimams (bendro fenolinių junginių kiekio, redukcinio aktyvumo FRAP metodu, antioksidacinio aktyvumo ABTS metodu nustatymams) naudotas spektrofotometras „Spectronic CamSpec“ (Garfortas, Jungtinė Karalystė). Kokybinė ir kiekybinė fenolinių junginių analizė atlikta panaudojant chromatografą „Water e2695 Alliance“ (Waters, Milfordas, JAV) su fotodiodų matricos detektoriumi Waters 2998 (Waters, Milfordas, JAV).

2.4. Tyrimų metodika

2.4.1. Tiriamojo ekstrakto gamyba

Vaistinės augalinės žaliavos (*A. absinthium* L.) dalys: lapai, stiebai, žiedai, žolė susmulkinami elektroniniu malūnėliu. Ruošiamas tiriamasis ekstraktas: atsveriamas 0,25g susmulkintos maltos žaliavos, suberiama į tamsaus stiklo 30 ml buteliuką, užpilama 25 ml 70% (V/V) etanoliniu tirpalu (1:100). Paruošti ekstraktai sudedami į automatinę purtyklę ir ekstrahuojami purtant 15 min. Gauti ekstraktai filtruojami pro sudrėkintą distiliuoto vandens popierinį filtrą į tamsaus stiklo buteliukus ir sandariai uždaromi, ženklinami. Buteliukai laikomi tamsioje vietoje, apsaugotoje nuo tiesioginių saulės spindulių.

2.4.2. *A. absinthium* žaliavų ekstraktų bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas Folin-Ciocalteu metodu

Nustatant bendrą fenolinių junginių kiekį galo rūgšties ekvivalentais etanoliniuose karčiųjų kiečių ekstraktuose, buvo naudojamas Folin-Ciocalteu kolorimetrinis metodas. Pirmiausia paruošiamas darbinis reagentas. Motininis Folin-Ciocalteu (FC) reagentas 10 kartų praskiedžiamas išgrynintu vandeniu (1 dalis reagento ir 9 dalys distiliuoto vandens), taip gaunamas darbinis FC reagentas. Po to paruošiamas 7,5% natrio karbonato tirpalas. Atsveriamas 18,75 g natrio karbonato, kuris yra tirpinamas 250 ml matavimo kolboje ir pripilama išgryninto vandens iki žymės. Pagamintus etanolinius žaliavų ekstraktus matavimams Folin-Ciocalteu metodu reikia skiesti išgrynintu vandeniu 20 kartų (1 dalis ekstrakto ir pridėti 19 dalių vandens).

Folin-Ciocalteu metodika. Imama 200 µl tiriamojo ekstrakto tirpalo ir sumaišoma su 1000 µl darbinio FC reagentu, dedama 800 µl 7,5% natrio karbonato tirpalo. Gautas mišinys sumaišomas ir 1 valandą laikomas tamsoje, kambario temperatūroje. Palyginamasis kalibravimo tirpalas ruošiamas paimant 200 µl ekstrakcijai pasirinkto 70% etanolio tirpiklio, sumaišomas su 1000 µl darbinio FC reagentu ir dedama 800 µl natrio karbonato tirpalo. Spektrofotometras nukalibruojamas esant 765 nm bangos ilgiui ir išmatuojama mišinio absorbcija. Suminis fenolinių junginių kiekis išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentu (GAE) gramui žaliavos, kuris apskaičiuojamas pagal formulę:

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

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

V – ekstrakto tūris;

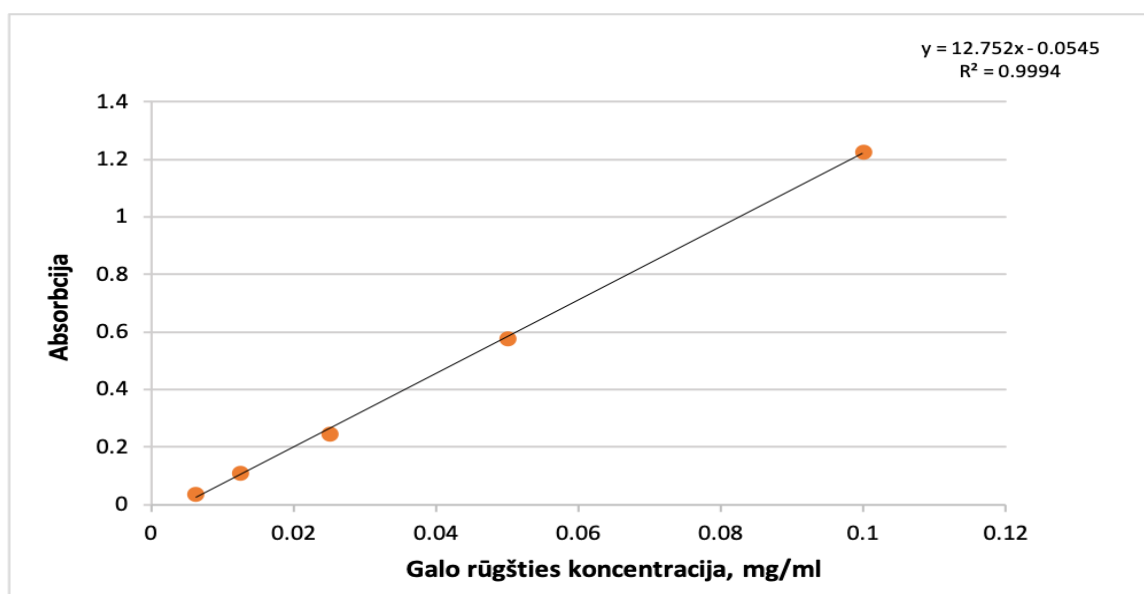
m – tikslus atsvertas žaliavos kiekis gramais.

Galo rūgšties standartinių tirpalų gamyba ir kalibracinės kreivės sudarymas

Galo rūgšties kalibracinių tirpalų gamyba. 1 mg galo rūgšties tirpinamas 10 ml matavimo kolboje ir pripilama 40% etanolio tirpiklio iki žymės. Gaunama 0,1 mg/ml galo rūgšties koncentracija. Gauta koncentracija skiedžiama du kartus ir gaunama 0,05 mg/ml, taip atitinkamai gaunami visi 5 galo rūgšties koncentracijų tirpalai: 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,0125 mg/ml, 0,00625 mg/ml.

Metodika. Imama 200 µl galo rūgšties standartinio tirpalo (visų 5 skirtingų koncentracijų) sumaišoma su 1000 µl darbinio Folin-Ciocalteu reagentu ir dedama 800 µl 7,5% natrio karbonato tirpalo. Gautas mišinys sumaišomas, laikomas 1 valandą tamsoje, kambario temperatūroje. Spektrofotometras nukalibruojamas esant 765 nm bangos ilgiui ir išmatuojama mišinio absorbcija. Suminis fenolinių junginių kiekis išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentu (GAE) gramui žaliavos.

Galo rūgšties kalibracinė kreivė pavaizduota 12 paveiksle.



12 pav. Galo rūgšties kalibracinė kreivė

2.4.3. ABTS metodas antiradikalinio aktyvumo nustatymui

Siekiant įvertinti *A. absinthium* žaliavų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, buvo naudojamas laisvųjų radikalų surišimo ABTS metodas. Pirmiausia paruošiamas 2mM koncentracijos motininis ABTS reagentas. Atsveriami 0,0548 g 2,2,-azino-bis-(3- etilbenzotiazolino-6-sulfono) rūgšties miltelių ir ištirpinama 50 ml išgryninto vandens tamsaus stiklo buteliuke, apsaugotame nuo tiesioginių saulės šviesos spindulių. Į gautą tirpalą pridedama 0,0095 g kalio persulfato miltelių. Mišinys sumaišomas ir paliekamas tamsoje 16 valandų. Po 16 valandų ruošiamas darbinis ABTS tirpalas praskiedžiant motininį tirpalą išgrynintu vandeniu iki 0,800 absorbcijos vienetų esant 734 nm bangos ilgiui. Kaip palyginamasis tirpalas naudojamas išgrynintas vanduo.

ABTS metodika. Imama 3 ml darbinio ABTS tirpalo ir pridedama 20 µl tiriamojo ekstrakto. Mišinys laikomas tamsoje, kambario temperatūroje 1 valandą. Kaip palyginamasis tirpalas naudojamas išgrynintas vanduo. Spektrofotometru išmatuojama mišinio absorbcija esant 734 nm bangos ilgiui. Laisvųjų radikalų surišimo geba išreiškiama standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentais (TE) gramui žaliavos. Apskaičiuojama pagal formulę:

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

c – trolokso koncentracija (µmol/L), nustatyta iš kalibracinės kreivės;

V – ekstrakto tūris (ml);

m – tikslus atsvertas žaliavos kiekis (g).

Trolokso standartinių tirpalų gamyba ir kalibracinės kreivės sudarymas

Trolokso kalibracinių tirpalų gamyba. Pirmiausia apsiskaičiuojama, kiek gramų trolokso miltelių reikės atsisverti, norint pagaminti 5 skirtingų koncentracijų tirpalus trolokso kalibracinei kreivei. Apskaičiuojama pagal formulę:

$$C = m(g)/M(g/mol) \times V(L)$$

C – tirpalo koncentracija (mol/l);

m – medžiagos masė (g);

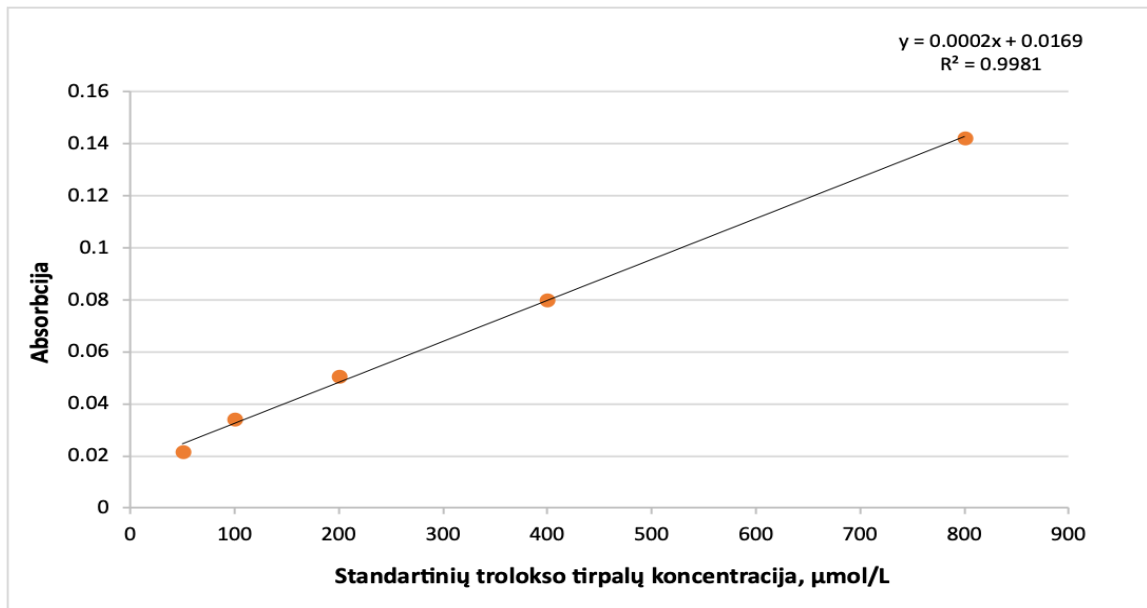
V – tirpalo tūris (L);

M – molinė masė (g/mol).

2 mg trolokso miltelių tirpinama 10 ml matavimo kolboje ir pripilama 96% etanolio tirpiklio iki žymės. Gaunama 800 µmol/l trolokso koncentracija. Šita koncentracija skiedžiama du kartus ir gaunama 400 µmol/l, taip atitinkamai gaunami visi 5 trolokso koncentracijų tirpalai: 800 µmol/l; 400 µmol/l; 200 µmol/l; 100 µmol/l; 50 µmol/l.

Metodika. Imama 20 µl trolokso standartinių tirpalų (visų 5 skirtingų koncentracijų) sumaišoma su 3 ml darbinio ABTS tirpalu. Gautas mišinys sumaišomas, laikomas 1 valandą tamsoje, kambario temperatūroje. Palyginamasis tirpalas naudojamas išgrynintas vanduo. Spektrofotometras nukalibruojamas esant 734 nm bangos ilgiui ir išmatuojama mišinio absorbcija. Laisvųjų radikalų surišimo geba išreiškiama standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentais (TE) gramui žaliavos.

Trolokso kalibracinė kreivė pavaizduota 13 paveiksle.



13 pav. Trolokso kalibracinė kreivė

2.4.4. FRAP metodas redukcinio aktyvumo nustatymui

Norint įvertinti *A.absinthium* žaliavų redukcinį aktyvumą buvo naudojamas FRAP metodas. Pirmiausia paruošiami šie reagentai:

1. 300 mM acetatinis buferis: atsveriama 3,1 g natrio acetato, suberiama į 1000 ml matavimo kolbą, įpilama 16 ml ledinės acto rūgšties ir skiedžiama išgrynintu vandeniu iki žymės (ph=3,6).
2. 10 mM 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazino tirpalas: į 50 ml išgryninto 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.
3. 20 mM geležies (III) chlorido heksahidrato tirpalas: atsveriama 0,2703 g geležies (III) chlorido heksahidrato ir ištirpinama 50 ml išgryninto vandens.

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

FRAP metodika. Imama 3 ml darbinio FRAP reagento ir pridedama 20 μl tiriamojo ekstrakto. Mišinys laikomas tamsoje, kambario temperatūroje 1 valandą. Palyginamasis tirpalas ruošiamas taip pat, tik vietoje ekstrakto dedama tirpiklio – išgryninto vandens. Spektrofotometru išmatuojama mišinio absorbcija esant 593 nm bangos ilgiui. Redukcinio aktyvumo galia išreiškiama standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentais (TE) gramui žaliavos. Apskaičiuojama pagal formulę:

$$TE_{FRAP} = c \times V / m; \mu\text{mol/g}$$

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

V – ekstrakto tūris (ml);

m – tikslus atsvertas žaliavos kiekis (g).

Trolokso standartinių tirpalų gamyba ir kalibracinės kreivės sudarymas

Trolokso kalibracinių tirpalų gamyba. Pirmiausia apskaičiuojama kiek gramų trolokso miltelių reikės atsisverti, norint pagaminti 5 skirtingų koncentracijų tirpalus trolokso kalibracinei kreivei. Apskaičiuojama pagal formulę:

$$C = m(g)/M(g/mol) \times V(L)$$

C – tirpalo koncentracija (mol/l);

m – medžiagos masė (g);

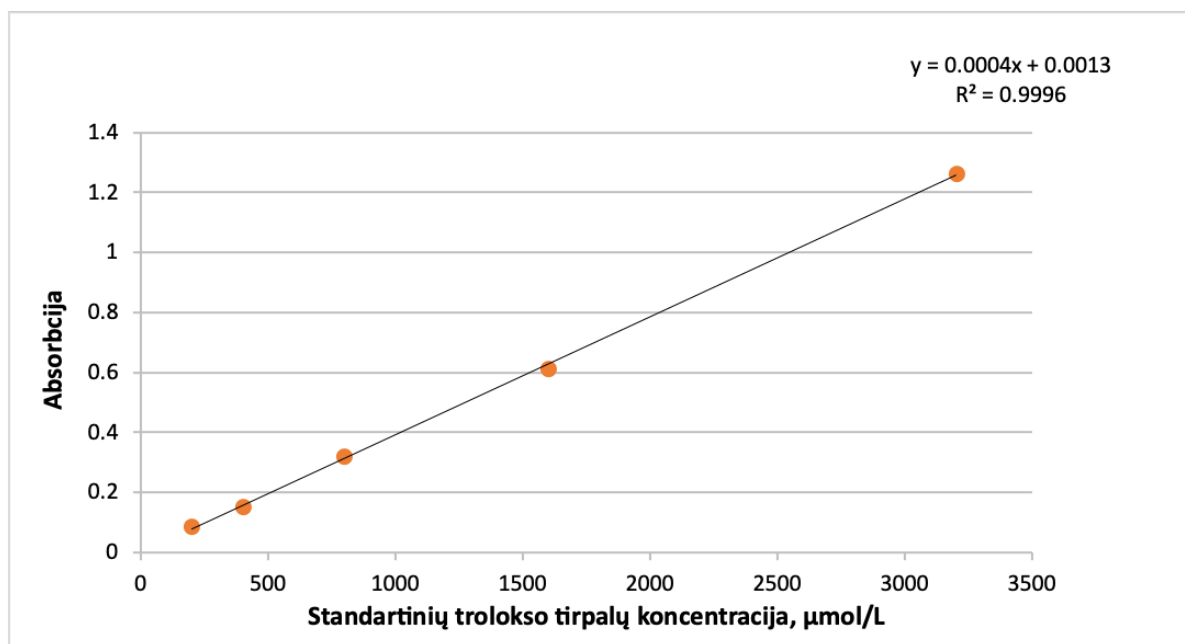
V – tirpalo tūris (L);

M – molinė masė (g/mol).

