

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

MEDICINOS AKADEMIJA

FARMACIJOS FAKULTETAS

VAISTŲ CHEMIJOS KATEDRA

**MONIKA MATULAITYTĖ**

**ILGUOLINIŲ KULKŠNIŲ (*ASTRAGALUS CICER L.*) AUGALŲ FENOLINIŲ JUNGINIŲ IR  
ANTIOKSIDACINIO AKTYVUMO TYRIMAS**

**Magistro baigiamasis darbas**

**Darbo vadovas**

doc. dr Raimondas Benetis

KAUNAS, 2016

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

MEDICINOS AKADEMIJA

FARMACIJOS FAKULTETAS

VAISTŲ CHEMIJOS KATEDRA

**TVIRTINU:**

Farmacijos fakulteto dekanas prof. dr. Vitalis Briedis

**ILGUOLINIŲ KULKŠNIŲ (*ASTRAGALUS CICER L.*) AUGALŲ FENOLINIŲ JUNGINIŲ IR  
ANTIOKSIDACINIO AKTYVUMO TYRIMAS**

**Magistro baigiamasis darbas**

Darbo vadovas

doc. dr. Raimondas Benetis

Darbą atliko

Magistrantė

Monika Matulaitytė

Recenzentas

KAUNAS, 2016

## TURINYS

SANTRAUKA.....	5
SUMMARY .....	6
1. SANTRUMPOS.....	7
2. ĮVADAS .....	8
3. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI .....	10
4. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
4.1 Oksidacinis stresas .....	11
4.1.1 Laisvieji radikalai ir jų susidarymas organizme .....	11
4.1.2. Oksidacinio streso poveikis organizmui .....	13
4.2. Antioksidantai .....	14
4.2.1. Natūralūs antioksidantai ir jų panaudojimas .....	14
4.2.