0,015 g trolokso miltelių tirpinama 10 ml matavimo kolboje ir pripilama 96% etanolio tirpiklio iki žymės. Gaunama 6400 $\mu\text{mol/l}$ trolokso koncentracija. Šita koncentracija skiedžiama du kartus ir gaunama 3200 $\mu\text{mol/l}$, taip atitinkamai gaunami visi 5 trolokso koncentracijų tirpalai: 6400 $\mu\text{mol/l}$; 3200 $\mu\text{mol/l}$; 1600 $\mu\text{mol/l}$; 800 $\mu\text{mol/l}$; 400 $\mu\text{mol/l}$.

Metodika. Imama 20 μl trolokso standartinių tirpalų (visų 5 skirtingų koncentracijų) sumaišoma su 3 ml darbinio FRAP reagentu. Gautas mišinys sumaišomas, laikomas 1 valandą tamsoje, kambario temperatūroje. Palyginamasis tirpalas ruošiamas taip pat, tik vietoje pagamintų skirtingos koncentracijos tirpalų dedamas tirpiklis. Spektrofotometras nukalibruojamas esant 593 nm bangos ilgiui ir išmatuojama mišinio absorbcija. Redukcinio aktyvumo galia išreiškiama standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentais (TE) gramui žaliavos.

Trolokso kalibracinė kreivė pavaizduota 14 paveiksle.



14 pav. Trolokso kalibracinė kreivė

2.4.5. *A. absinthium* žaliavų ekstraktų fenolinių junginių kiekybinės sudėties nustatymas ESC metodu.

Water e2695 Alliance sistema su fotodiodų matricos detektoriumi Waters 2998 buvo panaudota chromatografiniam tyrimui. Skirstymui panaudota ACE analitinė kolonėlė (C18, 150 mm x 4,6 mm 3 μ m). Tėkmės greitis 0,5 ml/min, injekcijos tūris 10 μ l. Gradientinė eliucija buvo sudaryta iš A eliuento (0,05 proc. trifluoracto rūgštis) ir B eliuento (acetonitrilas) pagal gradiento kitimą: 0-5 min – 12 proc. tirpiklis B, 5-50 min – 12-30 proc. tirpiklis B, 50-51 min – 30-90 proc. tirpiklis B, 51-56 min – 90 proc. tirpiklis B, 57 min – 12 proc. tirpiklis B.. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės ir pamatinės medžiagos sulaikymo trukmę ir UV spektro ypatumus.

2.5. Tyrimo duomenų analizė

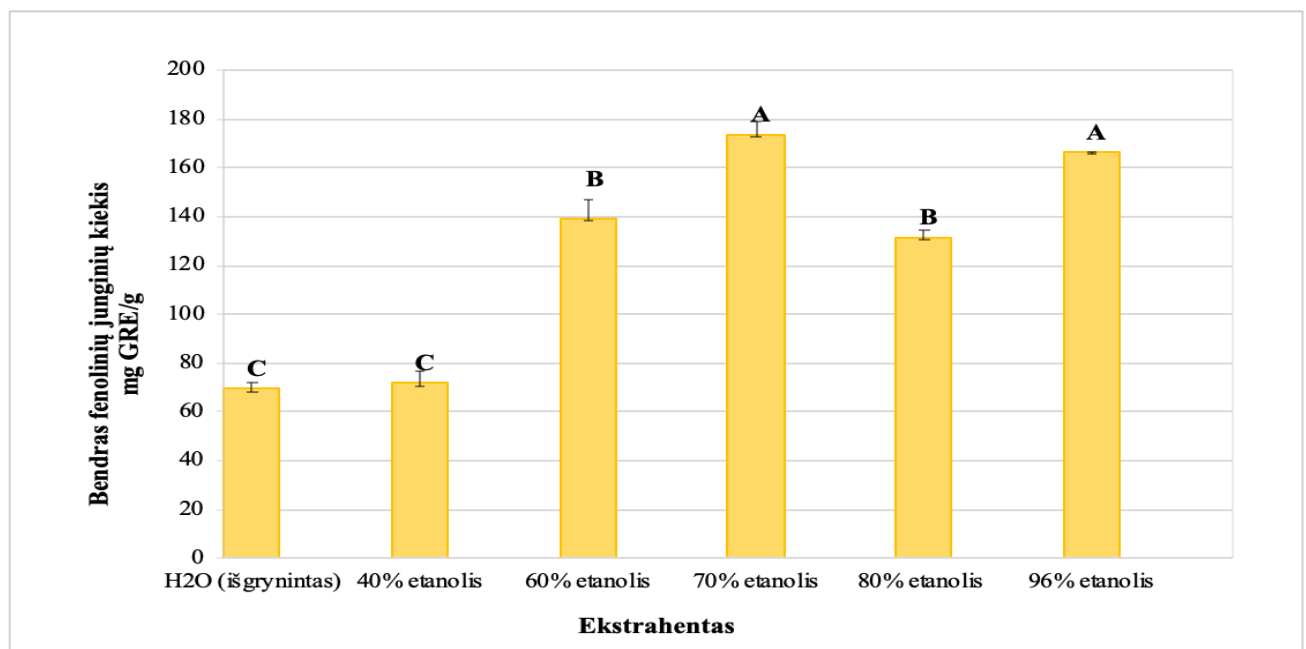
Duomenų analizė buvo atlikta naudojant šias kompiuterines programas: „Microsoft Word 2020“, Microsoft Excel 2020“ ir „SPSS Statistics 23“ („IBM“, JAV). Apskaičiuoti trijų pakartojimų aritmetiniai vidurkliai ir standartiniai nuokrypiai. Kiekinės sudėties įvertinimui apskaičiuoti variacijos koeficientai. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp palyginamųjų duomenų buvo įvertinti taikant vienfaktorinę analizę ANOVA. Įvertinimui pasirinktas Tukey kriterijus. Statistiškai reikšmingas skirtumas laikomas, jeigu $p < 0,05$. Statistinių duomenų koreliacinių ryšių įvertinimui buvo naudotas Spirmeno koreliacijos koeficientas (r). Hierarchinės klasterinės analizės metodas pritaikytas dendrogramų sudarymui. Reikšmingumuo lygmuo $\alpha = 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Tirpiklio koncentracijos nustatymas augalinės žaliavos ekstrakcijai

Moksliniais tyrimų duomenimis nustatyta, kad didesnis fenolinių junginių kiekis išekstrahuojamas naudojant alkoholinį ekstrahentą [8, 11]. Karčiųjų kiečių etanoliniai ekstraktai pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu, palyginti su vandeniniais ar chloroforminiais ekstraktais [8].

Siekiant nustatyti ir ištirti efektyviausią bei optimalų etanolinį tirpiklį karčiųjų kiečių ekstraktams pagaminti, naudojami skirtingų koncentracijų tirpikliai. Ekstrahavimui naudojamas išgrynintas vanduo ir įvairios 40%, 60%, 70%, 80%, 96% etanolio koncentracijos. Vandeniniame ir skirtingų koncentracijų etanoliniuose ekstraktuose esantis bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas Folin-Ciocalteu metodu. (15 pav.).



15 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis (mg/g) *A. absinthium* ekstraktuose, naudojant išgrynintą vandenį ir skirtingos koncentracijos etanolio ir vandens mišinius ($n=3$); skirtingos raidės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų ekstraktų ($p<0,05$)

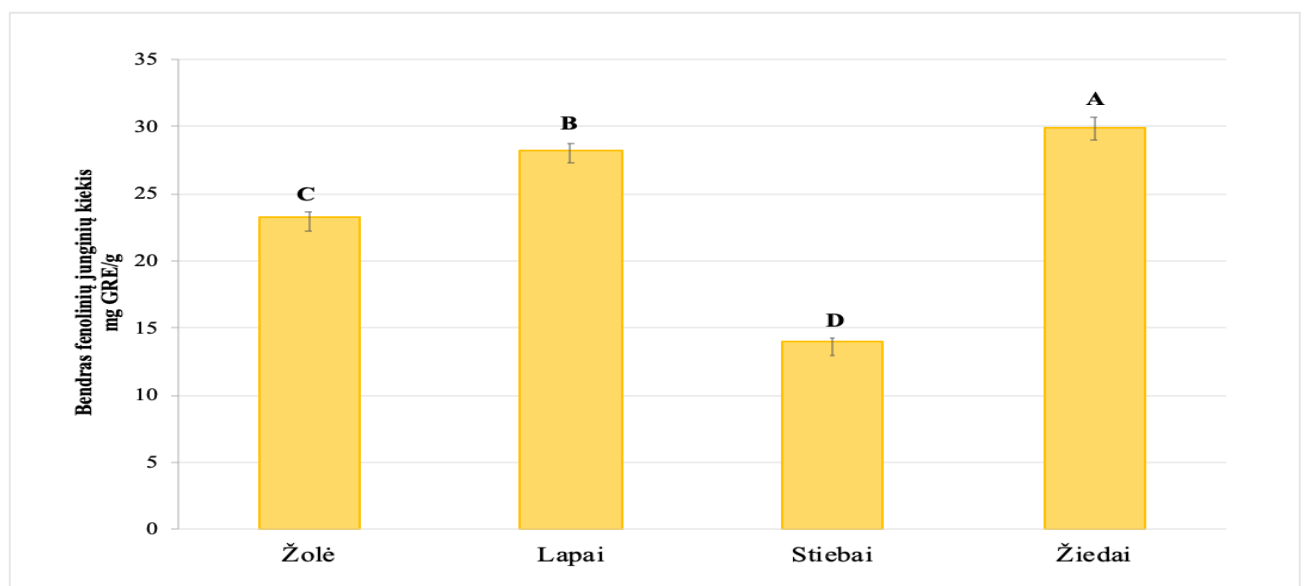
Remiantis gautais duomenimis nustatyta, kad mažiausia fenolinių junginių išeiga gauta, kai ekstrakcijai naudojamas išgrynintas vanduo ($69,43 \pm 2,57$ mg GRE/g) ir 40% (V/V) koncentracijos etanolinis tirpiklis ($71,82 \pm 4,80$ mg GRE/g) ($p<0,05$). Didžiausias fenolinių junginių kiekis ($173,49 \pm 5,82$ mg GRE/g) nustatytas vaistinės augalinės žaliavos ekstraktuose, ekstrahentu naudojant 70% (V/V) etanolį. Gautus rezultatus patvirtina moksliniai literatūros duomenys, dėl šios priežasties 70% etanolis yra tinkamiausias organinis ekstrakcijos tirpiklis biologiškai aktyvių fenolinių junginių išgavimui [11]. Todėl 70% koncentracijos etanolinis tirpiklis pasirinktas tolimesniems tyrimams atlikti bei ekstraktams ruošti.

3.2. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas, Lietuvoje augančių karčiųjų kiečių (*A. absinthium* L.) ėminiuose

Fenolinių junginių kokybinė ir kiekybinė sudėtis augalinėje žaliavoje priklauso nuo: vidinių (genties, rūšies, genetinių faktorių) ir išorinių (klimato sąlygų, cheminės dirvožemio sudėties, rinkimo ir laikymo sąlygų) veiksnių, ekstrahavimo bei analizės metodų [36, 52]. Nagrinėjant mokslinę literatūrą pastebėta, kad nėra pakankamai duomenų bei atliktų fitocheminių tyrimų apie Lietuvoje natūraliai augančių karčiųjų kiečių fenolinių junginių pasiskirstymo dėsningumus skirtinguose augalo organuose ar skirtingose augavietėse. Todėl atlikti tyrimai suteikia daugiau informacijos apie karčiųjų kiečių fenolinių junginių kiekių svyravimus skirtinguose augalo organuose. Taip pat galimybę nustatyti individualius fenolinius junginius ir įvertinti antioksidacinį aktyvumą.

3.2.1. Fenolinių junginių kiekio nustatymas skirtinguose augalo organuose

Atliktas tyrimas, kurio metu nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis skirtinguose augalo organuose masinio žydėjimo metu. Lietuvoje natūraliai augančių karčiųjų kiečių (*A. absinthium* L.) vaistinėje žaliavoje vidutiniškai yra $23,90 \pm 0,49$ mg GRE/g fenolinių junginių. Nepalo mokslininkai yra atlikę fitocheminius tyrimus su paprastųjų kiečių (*A. vulgaris* L.) augaline žaliava, kurioje fenolinių junginių išeiga ($86,62 \pm 0,04$ mg GRE/g) yra 3,6 karto didesnė nei *A. absinthium* ėminiuose [53]. Bendras fenolinių junginių kiekio įvairavimas skirtinguose *Artemisia absinthium* L. augalinių žaliavų: lapų, žiedų, žolės, stiebų ėminiuose pavaizduotas 16 paveiksle.



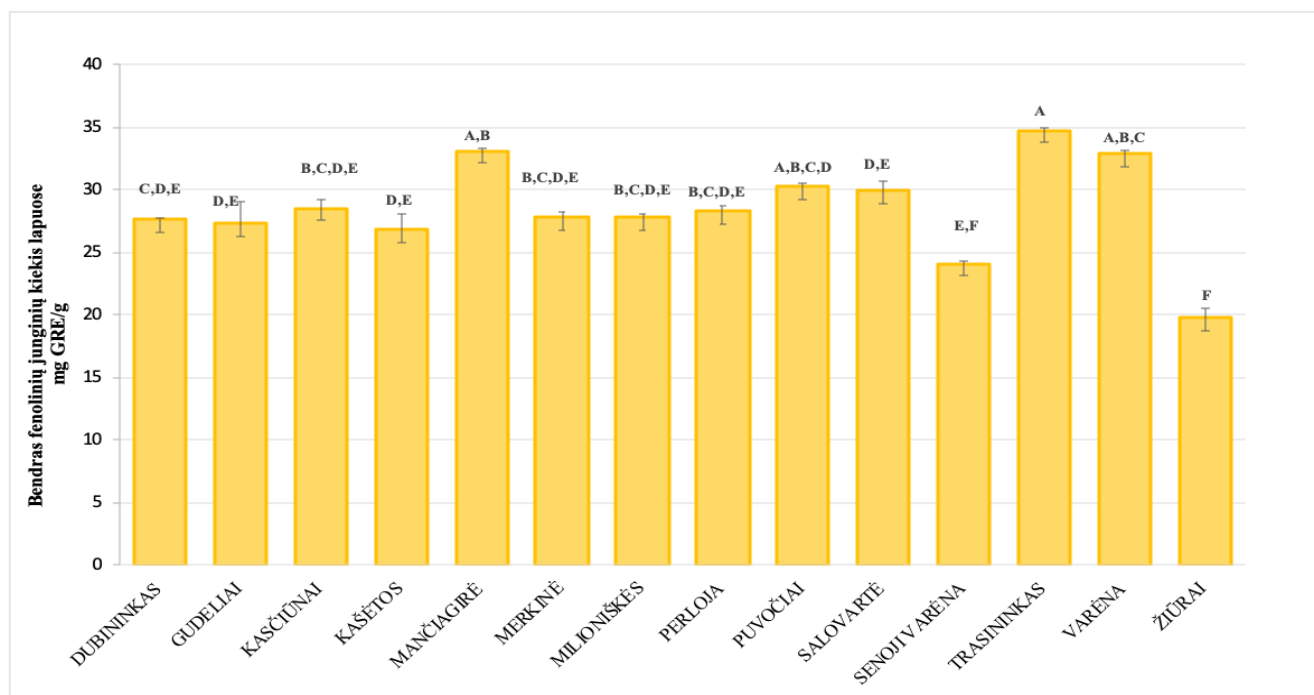
16 pav. Fenolinių junginių kiekis (mg/g) skirtinguose *A. absinthium* augalo organuose (žolė, lapai, stiebai, žiedai) masinio žydėjimo metu; skirtingos raidės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų ekstraktų ($p < 0,05$)

Daugiausia fenolinių junginių nustatyta karčiųjų kečių žieduose – $29,97 \pm 0,79$ mg GRE/g, atitinkamai panašus kiekis nustatytas lapuose – $28,27 \pm 0,52$ mg GRE/g, statistiškai reikšmingai mažesnis kiekis aptinkamas žolėje – $23,22 \pm 0,39$ mg GRE/g. Mažiausia fenolinių junginių išeiga gauta karčiųjų kečių stiebų ėminiuose – $13,99 \pm 0,27$ mg GRE/g ($p < 0,05$). Lyginant kitose šalyse tirtų karčiųjų kečių fenolinių junginių kiekius, Tunise tirtuose žolės ekstraktuose buvo nustatyta vidutiniškai – 99,89 mg GAE/g fenolių [7]. Turkijoje nustatyta 6,57 µg GAE/mg fenolinių junginių [45]. Rumunijoje natūraliai augančiuose karčiųjų kečių ėminiuose nustatyta – 18,14 mg GAE/g fenolinių junginių [10]. Iranas iš visų šalių pasižymėjo gausiausiu fenolinių junginių kiekiu *A. absinthium* L. žieduose, lapuose ir stiebuose – 194,9 mg GAE/g [9]. Atliktuose moksliniuose tyrimuose pastebėta, kad didžiausias kiekis fenolinių junginių yra nustatomas karčiųjų kečių augalinės žaliavos lapuose, o šiek tiek mažesnis žieduose [25]. Mūsų atliktame tyrime bendras fenolinių junginių kiekis žieduose tik 5,67 % didesnis, nei lapuose ir 46,68 % didesnis nei stiebuose. Visos nustatytos reikšmės yra statistiškai reikšmingos $p < 0,05$. Bendrą fenolinių junginių kiekį pasaulio šalyse lemia skirtingos klimatinės ir edafinės sąlygos, todėl gauti tyrimų duomenys iš skirtingų šalių yra nevienodi.

3.2.2. Karčiųjų kečių fenolinių junginių kiekio kitimas skirtingose morfologinėse augalo dalyse, surinktose iš skirtingų augaviečių

Apskaičiuotas variacijos koeficientas, kuris parodo fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairumą bei stabilumą tarp karčiųjų kečių žaliavų (lapų, žiedų, stiebų), surinktų skirtingose augavietėse. Mažiausias bendras variacijos koeficientas skirtinguose morfologiniuose organuose nustatytas lapuose (CV=1,93 proc.), didžiausias – žieduose (CV=3,32 proc.). Stiebų variacijos koeficientas CV=2,03 proc. Stabiliausia cheminė sudėtis nustatyta Dubininkuose rinktuose žieduose (CV=0,08 proc.). Didžiausias variacijos koeficientas nustatytas Perlojos žieduose (CV=32,80 proc.)

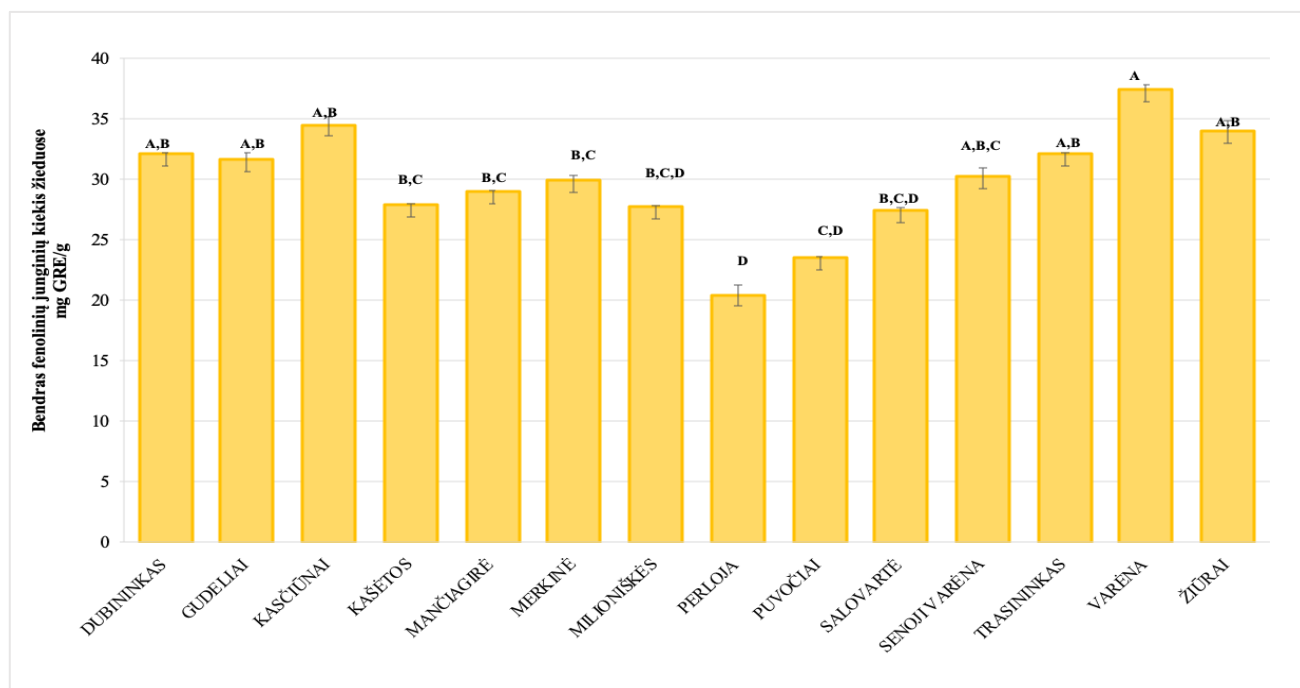
Bendras fenolinių junginių kiekio įvairavimas *Artemisia absinthium* L. augalinių žaliavų: lapų, žiedų, žolės, stiebų ėminiuose, surinktuose iš įvairių Dzūkijos regiono vietų, pavaizduotas 17-20 pav. Bendras fenolinių junginių kiekio kitimas ir rezultatai lapuose pavaizduoti 17 pav.



17 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis (mg/g) *A. absinthium* L. lapų ėminiuose, skirtingose augavietėse; skirtingos raidės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų karčiųjų kiečių ėminių ekstraktų ($p < 0,05$)

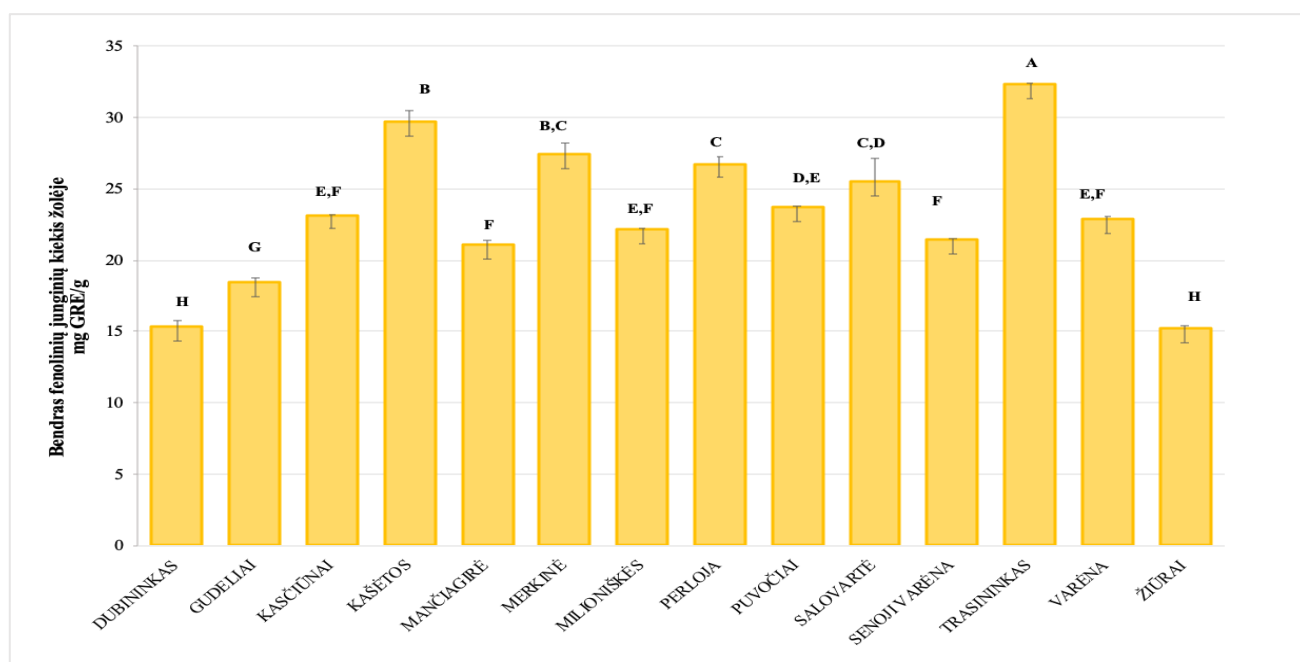
Fenolinių junginių kiekis vaistinės augalinės žaliavos lapuose varijuoja nuo $19,79 \pm 0,67$ mg GRE/g iki $34,76 \pm 0,1474$ mg GRE/g. Atlikus tyrimus su karčiųjų kiečių lapų ėminiais skirtingose augavietėse nustatyta, kad didžiausias fenolinių junginių kiekis randamas Dzūkijos regione, Trasininkų kaime – $34,76 \pm 0,14$ mg GRE/g, Mančiagirėje – $33,1 \pm 0,13$ mg GRE/g ir Varėnos kaime – $32,89 \pm 0,19$ mg GRE/g. Mažiausias kiekis fenolinių junginių lapuose nustatytas Žiūrų kaime – $19,79 \pm 0,67$ mg GRE/g, Senojoje Varėnoje – $24,11 \pm 0,11$ mg GRE/g ir Kašėtose – $26,81 \pm 1,26$ mg GRE/g. Skirtingomis raidėmis sužymėti statistiniai skirtumai tarp tirtų lapų ekstraktų ($p < 0,05$).

Bendras fenolinių junginių kiekis karčiųjų kiečių žieduose pavaizduotas 18 paveiksle. Junginių kiekis karčiųjų kiečių žieduose varijuoja nuo $20,51 \pm 6,72$ mg GRE/g iki $37,41 \pm 0,02$ mg GRE/g. Įvertinus gautus tyrimų rezultatus, nustatyta, kad didžiausias fenolinių junginių kiekis rinktuose karčiųjų kiečių žieduose yra Varėnoje – $37,41 \pm 0,02$ mg GRE/g, Kasčiūnuose – $34,57 \pm 0,60$ mg GRE/g ir Žiūrų kaime – $34,06 \pm 0,88$ mg GRE/g. Mažiausiai fenolinių junginių rasta Perlojos kaime $20,51 \pm 6,72$ mg GRE/g, Puvočiuose $23,53 \pm 0,10$ mg GRE/g bei Salovartės kaime $27,50 \pm 0,15$ mg GRE/g. Skirtingomis raidėmis sužymėti statistiniai skirtumai tarp tirtų augalinės žaliavos ekstraktų ėminių ($p < 0,05$).



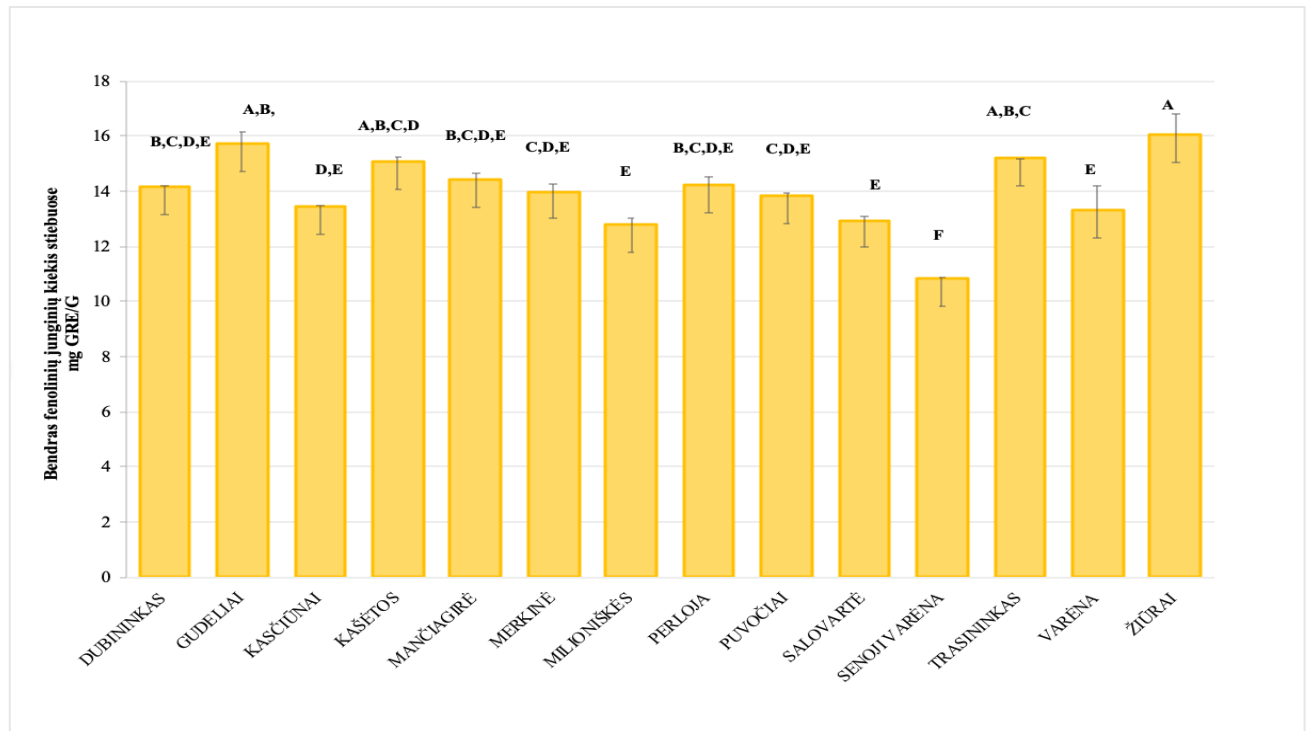
18 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis (mg/g) *A. absinthium* L. žiedų ėminiuose, skirtingose augavietėse; skirtingos raidės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų karčiųjų kiečių ėminių ekstraktų ($p < 0,05$)

Fenolinių junginių kiekis karčiųjų kiečių žolės ėminių (19 pav.) ekstraktuose varijuoja nuo $15,26 \pm 0,14$ mg GRE/g iki $32,34 \pm 0,06$ mg GRE/g. Daugiausiai fenolinių junginių randama Trasininkų kaime – $32,34 \pm 0,06$ mg GRE/g, Kašėtose – $29,67 \pm 0,82$ mg GRE/g ir Merkinėje – $27,39 \pm 0,84$ mg GRE/g. Mažiausias kiekis aptinkamas Žiūrų kaime – $15,26 \pm 0,14$ mg GRE/g, Dubininkuose – $15,35 \pm 0,36$ mg GRE/g ir Gudelių kaime – $18,48 \pm 0,29$ mg GRE/g. Skirtingos raidės pažymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų karčiųjų kiečių ėminių ekstraktų ($p < 0,05$).



19 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis (mg/g) *A. absinthium* L. žolės ėminiuose, skirtingose augalo augavietėse; skirtingos raidės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų karčiųjų kiečių ėminių ekstraktų ($p < 0,05$)

20 pav. diagramoje pavaizduotas stiebuose esantis bendras fenolinių junginių kiekis vyrauja nuo $10,80 \pm 0,06$ mg GRE/g iki $16,03 \pm 0,78$ mg GRE/g. Didžiausias fenolinių junginių kiekis randamas Žiūrų kaime – $16,03 \pm 0,78$ mg GRE/g, Gudelių – $15,70 \pm 0,46$ mg GRE/g ir Trasininkų kaime – $15,17 \pm 0,02$ mg GRE/g. Mažiausia junginių aptinkama Senojoje Varėnoje – $10,80 \pm 0,06$ mg GRE/g, Salovartėje – $12,95 \pm 0,14$ mg GRE/g ir Milioniškėse – $12,77 \pm 0,26$ mg GRE/g.



20 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis (mg/g) *A. absinthium* L. stiebų ėminiuose, skirtingose augalo augavietėse; skirtingos raidės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų karčiųjų kiečių ėminių ekstraktų ($p < 0,05$)

Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis mūsų atliktame tyrime nustatytas Varėnos bei Trasininkų kaime rinktuose karčiųjų kiečių ėminiuose. Šiose vietovėse rinkta žaliava natūraliai augo smėlingoje pievoje. Mažiausias bendras kiekis fenolių aptiktas Žiūrų kaime, kuriame žaliava buvo rinkta pievoje prie pakelės ir Senosios Varėnos kaimo karčiuosiuose kiečiuose, rinktuose pievoje prie upės. Mūsų atliktame tyrime, fenolinių junginių kiekiui įtakos galėjo turėti skirtingas dirvožemis ir šviesos kiekis. Moksliniuose tyrimuose teigiama, kad fenolinių junginių skirtumai gali būti siejami su skirtingomis vietovėmis, kuriose augalai buvo renkami, ir jų prisitaikymu prie skirtingų aplinkos sąlygų. Smėlinguose dirvožemiuose fenolinių jungių kiekis gali būti didesnis nei pievose prie kelio ar upės, kuriose tiesioginės saulės šviesos patenka mažiau, ją užgožia medžiai. Todėl fenolinių junginių kaupimasis augalo organuose gali priklausyti nuo kritulių kiekio, dirvožemio ir reljefo bei šviesos šaltinių [54].

Taip pat galima pastebėti, kad fenolinių junginių kiekis skiriasi ne tik tarp augalo organų, bet ir tarp skirtingų augalo augaviečių. Fenolinių junginių kiekis, *A. absinthium* L. vaistinėje augalinėje žaliavoje, užaugintoje skirtingose augavietėse, priklauso nuo oro sąlygų, kenkėjų, žemės ploto ir

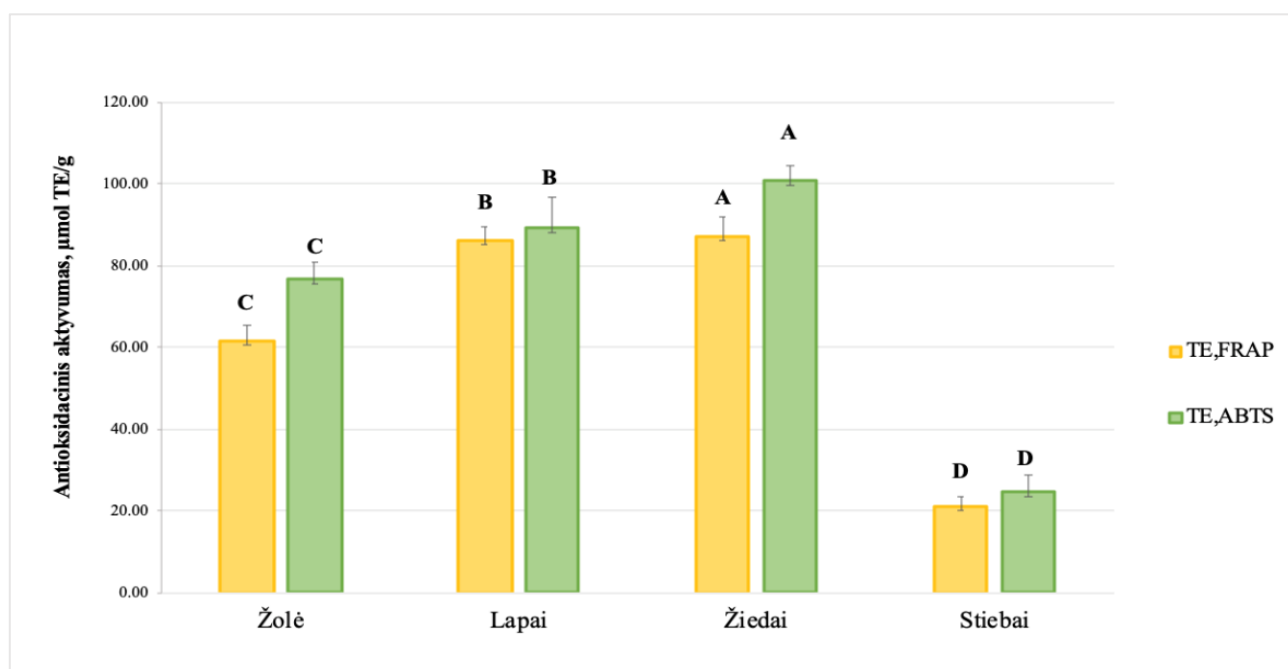
skirtingo dirvožemio, todėl šie veiksniai gali neigiamai arba teigiamai veikti derlių ir augalo vaistines savybes [55].

3.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas, Lietuvoje auginamų karčiųjų kiečių (*A. absinthium* L.) ėminiuose, FRAP ir ABTS metodais

Antioksidantinis aktyvumas yra naudojamas kaip parametras, norint įvertinti bioaktyvius komponentus augaluose [25]. Augalų farmakologiniui poveikiui įtaką daro antioksidantų kiekis augalinėje žaliavoje, todėl tikslinga įvertinti antioksidacinį aktyvumą. Lietuvoje nėra atlikta tyrimų antioksidacinio aktyvumo nustatymui karčiųjų kiečių augalinėje žaliavoje, todėl atliktas tyrimas suteikia daugiau informacijos antioksidacinio aktyvumo stiprumui įvertinti skirtinguose augalo organuose.

3.3.1. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas skirtinguose augalo organuose

Redukcinis ir antiradikalinis aktyvumas ištirtas masinio žydėjimo metu surinktoje, natūraliai augančioje karčiųjų kiečių žaliavoje. Nustatytas vidutinis redukcinis aktyvumas yra $63,93 \pm 3,78$ $\mu\text{mol TE/g}$, o antiradikalinis – $72,77 \pm 11,07$ $\mu\text{mol TE/g}$. Antioksidacinis aktyvumas skirtingose morfologinėse augalo dalyse pavaizduotas 21 paveiksle.



21 pav. Antioksidacinis aktyvumas ($\mu\text{mol/g}$) skirtinguose *A. absinthium* augalo organuose (žolė, lapai, stiebai, žiedai) masinio žydėjimo metu; skirtingos raidės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų ekstraktų ($p < 0,05$)

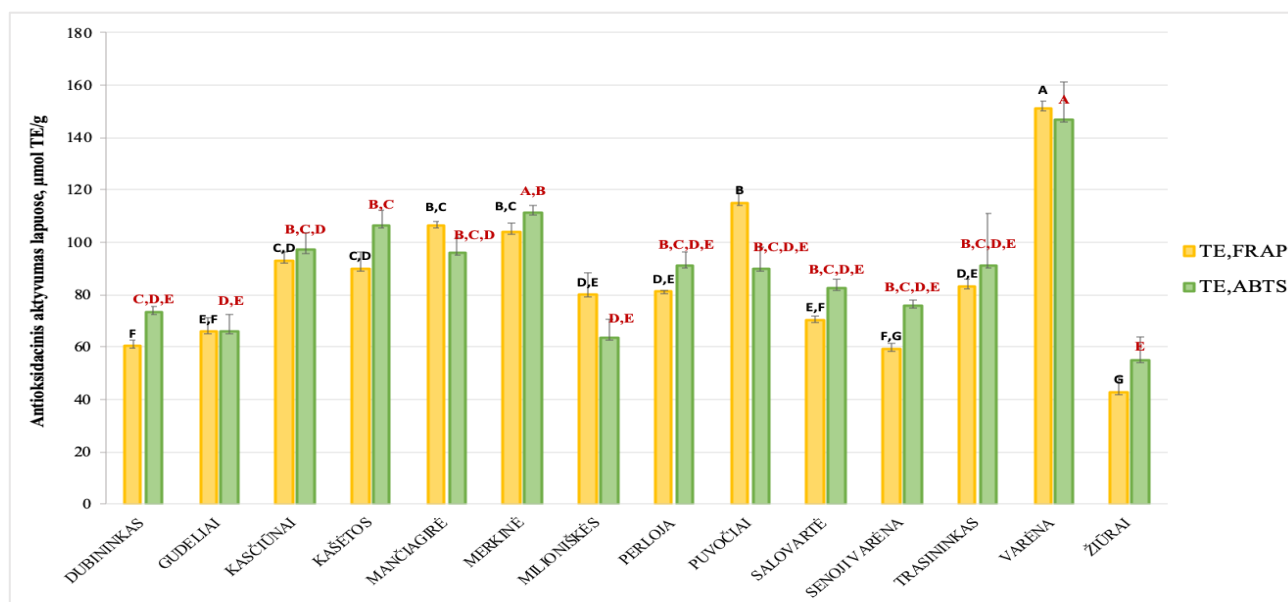
Nustatyta, kad stipriausias redukcinis aktyvumas yra *A. absinthium* žieduose – $87,23 \pm 4,87$ $\mu\text{mol TE/g}$, jis tik 1,47 % didesnis nei lapuose – $85,94 \pm 3,74$ $\mu\text{mol TE/g}$. Mažiausias redukcinis aktyvumas nustatytas stiebuose – $21,03 \pm 2,53$ $\mu\text{mol TE/g}$. Atitinkamai didžiausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas karčiųjų kiečių žieduose – $100,73 \pm 3,95$ $\mu\text{mol TE/g}$, jis 11,49 % didesnis nei lapuose – $89,15 \pm 32,03$ $\mu\text{mol TE/g}$. Tačiau antiradikalinis aktyvumas žieduose 13,40 % stipresnis nei redukcinis aktyvumas karčiųjų kiečių žieduose. Mažiausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas taip pat stiebuose – $24,49 \pm 4,12$ $\mu\text{mol TE/g}$, jis 14,12 % didesnis nei redukcinis aktyvumas stiebuose. Žolės redukcinis ir antiradikalinis aktyvumas atitinkamai yra $61,50 \pm 3,99$ $\mu\text{mol TE/g}$, $76,70 \pm 4,916$ $\mu\text{mol TE/g}$. Įvertinus antioksidacinį aktyvumą, galima teigti, kad redukcinis ir antiradikalinis aktyvumas skirtinguose augalo organuose yra labai panašus ir mažai skiriasi tarpusavyje. Visi nustatyti karčiųjų kiečių skirtingų organų ekstraktų ėminių rezultatai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$).

Nustatyta, kad stipriausias antioksidacinis aktyvumas yra *A. absinthium* žieduose, tam įtakos galėjo turėti didžiausias fenolinų junginių kiekis, nustatytas taip pat žieduose. Mažiausiai fenolinių junginių kaupia vaistinės augalinės žaliavos stiebai, todėl atitinkamai gautas silpniausias redukcinis ir antiradikalinis aktyvumas, palyginus su žole, lapais ir žiedais. Moksliniame tyrime tyrėjai Riahi L. ir Chograni H. nustatė, kad FRAP metodu įvertintas redukcinis aktyvumas karčiojo kiečio lapų žaliavoje yra – $118,02 \pm 10,88$ $\mu\text{mol TE/g}$, o žieduose – $85,64 \pm 7,55$ $\mu\text{mol TE/g}$ [25]. Jų nustatytas redukcinis aktyvumas yra stipresnis lapuose nei žieduose, mūsų atliktame tyrime žiedai pasižymi stipresniu redukciniu aktyvumu nei lapai.

3.3.2. Karčiųjų kiečių antioksidacinio aktyvumo kitimas skirtingose morfologinėse augalo dalyse, surinktose iš skirtingų augaviečių

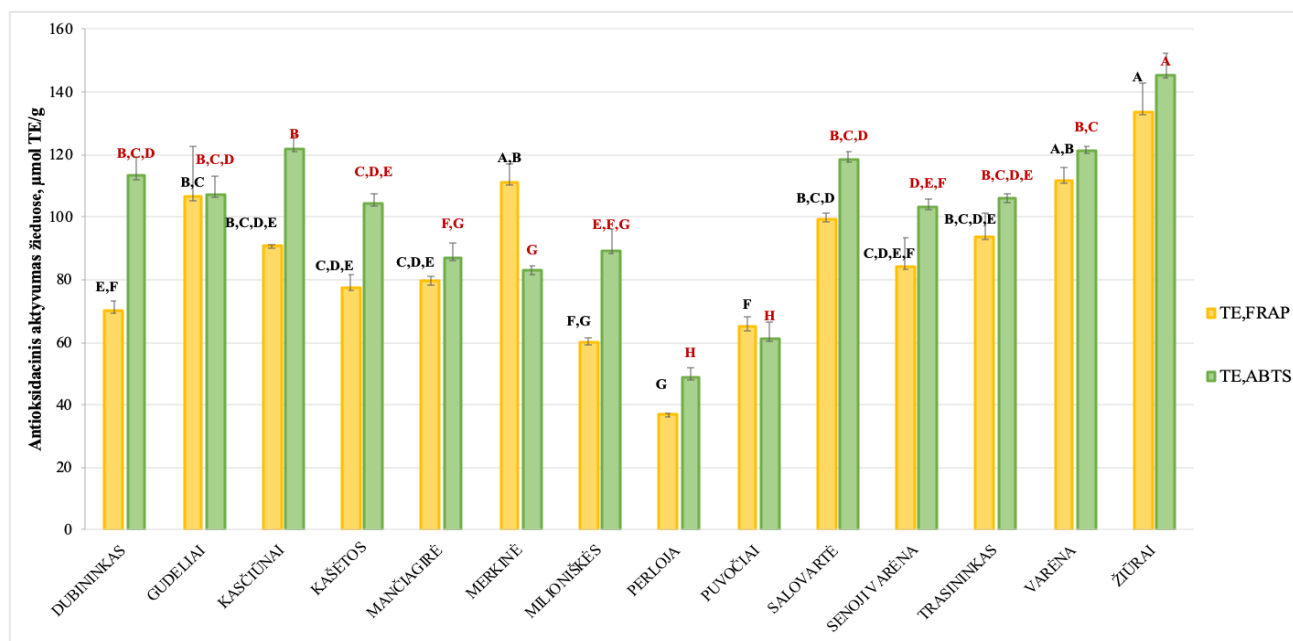
Antioksidacinio aktyvumo įvairavimas skirtingose morfologinėse *Artemisia absinthium* L. dalyse pavaizduotas keturiuose diagramose. Apskaičiuoti bendri variacijos koeficientai skirtinguose augalo organuose atsižvelgiant į karčiųjų kiečių augavietes. Nustatyta, kad stabiliausias redukcinis aktyvumas yra karčiųjų kiečių lapuose (CV= 4,92 proc.). Toliau atitinkamai didėjantys koeficientai žieduose (CV= 5,17 proc.) ir stiebuose (CV= 12,25 proc.). Mažiausias variacijos koeficientas nustatytas Perlojoje rinktuose žieduose (CV= 0,38 proc.), didžiausias Milioniškėse rinktuose stiebuose (CV= 33,73 proc.). Mažiausias bendras antiradikalinio aktyvumo variacijos koeficientas, atsižvelgiant į augavietes, nustatytas *A. absinthium* žieduose (CV= 4,23 proc.). Lapuose (CV= 8,62 proc.) ir stiebuose (CV= 21,20 proc.) koeficientai didesni nei žieduose. Didžiausias variacijos koeficientas nustatytas Senosios Varėnos

stiebuose (CV= 66,0 proc.). Mažiausias Kasčiūniuose rinktuose stiebuose (CV= 0,38 proc.). Antioksidacinio aktyvumo stiprumas lapuose pavaizduotas 22 paveiksle.



22 pav. Antioksidacinis aktyvumas ($\mu\text{mol/g}$) *A. absinthium* L. lapų ėminiuose, skirtinguose augalo augavietėse; skirtingos raidės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų karčiųjų kiečių ėminių ekstraktų ($p < 0,05$)

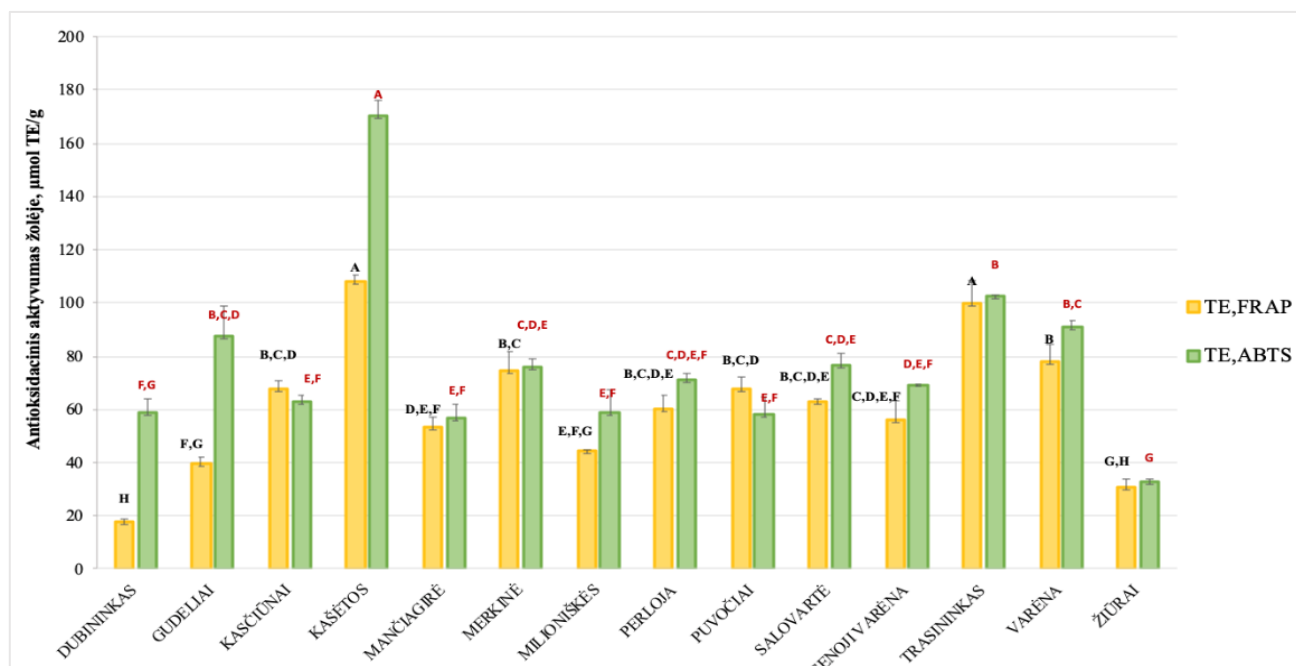
Redukcinio aktyvumo stiprumas karčiųjų kiečių augalinėje žaliavoje įvairuoja nuo $42,80 \pm 5,93$ $\mu\text{mol TE/g}$ iki $151,18 \pm 2,58$ $\mu\text{mol TE/g}$. Didžiausias redukcinis aktyvumas nustatytas Dzūkijos regione esančioje Varėnos gyvenvietėje – $151,18 \pm 2,58$ $\mu\text{mol TE/g}$, jis 3,34 % didesnis nei antiradikalinis aktyvumas Varėnoje. Antras pagal stiprumą aktyvumas nustatytas Puvociai kaime – $114,94 \pm 6,18$ $\mu\text{mol TE/g}$ ir Mančiagirėje – $106,52 \pm 1,59$ $\mu\text{mol TE/g}$. Mažiausias redukcinis aktyvumas nustatytas Žiūrų kaime – $42,80 \pm 5,93$ $\mu\text{mol TE/g}$, Senojoje Varėnoje – $59,34 \pm 2,30$ $\mu\text{mol TE/g}$ ir Dubininke – $60,34 \pm 2,53$ $\mu\text{mol TE/g}$. Antiradikalinis aktyvumas lapų augalinėje žaliavoje įvairuoja nuo – $55,25 \pm 8,87$ $\mu\text{mol TE/g}$ iki $146,13 \pm 14,45$ $\mu\text{mol TE/g}$. Stipriausias ABTS metodu įvertintas antiradikalinis aktyvumas lapų ėminiuose yra Varėnoje – $146,13 \pm 14,45$ $\mu\text{mol TE/g}$, Merkinėje – $111,27 \pm 2,86$ $\mu\text{mol TE/g}$ ir Kašėtose – $106,75 \pm 5,25$ $\mu\text{mol TE/g}$. Silpniausias ABTS metodu įvertintas antiradikalinis aktyvumas nustatytas ištyrus Žiūruose augančius karčiųjų kiečių lapus – $55,25 \pm 8,87$ $\mu\text{mol TE/g}$, jis 22,5 % didesnis nei redukcinis aktyvumas. Antras pagal silpnumą gautas aktyvumas Milioniškių – $63,88 \pm 16,50$ $\mu\text{mol TE/g}$ bei Gudelių – $66,23 \pm 4,39$ $\mu\text{mol TE/g}$ kaime. Mažiausias fenolinių junginių kiekis užfiksuotas Žiūrų kaime augančioje lapų žaliavoje, atitinkamai FRAP ir ABTS metodais nustatytas silpniausias antioksidacinis aktyvumas yra Žiūruose. Vienas iš didžiausių fenolinių junginių kiekių bei stipriausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas Varėnos kaime.



23 pav. Antioksidacinis aktyvumas ($\mu\text{mol/g}$) *A. absinthium* L. žiedų ėminiuose, skirtinguose augalo augavietėse; skirtingos raidės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų karčiųjų kiečių ėminių ekstraktų ($p < 0,05$)

23 paveiksle pavaizduoti antioksidacinio aktyvumo rezultatai ištyrus *A. absinthium* žiedų ekstraktus. Redukcinio aktyvumo, nustatyto FRAP metodu, stiprumas *A. absinthium* žieduose varijuoja nuo $37,03 \pm 0,44 \mu\text{mol TE/g}$ iki $133,72 \pm 9,13 \mu\text{mol TE/g}$. Antiradikalinio aktyvumo, nustatyto ABTS metodu, stiprumas žieduose įvairuoja nuo $48,68 \pm 3,38 \mu\text{mol TE/g}$ iki $145,33 \pm 6,98 \mu\text{mol TE/g}$. Didžiausias redukcinis ir antiradikalinis aktyvumas nustatytas Dzūkijoje esančiame Žiūrų kaime augančiuose žieduose atitinkamai $133,72 \pm 9,13 \mu\text{mol TE/g}$ ir $145,33 \pm 6,98 \mu\text{mol TE/g}$. Šioje vietoje augančiuose žieduose užfiksuotas ir vienas iš didžiausių fenolinių junginių kiekių. Perlojos kaime nustatytas ne tik mažiausias fenolinių junginių kiekis, bet ir silpniausias antioksidacinis aktyvumas, nustatytas FRAP ir ABTS metodu ištyrus karčiųjų kiečių žiedus, atitinkamai $37,03 \pm 0,44 \mu\text{mol TE/g}$ ir $48,68 \pm 3,38 \mu\text{mol TE/g}$.

24 paveiksle pateikti rezultatai, kuriuose įvertintas redukcinis ir antiradikalinis aktyvumas žolėje.

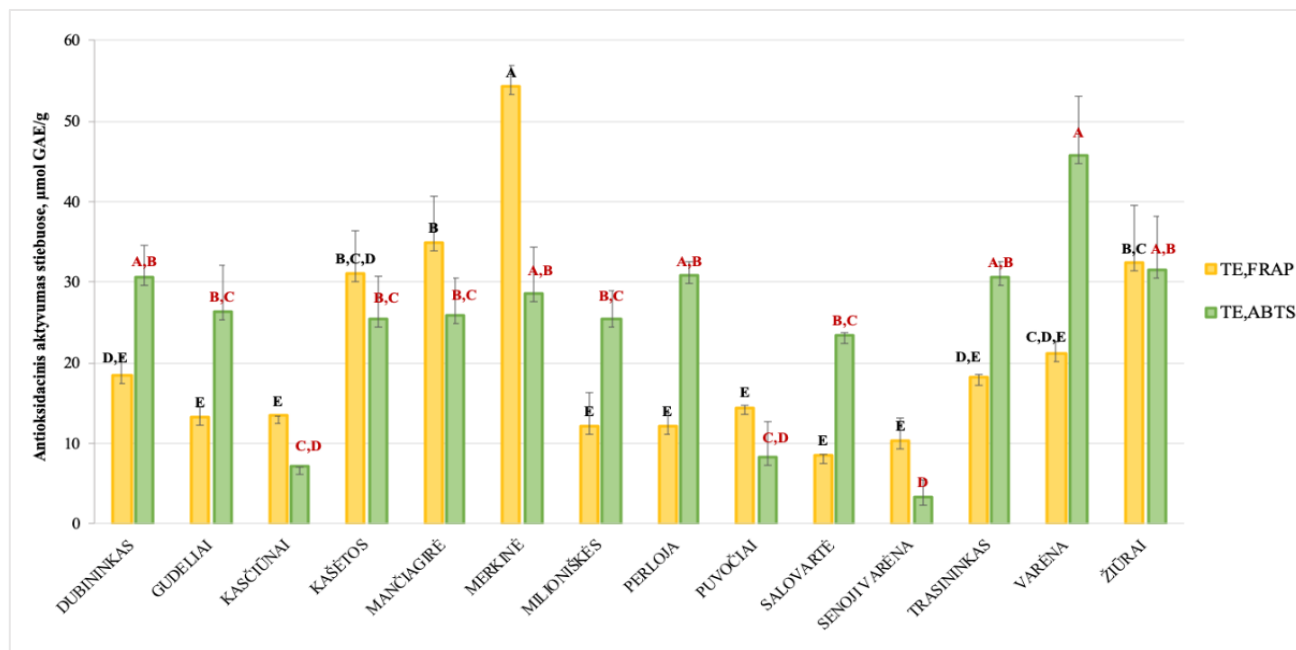


24 pav. Antioksidacinis aktyvumas ($\mu\text{mol/g}$) *A. absinthium* L. žolės ėminiuose, skirtinguose augalo augavietėse; skirtingos raidės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų karčiųjų kiečių ėminių ekstraktų ($p < 0,05$)

Žolės ėminiuose stipriausias redukcinis ir antiradikalinis aktyvumas nustatytas Kašėtų kaime atitinkamai $108,09 \pm 2,55 \mu\text{mol TE/g}$ ir $170,57 \pm 5,85 \mu\text{mol TE/g}$. Antiradikalinis aktyvumas yra 36,63 % didesnis nei redukcinis aktyvumas Kašėtose augančioje žolėje. Atitinkamai stiprus redukcinis ir antiradikalinis aktyvumas yra Trasininkuose – $99,94 \pm 8,34 \mu\text{mol TE/g}$ ir $102,83 \pm 0,09 \mu\text{mol TE/g}$ bei Varėnoje – $77,92 \pm 6,75 \mu\text{mol TE/g}$ ir $91,02 \pm 2,31 \mu\text{mol TE/g}$. Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis taip pat ištirtas Kašėtose ir Trasininkuose. Dubininkuose, Žiūruose ir Gudeliuose yra ne tik mažiausias bendras fenolinių junginių kiekis, bet ir silpniausias FRAP metodu įvertintas redukcinis aktyvumas Dubininkuose – $17,99 \pm 0,46 \mu\text{mol TE/g}$, Žiūruose – $30,70 \pm 3,32 \mu\text{mol TE/g}$ ir Gudelių kaime – $39,54 \pm 2,29 \mu\text{mol TE/g}$. ABTS metodu nustatytas antiradikalinis aktyvumas mažiausias yra Žiūruose – $33,11 \pm 0,98 \mu\text{mol TE/g}$, Mančiagirėje – $56,56 \pm 5,25 \mu\text{mol TE/g}$ ir Puvociuose – $57,97 \pm 6,8 \mu\text{mol TE/g}$.

25 paveiksle pavaizduotas antioksidacinis aktyvumas karčiųjų kiečių stiebų augalinėje žaliavoje. Reducinis aktyvumas karčiųjų kiečių stiebų ėminių ekstraktuose varijuoja nuo $8,47 \pm 0,1706 \mu\text{mol TE/g}$ iki $54,22 \pm 2,68 \mu\text{mol TE/g}$. Stipriausias redukcinis aktyvumas nustatytas Merkinėje augančiuose stiebuose – $54,22 \pm 2,68 \mu\text{mol TE/g}$, Mančiagirėje – $34,89 \pm 5,79 \mu\text{mol TE/g}$ ir Žiūruose – $32,35 \pm 7,18 \mu\text{mol TE/g}$. Antiradikalinis aktyvumas *A. absinthium* stiebuose įvairuoja nuo $3,31 \pm 2,18 \mu\text{mol TE/g}$ iki $45,73 \pm 7,30 \mu\text{mol TE/g}$. Didžiausias antiradikalinis aktyvumas ABTS metodu nustatytas ištyrus Varėnos – $45,73 \pm 7,30 \mu\text{mol TE/g}$, Žiūrų – $31,47 \pm 06,71 \mu\text{mol TE/g}$ ir Perlojos kaime – $30,76 \pm 1,87 \mu\text{mol TE/g}$ augančius stiebus. Dzūkijos regione esančiuose Salovartės, Senosios Varėnos ir Milioniškių kaimuose augančiuose stiebuose nustatytas ne tik mažiausias bendras fenolinių junginių

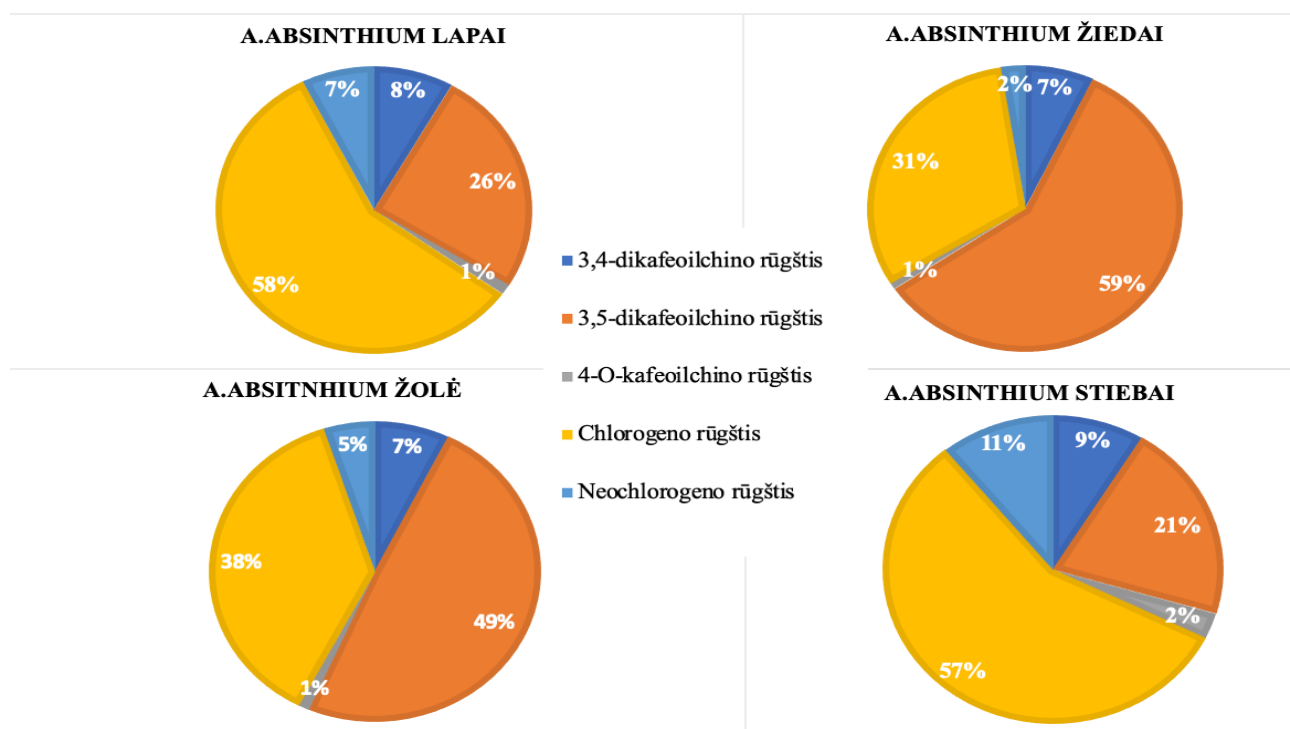
kiekis, bet ir įvertinus redukcinį aktyvumą jis šiuose kaimuose yra silpniausias – $8,47 \pm 0,17 \mu\text{mol TE/g}$, – $10,29 \pm 2,78 \mu\text{mol TE/g}$, – $12,13 \pm 4,09 \mu\text{mol TE/g}$. Silpniausias antiradikalinis aktyvumas įvertinus karčiųjų kiečių stiebus yra Senojoje Varėnoje – $3,31 \pm 2,18 \mu\text{mol TE/g}$, taip pat nustatyta ir mažiausiai fenolinių junginių.



25 pav. Antioksidacinis aktyvumas ($\mu\text{mol/g}$) *A. absinthium L.* stiebų ėminiuose, skirtinguose augalo augavietėse; skirtingos raidės žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp tirtų karčiųjų kiečių ėminių ekstraktų ($p < 0,05$)

3.4. Individualių fenolinių junginių kitimas skirtinguose augalo organuose

Karčiųjų kiečių (*A. absinthium L.*) vaistinėje augalinėje žaliavoje buvo nustatyti individualūs fenoliniai junginiai skirtinguose morfologinėse augalo dalyse: lapuose, žieduose, žolėje ir stiebuose ESC metodu. Visose tirtose karčiųjų kiečių etanolinėse ištraukose identifikuoti 5 fenoliniai junginiai: 3,4-dikafeoilchino rūgštis, 3,5-dikafeoilchino rūgštis, 4-O-kafeoilchino rūgštis, chlorogeno rūgštis ir neochlorogeno rūgštis. Individualių fenolinių junginių procentinės dalies įvertinimas pavaizduotas 26 paveiksle.



26 pav. Individualių fenolinių junginių procentinės dalies įvertinimas *A. Absinthium* lapuose, žieduose, žolėje, stiebuose

Didžiausia procentinė dalis *A. absinthium* žaliavoje nustatyta 3,5-dikafeoilchino rūgšties nuo 21-59 %. Šios rūgšties daugiausiai nustatyta žieduose 59 % ($p < 0,05$) ir žolėje 49 % ($p < 0,05$). Atitinkamai panašus kiekis ištirtas chlorogeno rūgšties: 31 – 58 % ($p < 0,05$). Didžiausia chlorogeno rūgšties procentinė dalis nustatyta karčiųjų kiečių lapuose 58 % ir stiebuose 57 % ($p < 0,05$). Mažiausia procentinė dalis visuose augalo organuose vos 1 – 2 % ($p < 0,05$) yra 4-O-kafeoilchino rūgšties.

Vidutiniškai karčiųjų kiečių ekstraktų ėminiuose daugiausiai randama 3,5-dikafeoilchino rūgšties – $3225,361 \pm 233,84 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$). Jos kiekis augalo organuose varijuoja nuo $439,507 \pm 54,17 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$, stiebuose) iki $6769,923 \pm 478,71 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$, lapuose). 3 lentelėje pavaizduoti fenolinių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties įvairavimo rezultatai skirtinguose morfologinėse karčiųjų kiečių dalių ėminiuose: lapuose, žieduose, žolėje, stiebuose.

3 lentelė. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties įvairavimas skirtinguose karčiųjų kiečių žaliavų dalių ėminiuose: lapuose, žieduose, žolėje, stiebuose ($p < 0,05$)

Augalo dalis Junginys $\mu\text{g/g}$	Lapai	Žiedai	Žolė	Stiebai
3,4-dikafeoilchino rūgštis, $\mu\text{g/g}$	727,80±51,46 ^b	815,00±57,63 ^a	509,42±36,02 ^c	184,02±13,01 ^d
3,5-dikafeoilchino rūgštis, $\mu\text{g/g}$	2262,86±160,01 ^c	6769,92±478,71 ^a	3429,14±242,48 ^b	439,50±54,17 ^d
4-O-kafeoilchino rūgštis, $\mu\text{g/g}$	103,95±7,35 ^a	86,26±6,10 ^b	77,82±5,50 ^c	57,47±4,06 ^d
Chlorogeno rūgštis, $\mu\text{g/g}$	5110,12±361,34 ^a	3624,67±256,30 ^b	2609,42±184,51 ^c	1196,33±84,59 ^d
Neochlorogeno rūgštis, $\mu\text{g/g}$	654,23±49,23 ^a	280,44±19,83 ^c	346,55±24,51 ^b	229,44±16,22 ^d
Suminis kiekis	8858,97	11576,31	6662,42	2106,75

Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistškai reikšmingus individualių fenolinių junginių kiekių skirtumus tarp ištirtų karčiųjų kiečių skirtingų augalo dalių ėminių ($p < 0,05$)

Didžiausias 3,4-dikafeoilchino rūgšties kiekis ESC metodu nustatytas *A. absinthium* žieduose $815,008 \pm 57,63 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$), jis 10,7 % didesnis nei lapuose $727,80 \pm 51,46 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$). 4-O-kafeoilchino rūgšties daugiausia nustatyta ištyrus lapų ir žiedų augalinę žaliavą – $103,95 \pm 7,35 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$) ir $86,26 \pm 6,10 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$). Chlorogeno ir neochlorogeno rūgšties didžiausias kiekis taip pat randamas lapuose ir žieduose ($5110,12 \pm 361,34 \mu\text{g/g}$ ir $3624,67 \pm 256,30 \mu\text{g/g}$, $p < 0,05$); ($654,23 \pm 49,23 \mu\text{g/g}$ ir $280,44 \pm 19,83 \mu\text{g/g}$, $p < 0,05$). Visų ESC metodu nustatytų individualių fenolinių junginių: 3,4-dikafeoilchino rūgšties, 3,5-dikafeoilchino rūgšties, 4-O-kafeoilchino rūgšties, chlorogeno rūgšties ir neochlorogeno rūgšties mažiausias kiekis yra ištirtas karčiųjų kiečių stiebuose ($184,02 \pm 13,01 \mu\text{g/g}$, $439,50 \pm 54,17 \mu\text{g/g}$, $57,47 \pm 4,06 \mu\text{g/g}$, $1196,30 \pm 84,59 \mu\text{g/g}$, $229,44 \pm 16,22 \mu\text{g/g}$, $p < 0,05$).

Didžiausias suminis identifikuotų fenolinių junginių kiekis nustatytas *A. absinthium* žieduose $11576,31 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$) ir lapuose $8858,97 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$). Kiekis žieduose 23,47 % didesnis nei lapuose. Mažiausias bendras ištirtų junginių kiekis aptiktas stiebuose – $2106,75 \mu\text{g/g}$ ($p < 0,05$).

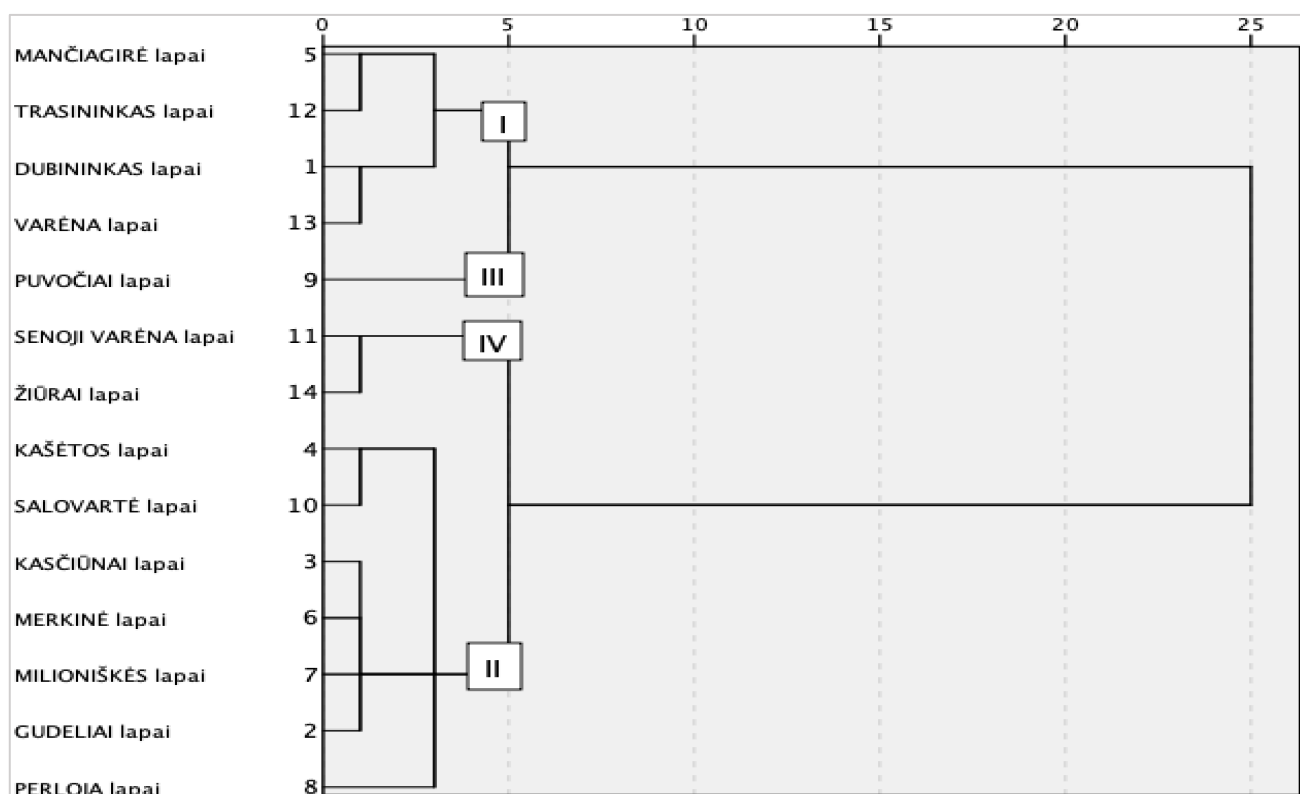
Remiantis Spirmeno koreliacijos koeficientu, nustatyti koreliacijos ryšiai tarp antioksidacinio aktyvumo ir individualių fenolinių junginių. Stiprus koreliacijos ryšys nustatytas tarp redukcinio aktyvumo ir 3,4-dikafeoilchino rūgšties ($r=0,792$), 3,5-dikafeoilchino rūgšties ($r=0,756$) ir chlorogeno rūgšties ($r=0,816$). Stiprus antiradikalinis ryšys atitinkamai nustatytas tarp 3,4-dikafeoilchino rūgšties ($r=0,827$), 3,5-dikafeoilchino rūgšties ($r=0,819$) ir chlorogeno rūgšties ($r=0,769$). Vidutinis koreliacijos ryšys įvertintas tarp antioksidacinio aktyvumo ir neochlorogeno rūgšties ($r=0,605$; $r=0,58$). Silpnas koreliacijos ryšys įvertintas tarp redukcinio aktyvumo ir 4-O-kafeoilchino rūgšties ($r=0,407$) bei antiradikalinio aktyvumo ir 4-O-kafeoilchino rūgšties ($r=0,458$).

Msaada ir kt., ištyrė Tuniso skirtinguose regionuose augančias karčiųjų kiečių žaliavas. Žaliava buvo rinkta masinio žydėjimo metu. Tyrėjai nustatė: chlorogeno rūgštis, kuriose randama $3,36 \pm 0,42$ $\mu\text{g/g}$ ir 4-O-kafeoilchino rūgštis $2,35 \pm 0,25$ $\mu\text{g/g}$ [7]. Turkijoje atliktame tyrime ESC metodu nustatyta chlorogeno rūgšties – $5720,0 \pm 110,0$ $\mu\text{g/g}$, jos kiekis panašus ir mūsų bandyme ištirtuose karčiųjų kiečių lapuose [12]. Rumunijoje moksliniame tyrime teigiama, kad chlorogeno rūgšties jų regionuose yra rasta $77,01 \pm 40$ $\mu\text{g/g}$ [11]. Prancūzų tyrėjai lygindami skirtingas Asteraceae augalų rūšis ištyrė, kad *A. absinthium* žaliavoje chlorogeno rūgšties yra – $6370,0 \pm 310,0$ $\mu\text{g/g}$, o 3,5-dikafeoilchino rūgšties – $22140,0 \pm 110,0$ $\mu\text{g/g}$. Atsižvelgiant į geografinę padėtį individualių junginių kiekybinė ir kokybinė sudėtis labai skirtinga ir įvairiai pasiskirsčiusi. Tam įtakos galėjo turėti skirtingas dirvožemis, saulės spinduliuotė, geografinė padėtis. Taip pat šiuose tyrimuose buvo nustatyta ir kitų junginių, kurie mūsų tyrime nebuvo nustatyti: tanino rūgštis, vanilino rūgštis, ferulo rūgštis, rosmarino rūgštis [7, 11, 12].

3.4.1. Karčiuosiuose kiečiuose nustatytų individualių fenolinių junginių kitimas, skirtingose morfologinėse augalo dalyse, surinktose iš skirtingų augaviečių

Individualių fenolinių junginių pasiskirstymas *Artemisia absinthium* L. augalinių žaliavų: lapų, žiedų, stiebų ėminiuose, surinktuose iš įvairių Lietuvos vietų, pavaizduotas trijose skirtingose klasterinės analizės dendrogramose pritaikant hierarchinę klasterinę analizę.

27 pav. pavaizduota, fenolinių junginių kiekio pasiskirstymas lapuose pagal augavietes, klasterinės analizės dendrograma bei 4 lentelėje pateikti klasteriai ir identifikuotų junginių vidurkiai.



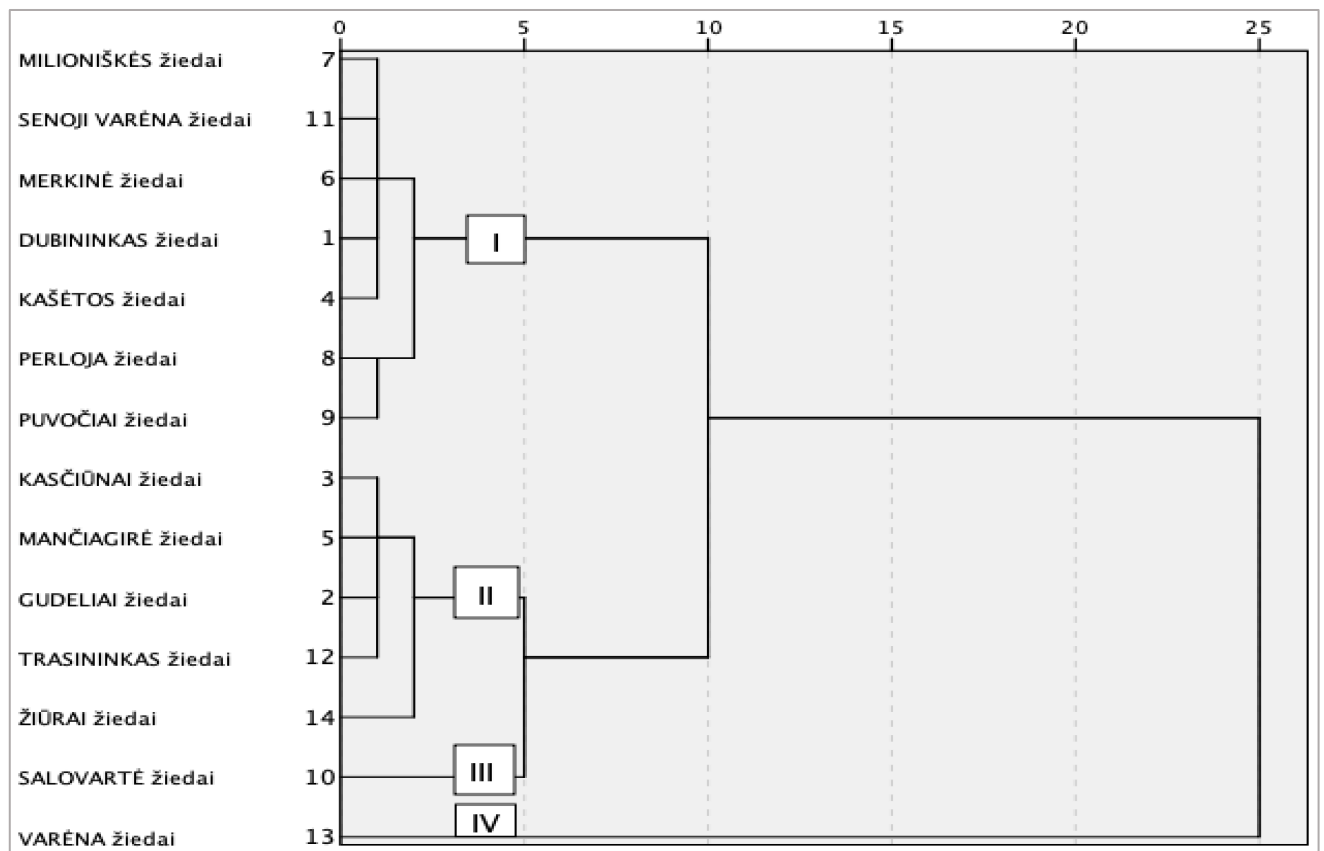
27 pav. ESC metodu nustatytų individualių fenolinių junginių kiekio pasiskirstymas *A. absinthium* lapuose pagal augvietes, klasterinės analizės dendrograma

4 lentelė. Lapuose nustatytų individualių fenolinių junginių ir jų klasterių vidurkiai

Klasteris	1	2	3	4
Junginys $\mu\text{g/g}$				
3,4-dikafeoilchino rūgštis	740,71 $\pm$ 153,18	887,65 $\pm$ 150,13	400,16 $\pm$ 28,30	306,33 $\pm$ 77,61
3,5-dikafeoilchino rūgštis	2495,62 $\pm$ 520,98	2667,94 $\pm$ 326,41	1317,60 $\pm$ 93,17	852,14 $\pm$ 15,21
4-O-kafeoilchino rūgštis	107,04 $\pm$ 55,15	117,39 $\pm$ 7,64	28,06 $\pm$ 1,98	88,69 $\pm$ 0,86
Chlorogeno rūgštis	9286,38 $\pm$ 290,73	3374,56 $\pm$ 274,92	7066,99 $\pm$ 499,71	1853,62 $\pm$ 585,12
Neochlorogeno rūgštis	775,33 $\pm$ 34,69	632,91 $\pm$ 61,89	673,52 $\pm$ 47,63	477,0217 $\pm$ 2210,42

Pritaikius klasterinę analizę nubraižytoje karčiųjų kiečių lapų dendrogramoje gaunami keturi skirtingi klasteriai, į kuriuos suskirstytos žaliavų augavietės. Pirmajam klasteriui priklauso Mančiagirės km., Trasininkų km., Dubininkų km. ir Varėnos miestas. Jame vyraujantys fenoliniai junginiai yra chlorogeno ir neochlorogeno rūgštys. Antrajam klasteriui – Kašėtų km., Salovartės km., Kasčiūnų km., Merkinės km., Milioniškių km., Gudelių km. ir Perlojos km. Šiame klasteryje labiausiai vyrauja 3,4-dikafeoilchino rūgštis, 3,5-dikafeoilchino rūgštis, 4-O-kafeoilchino rūgštis. Trečiajam klasteriui priskiriama Puvočių kaimo augavietėje rinkta lapų žaliava. Ketvirtajam – Senojoje Varėnoje ir Žiūruose rinktos augalinės žaliavos.

28 pav. pavaizduota identifikuotų junginių karčiųjų kiečių žieduose pasiskirstymo pagal augavietes dendrograma. 5 lentelėje pateikti klasteriai ir identifikuotų junginių vidurkiai. Augavietės, kuriose buvo renkami žiedai, suskirstytos į keturis klasterius. Milioniškės, Senoji Varėna, Merkinė, Dubininkas, Kašėtos, Perloja ir Puvočiai priskiriami pirmajam klasteriui. Antrajam klasteriui priklauso Kasčiūnuose, Mančiagirėje, Gudeliuose, Trasininkuose ir Žiūruose rinkta žaliava. Salovartės km. rinkti žiedai priskiriami 3-ajam klasteriui, kuriame vyrauja 3,4-dikafeoilchino rūgštis. 4-O-kafeoilchino rūgštis, 3,5-dikafeoilchino rūgštis, chlorogeno ir neochlorogeno rūgštys vyrauja ketvirtajam klasteriui priklausančiame Varėnos mieste.

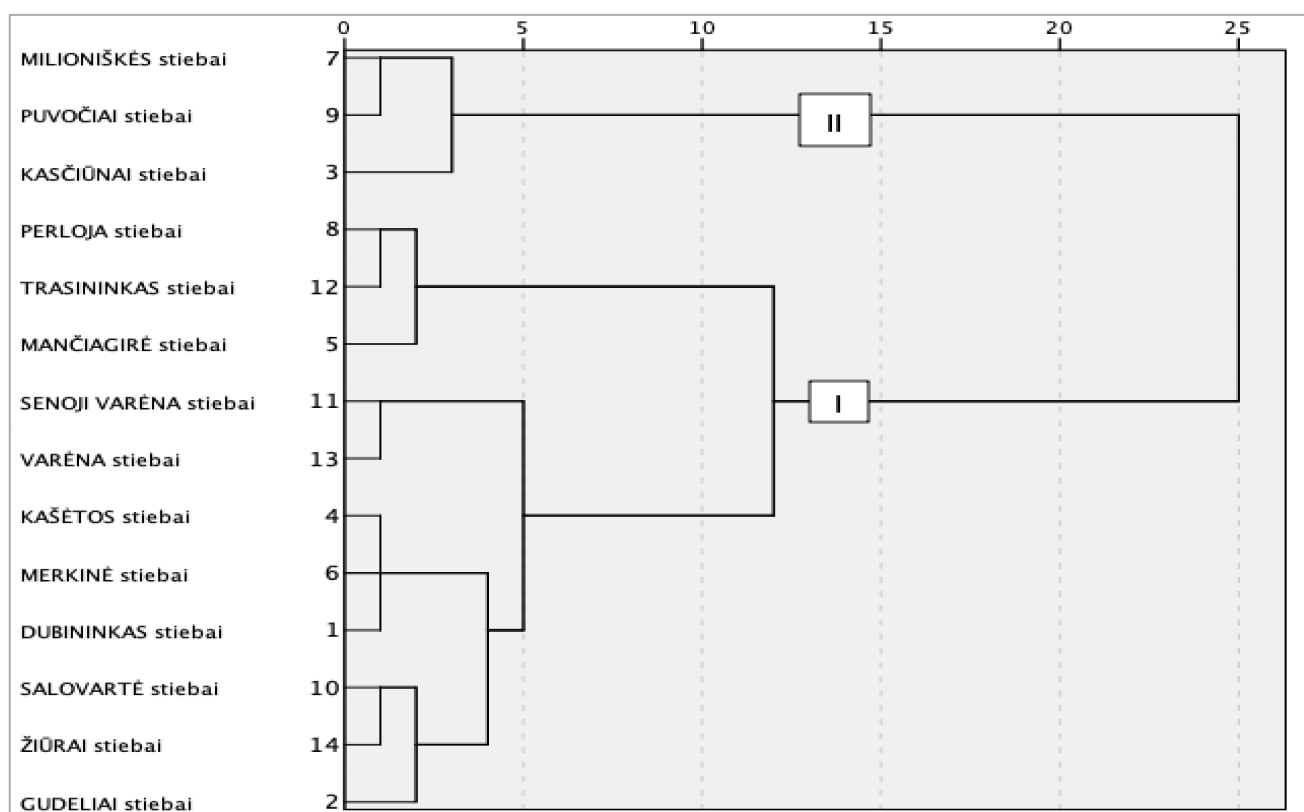


27 pav. ESC metodu nustatytų individualių fenolinių junginių kiekio pasiskirstymas *A. absinthium* žieduose pagal augavietes, klasterinės analizės dendrograma

5 lentelė. Žieduose nustatytų individualių fenolinių junginių ir jų klasterių vidurkiai

Klasteris Junginys $\mu\text{g/g}$	1	2	3	4
3,4-dikafeoilchino rūgštis	611,30±40,31	959,40±49,35	997,70±70,55	133,23±94,49
3,5-dikafeoilchino rūgštis	4642,27±368,19	7894,22±350,51	11136,95±787,50	11674,95±825,54
4-O-kafeoilchino rūgštis	79,40±6,40	91,45±15,96	78,07±5,52	116,47±8,24
Chlorogeno rūgštis	2113,73±272,79	4510,23±282,58	4827,37±341,35	8570,76±606,04
Neochlorogeno rūgštis	262,38±11,04	280,12±24,01	305,98±21,64	382,93±27,08

28 pav. sudaryta identifikuotų junginių karčiųjų kiečių stiebuose pasiskirstymo pagal augavietes dendrograma bei 6 lentelėje pateikti klasteriai ir identifikuotų junginių vidurkiai. Pirmajam klasteriui priklauso Perlojos km., Trasininkų km., Mančiagirės km., Senosios Varėnos km., Varėnos miestas, Kašėtų km., Dubininkų km., Salovartės km., Žiūrų km. ir Gudelių km. Pirmajame klasteryje vyrauja visi stiebuose identifikuoti fenoliniai junginiai, tokie kaip, 3,4-dikafeoilchino ir 3,5-dikafeoilchino rūgštys, 4-O-kafeoilchino rūgštis, chlorogeno ir neochlorogeno rūgštys. Milioniškių km., Puvočių km. ir Kasčiūnų km. priskiriami antrajam klasteriui.



28 pav. ESC metodu nustatytų individualių fenolinių junginių kiekio pasiskirstymas *A. absinthium* stiebuose pagal augavietes, klasterinės analizės dendrograma

6 lentelė. Stiebuose nustatytų individualių fenolinių junginių ir jų klasterių vidurkiai

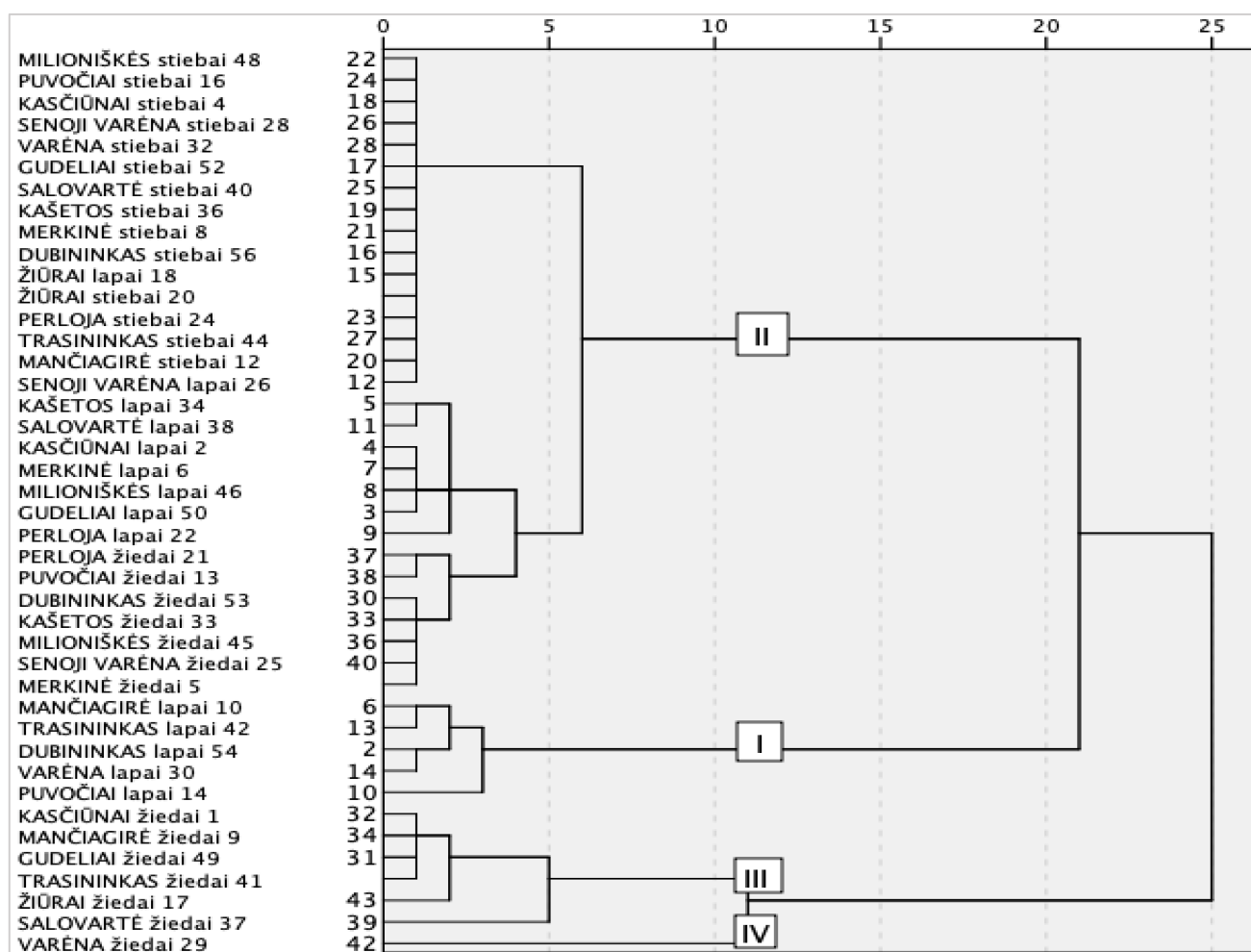
Klasteris	1	2
Junginys $\mu\text{g/g}$		
3,4-dikafeoilchino rūgštis	219,22±46,34	54,95±4,59
3,5-dikafeoilchino rūgštis	510,75±61,45	178,27±31,96
4-O-kafeoilchino rūgštis	62,76±4,41	38,08±2,67
Chlorogeno rūgštis	1435,96±119,89	317,54±139,14
Neochlorogeno rūgštis	238,79±7,39	195,12±43,26

29 pav. nubraižyta bendra individualių fenolinių junginių klasterinės analizės dendrograma. 7 lentelėje pateikti bendri fenolinių junginių ir jų klasterių vidurkiai. Nustatyti keturi skirtingi klasteriai.

Pirmajam klasteriui priklauso Dubininkuose, Mančiagirėje, Puvočiuose, Trasininke ir Varėnoje rinkti karčiųjų kėčių lapai. Antrajam klasteriui priskiriamos augavietės, tokios kaip, Kašėtos, Merkinėje, Milioniškėse, Perlojoje, Senojoje Varėnoje rinkti stiebai, lapai ir žiedai. Gudeliuose, Kasčiūnuose, Salovartėje ir Žiūruose rinkti lapai ir stiebai. Puvočiuose ir Dubininke – stiebai ir žiedai. Mančiagirėje, Trasininkuose ir Varėnoje rinkti stiebai. Trečiajame klasteryje yra Gudeliuose, Kasčiūnuose, Mančiagirėje, Salovartėje, Trasininkuose ir Žiūruose rinkti žiedai. Ketvirtajam klasteriui priklauso Varėnos mieste rinkti žiedai. Pirmajame klasteryje vyrauja chlorogeno rūgštis ir neochlorogeno rūgštis. Ketvirtajame 3,4-dikafeoilchino rūgštis, 3,5-dikafeoilchino rūgštis ir 4-O-kafeoilchino rūgštis.

7 lentelė. Bendri nustatytų individualių fenolinių junginių ir jų klasterių vidurkiai

Klasteris Junginys $\mu\text{g/g}$	1	2	3	4
3,4-dikafeoilchino rūgštis	672,59±136,81	456,05±66,78	965,79±40,79	1336,22±94,49
3,5-dikafeoilchino rūgštis	2260,03±467,28	1967,63±338,25	8434,68±611,55	11674,95±825,54
4-O-kafeoilchino rūgštis	91,24±45,55	78,65±5,33	89,22±13,22	116,47±8,24
Chlorogeno rūgštis	8842,50±497,73	1962,45±197,66	4563,09±236,70	8570,76±606,04
Neochlorogeno rūgštis	754,97±33,71	347,77±35,97	284,43±20,07	382,93±27,08



29 pav. ESC metodu nustatytų individualių fenolinių junginių kiekio pasiskirstymas *A. absinthium* skirtinguose morfologiniuose organuose (lapuose, žieduose, stiebuose) pagal augavietes, klasterinės analizės dendrograma

3.5. Koreliacinių ryšių analizė

Tyrimo metu buvo nustatyti tarpusavio koreliacijos ryšiai vertinant karčiųjų kiečių (*A. absinthium* L.) augalines žaliavas tarp bendro fenolinių junginių kiekio ir identifikuotų individualių junginių (3,4-dikafeoilchino rūgšties, 3,5-dikafeoilchino rūgšties, 4-O-kafeoilchino rūgšties, chlorogeno rūgšties, neochlorogeno rūgšties) bei FRAP ir ABTS metodais nustatyto antioksidacinio aktyvumo. Koreliacijų koeficientai apskaičiuoti taikant Spirmano (*Spearman*) koreliaciją. Koreliacinių ryšių analizė ir koeficientai pavaizduoti 4 lentelėje.

4 lentelė. Karčiųjų kiečių augalinių žaliavų individualių junginių ir jų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo Spirmano koreliacijos koeficientai ($p < 0,05$)

	Bendras fenolinių junginių kiekis, mg/g	FRAP, $\mu\text{mol/g}$	ABTS, $\mu\text{mol/g}$	3,4-dikafeoilchino rūgšties kiekis, $\mu\text{g/g}$	3,5-dikafeoilchino rūgšties kiekis, $\mu\text{g/g}$	4-O-kafeoilchino rūgšties kiekis, $\mu\text{g/g}$	Chlorogeno rūgšties kiekis, $\mu\text{g/g}$	Neochlorogeno rūgšties kiekis, $\mu\text{g/g}$
Bendras fenolinių junginių kiekis, (mg/g)	1	0,917	0,897	0,852	0,803	0,422	0,816	0,618
FRAP, ($\mu\text{mol/g}$)	0,917	1	0,899	0,792	0,756	0,407	0,814	0,605
ABTS, ($\mu\text{mol/g}$)	0,897	0,899	1	0,827	0,819	0,458	0,769	0,581

Silpniausias koreliacijos ryšys nustatytas tarp 4-O-kafeoilchino rūgšties ir bendro fenolinių junginių kiekio ($r=0,422$), tarp redukcinio aktyvumo ir 4-O-kafeoilchino rūgšties ($r=0,407$) bei antiradikalinio aktyvumo ir 4-O-kafeoilchino rūgšties ($r=0,458$). Stiprūs tarpusavio koreliacijos ryšiai nustatyti tarp bendro fenolinių junginių kiekio ir redukcinio aktyvumo ($r=0,917$), antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo ($r=0,899$) bei bendro fenolinių junginių kiekio ir antiradikalinio aktyvumo ($r=0,897$). Visos koreliacijos yra statistiškai reikšmingos. Apibendrinant galima teigti, kad antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo bendro fenolinių junginių kiekio bei individualių fenolinių junginių, tokių kaip 3,4-dikafeoilchino rūgšties, 3,5-dikafeoilchino rūgšties ir chlorogeno rūgšties vaistinėje augalinėje žaliavoje.

3.6. Tyrimų rezultatų apibendrinimas

Parinktas tinkamas tirpiklis augalinės žaliavos ekstrakcijai atlikti, kuris užtikrina maksimalių fenolinių junginių išeigą. Nustatyta, kad didžiausia fenolinių junginių išeiga gaunama naudojant 70 % koncentracijos etanolį.

Apibendrinant tyrimų rezultatus galime teigti, kad didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis skirtingose morfologinėse karčiųjų kiečių dalyse nustatytas – žieduose, o mažiausias – stiebuose. Atitinkamai stipriausias redukcinis ir antiradikalinis aktyvumas yra gautas – žieduose, o silpniausias – stiebuose. Todėl vertingiausia karčiųjų kiečių žaliava, kurią rekomenduojama rinkti Lietuvoje, yra žiedai. Įvertinus bendrą fenolinių junginių kiekį Dzūkijos regiono skirtingose augavietėse rinktų karčiųjų kiečių žaliavų, įverčiai varijuoja plačiose ribose. Tam įtakos galėjo turėti skirtinga natūrali augavietė, saulės šviesa, drėgmė, dirvožemis bei temperatūra.

Ištyrus individualių fenolinių junginių kiekį karčiųjų kiečių etanolinėse ištraukose ESC metodu, buvo identifikuotos penkios skirtingos rūgštys: 3,4-dikafeoilchino rūgštis, 3,5-dikafeoilchino rūgštis, 4-O-kafeoilchino rūgštis, chlorogeno rūgštis ir neochlorogeno rūgštis. Dominuojantys junginiai skirtingose morfologinėse dalyse nustatyti: 3,5-dikafeoilchino ir chlorogeno rūgštys. Žieduose ir žolėje didžiausia procentinė dalis buvo nustatyta – 3,5-dikafeoilchino rūgštis, o lapuose ir stiebuose – chlorogeno rūgštis.

Įvertinus koreliacinius ryšius pagal Spirmeno koreliacijos koeficientą, silpniausias koreliacijos ryšys nustatytas tarp 4-O-kafeoilchino rūgštis ir bendro fenolinių junginių kiekio. Stiprūs tarpusavio koreliacijos ryšiai nustatyti tarp bendro fenolinių junginių kiekio ir redukcinio aktyvumo, antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo bei bendro fenolinių junginių kiekio ir antiradikalinio aktyvumo. Todėl galima teigti, kad antioksidacinis aktyvumas karčiųjų kiečių skirtingose morfologinėse dalyse priklauso nuo suminio fenolinių junginių kiekio.

4. IŠVADOS

1. Didžiausias fenolinių junginių kiekis ($173,49 \pm 5,82$ mg GRE/g) nustatytas vaistinės augalinės žaliavos ekstraktuose ekstrahentu naudojant 70% (V/V) etanolį.
2. Lietuvoje natūraliai augančių karčiųjų kiečių (*A. absinthium* L.) žaliavose vidutiniškai nustatyta $23,90 \pm 0,49$ mg GRE/g fenolinių junginių. Daugiausia fenolinių junginių nustatyta karčiųjų kiečių žieduose – $29,97 \pm 0,79$ mg GRE/g ($p < 0,05$). Mažiausia fenolinių junginių išeiga gauta stiebų ėminiuose – $13,99 \pm 0,27$ mg GRE/g ($p < 0,05$). Apskaičiavus variacijos koeficientus, fenolinių junginių kiekybinės sudėties įvairavimui įvertinti tarp skirtingų augaviečių, nustatyta kad lapų cheminė sudėtis yra stabiliausia augaviečių atžvilgiu ($CV = 1,93$ proc.).
3. FRAP metodu nustatytas vidutinis redukcinis aktyvumas yra – $63,93 \pm 3,78$ μ mol TE/g, o ABTS metodu įvertintas antiradikalinis – $72,77 \pm 11,07$ μ mol TE/g. Stipriausias redukcinis ir antiradikalinis aktyvumas yra *A. absinthium* žieduose – $87,23 \pm 4,87$ μ mol TE/g, $100,73 \pm 3,95$ μ mol TE/g. Mažiausias redukcinis ir antiradikalinis aktyvumas nustatytas stiebuose – $21,03 \pm 2,53$ μ mol TE/g, $24,49 \pm 4,12$ μ mol TE/g. Apskaičiavus antioksidacinio aktyvumo variacijos koeficientus nustatyta, kad mažiausias redukcinio aktyvumo koeficientas lapuose, jis siekia 4,92 proc., antiradikalinio aktyvumo – žieduose ($CV = 4,23$ proc.).
4. Visose tirtose karčiųjų kiečių etanolinėse ištraukose identifikuotos skirtingos rūgštys: 3,4-dikafeoilchino rūgštis, 3,5-dikafeoilchino rūgštis, 4-O-kafeoilchino rūgštis, chlorogeno rūgštis ir neochlorogeno rūgštis. Didžiausias suminis identifikuotų fenolinių junginių kiekis, nustatytas *A. absinthium* žieduose $11576,31$ μ g/g ($p < 0,05$) ir lapuose $8858,97$ μ g/g ($p < 0,05$). Mažiausias bendras ištirtų junginių kiekis aptiktas stiebuose – $2106,75$ μ g/g ($p < 0,05$). Dominuojantys junginiai karčiųjų kiečių ėminiuose nustatyti 3,5-dikafeoilchino rūgštis ir chlorogeno rūgštis. Šios rūgštys galėtų būti panaudotos kaip fitocheminiai ir antioksidantiniai žymenys.
5. Atlikus klasterinę hierarchinę analizę ir nubraižius bendrą fenolinių junginių dendrogramą, nustatyti lapų, žiedų ir stiebų klasteriuose dominuojantys junginiai, kurie gali būti panaudoti kaip analitiniai žymenys. Pirmajame klasteryje vyrauja chlorogeno rūgštis ir neochlorogeno rūgštis. Ketvirtajame 3,4-dikafeoilchino ir 3,5-dikafeoilchino rūgštys, 4-O-kafeoilchino rūgštis.

5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Vaistinės augalinės žaliavos ekstrakcijai atlikti rekomenduojama naudoti 70% (V/V) etanolinį ekstrakcijos tirpiklį. Tyrimo metu nustatčius bendrą fenolinių junginių kiekį, antioksidacinį aktyvumą ir identifikavus individualius fenolinius junginius karčiąjų kiečių etanolinėse ištraukose, rekomenduojama masinio žydėjimo metu rinkti karčiąjų kiečių (*A. absinthium* L.) žiedus ir lapus. 3,5-dikafeoilchino rūgštis ir chlorogeno rūgštis gali būti panaudotos kaip analitiniai žymenys karčiąjų kiečių vaistinės augalinės žaliavos kokybės užtikrinimo ir kokybės kontrolės tyrimuose.

Tolimesniuose tyrimuose būtų tikslinga ištirti, kaip kinta fenolinių junginių kiekis ir antioksidacinis aktyvumas vegetacijos laikotarpiu.

6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Kreitschitz A, Vallès J. Achene morphology and slime structure in some taxa of *Artemisia* L. and *Neopallasia* L. (Asteraceae). *Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants*. 2007 Sep; 28;202(7):570–80.
2. Judzentiene A, Tomi F, Casanova J. Analysis of essential oils of *Artemisia absinthium* L. from Lithuania by CC, GC(RI), GC-MS and ¹³C NMR. *Nat. Prod. Commun.* 2009 Aug;4(8):1113–8.
3. Llorens-Molina JA, Vacas S, Castell V, Németh-Zámboiné. Variability of essential oil composition of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) affected by plant organ. *J. Essent. Oil Res.* 2017 Jan 2;29(1):11–21.
4. Nguyen HT, Németh ZÉ. Sources of variability of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oil. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*. 2016 Dec 1;3(4):143–50.
5. Basta A, Tzakou O, Couladis M, Pavlović M. Chemical composition of *artemisia absinthium* L. from Greece. *J. Essent. Oil Res.* 2007 Jul 1;19(4):316–8.
6. Bhat RR, Rehman MU, Shabir A, Rahman Mir MU, Ahmad A, Khan R, et al. Chemical composition and biological uses of *Artemisia absinthium* (wormwood). In: *Plant and Human Health*, Volume 3 2019 (pp.37-63). Springer, Cham.
7. Msaada K, Salem N, Bachrouch O, Bousselmi S, Tammar S, Alfaify A, et al. Chemical Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Essential Oils and Phenolics. *J. Chem.* 2015;2015
8. Singh R, Kumar Verma P, Singh G. Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 2012;1(2):101–4.
9. Mahmoudi M, Ansaroudi F, Nabavi SF, Nabavi SM. Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. *African J. Biotechnol.* 2009;8(24):7170–5.
10. Vlase L, Apetrei CL, Ivanescu B, Lungu C, Corciova A. HPLC analysis of phenolic compounds from *Artemisia* species. *Eur. Chem. Bull.* 2016 May 22;5:119-23.
11. Craciunescu O, Constantin D, Gaspar A, Toma L, Utoiu E, Moldovan L. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chem. Cent. J.* 2012 Dec 1;6(1):97.
12. Şahin S, Aybastier Ö, Işık E. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. *Food Chem.* 2013 Nov 15;141(2):1361–8.
13. Bora KS, Sharma A. Evaluation of antioxidant and free-radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. *Pharm. Biol.* 2011 Dec 15 1;49(12):1216–23.
14. Judzentiene A, Budiene J, Giricyte R, Masotti V, Laffont-Schwob I, Laffont I, et al. Toxic

Activity and Chemical Composition of Lithuanian Wormwood (*Artemisia absinthium* L.)
Essential Oils. 2012

15. Judzentiene A, Budiene J. Compositional variation in essential oils of wild *artemisia absinthium* from Lithuania. J. Essent. Oil-Bearing Plants. 2010 Jan 1;13(3):275–85.
16. Koul B, Taak P, Kumar A, Khatri T, Sanyal I. The Artemisia Genus: A Review on Traditional Uses, Phytochemical Constituents, Pharmacological Properties and Germplasm Conservation. J. Glycom. Lipidom. 2018;7:1-7.
17. Kryževičienė A, Šarūnaitė L, Stukonis V, Dabkevičius Z, Kadžiulienė Ž. Daugiamečių kiečių (*Artemisia vulgaris* L. ir *Artemisia dubia* Wall.) potencialo biokuro gamybai įvertinimas. Agric. Sci. 2010;17:1-2
18. Krebs S, Omer TN, Omer B. Wormwood (*Artemisia absinthium*) suppresses tumour necrosis factor alpha and accelerates healing in patients with Crohn's disease - A controlled clinical trial. Phytomedicine. 2010 Apr 1;17(5):305–9.
19. Vallès J, Garcia S, Hidalgo O, Martín J, Pellicer J, Sanz M, et al. Biology, Genome Evolution, Biotechnological Issues and Research Including Applied Perspectives in *Artemisia* (Asteraceae). In Advances in botanical research 2011 Jan 1 (Vo. 60, pp. 349–419). Academic Press.
20. Vilkonis KK. Lietuvos žaliasis rūbas. Šiauliai: Lututė; 2008.
21. Konowalik K, Kreitschitz A. Morphological and anatomical characteristics of *Artemisia absinthium* var. *absinthium* and its Polish endemic variety *A. absinthium* var. *calcigena*. Plant systematics and evolution. 2012 Aug 1;298(7):1325-36
22. Alexandrina CR, Sorin MZ, Constantin L, Andreea Daniela V, Sorina N. Studies Regarding The Growth Dynamics Of Some Species From Artemisia Genus Vol. XXIX, Fascicle: Environmental Protection. 2017.
23. Lachenmeier DW, Walch SG, Padosch SA, Kröner LU. Absinthe - A review. Vol. 46, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2006 Jun 1;46(5):365-77
24. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry.. 2011 Jun 15;126(4):1821-35.
25. Riahi L, Chograni H, Elferchichi M, Zaouali Y, Zoghalmi N, Mliki A. Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. Ind. Crops. Products. 2013 Apr 1;46:290–6.
26. Martins S, Mussatto SI, Martínez-Avila G, Montañez-Saenz J, Aguilar CN, Teixeira JA. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. Biotechnology Advances. 2011 May 1;29(3):365-73.
27. Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. Environ. Chem. Lett. 2006

- Aug 1;4(3):147.
28. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001 Oct 1;74(4):418–25.
 29. Akzhigitova Z, Baisetova A, Dyusebaeva M, Ye Y and Jenis J. Investigation of chemical constituents of *Artemisia absinthium*. *International J. Biol. Chem.* 2018 Aug 29;11(1):169-77
 30. Martín L, Mainar AM, González-Coloma A, Burillo J, Urieta JS. Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *J. Supercrit. Fluids.* 2011 Feb 1;56(1):64–71.
 31. Altunkaya A., Yıldırım B., K. Ekici ÖT. Determining essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of water Wormwood extracts. 2018
 32. Lachenmeier DW, Uebelacker M. Risk assessment of thujone in foods and medicines containing sage and wormwood - Evidence for a need of regulatory changes? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2010 Dec 1;58(3):437–43.
 33. Aberham A, Cicek SS, Schneider P, Stuppner H. Analysis of Sesquiterpene Lactones, Lignans, and Flavonoids in Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)–Mass Spectrometry, Reversed Phase HPLC, and HPLC–Solid Phase Extraction–Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.* 2010 Oct 27;58(20):10817–23.
 34. Poppenga RH. Herbal Medicine: Potential for Intoxication and Interactions With Conventional Drugs. *Clinical techniques in small animal practise.* 2002 Feb 1;17(1):8-18
 35. Leporatti ML, Ghedira K. Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2009 Dec;5(1):31.
 36. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006 Jan 1;99(1):191–203.
 37. Ghafoori H, Sariri R, Naghavi MR. Study of effect of extraction conditions on the biochemical composition and antioxidant activity of *Artemisia Absinthium* by HPLC NAD TLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2014 Jul 3;37(11):1558-67.
 38. Khoddami A, Wilkes M, Roberts T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules.* 2013 Feb;18(2):2328–75.
 39. Bessada SMF, Barreira JCM, Oliveira MBPP. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Ind. Crops Prod.* 2015 Dec. 15;76:604–15.
 40. Liu T ting, Wu H bin, Wu H bo, Zhang J. Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) as a promising nematicidal and antifungal agent: Chemical composition, comparison of extraction techniques and bioassay-guided isolation. *Ind. Crops Prod.* 2019 Jul 1;133:295–303.
 41. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products. Assessment report on

- Artemisia absinthium* L., herba. 2017 May 30. Prieiga per internetą: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-artemisia-absinthium-l-herba-revision-1_en.pdf
42. Blagojević P, Radulović N, Palić R, Stojanović G. Chemical Composition of the Essential Oils of Serbian Wild-Growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. J. Agric. Food Chem. 2006 Jun 28;54(13):4780–9.
 43. Parekh HS, Liu G, Wei MQ. A new dawn for the use of traditional Chinese medicine in cancer therapy. Mol. Cancer. 2009 Dec;8(1):21
 44. Bora, Kundan Singh and AS. Phytochemical and pharmacological potential of *Artemisia absinthium* Linn. and *Artemisia asiatica* Nakai: a review. J. Pharm. Res. 2010 Feb;3(2):325-8.
 45. Sengul M, Ercisli S, Yildiz H, Gungor N, Kavaz A, Çetin B. Antioxidant, Antimicrobial Activity and Total Phenolic Content within the Aerial Parts of *Artemisia absinthum*, *Artemisia santonicum* and *Saponaria officinalis*. Iranian J. Pharmaceut. Res. 2011;10(1):49.
 46. Canadanovic-Brunet JM, Djilas SM, Cetkovic GS, Tumbas VT. Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts. J. Sci. Food Agric. 2005 Jan 30;85(2):265–72.
 47. Çelik SE, Özyürek M, Güçlü K, Apak R. Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. Talanta. 2010 Jun 15;81(4–5):1300–9.
 49. Özgen U, Mavi A, Terzi Z, Coflkun M, Antioxidant activities and total phenolic compounds amount of some *Asteraceae* species. Turkish J. Pharm. Sci. 2004.
 49. Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. J. Anal. Biochem. 2012;01(01).
 51. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Vol. 21, Saudi Pharm. J. 2013 Apr 1;21(2):143-52.
 52. Raudonis R, Raudonė L, Janulis V VP. Antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo nustatymo metodai (apžvalga). Sodininkystė Ir Daržininkystė. 2012;31(3–4):15–35.
 53. Aberoumand A, Deokule SS. Comparison of Phenolic Compounds of Some Edible Plants of Iran and India. Pakistan J. Nutri. 2008;7(4):582–5.
 54. Pandey BP, Thapa R, Upreti A. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Artemisia vulgaris* and *Gaultheria fragrantissima* collected from Nepal. Asian Pac. J. Trop. Med. 2017 Oct 1;10(10):952–9.
 55. Barreira JC, Dias MI, Živković J, Stojkovic D, Soković M, Santos-Buelga C, et al. Phenolic profiling of *Veronica spp.* grown in mountain, urban and sandy soil environments. Food Chem. 2014 Nov 15;163:275-83.

56. Tariq U, Ali M, Abbasi BH. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 2014 Jan 5;130:264–71.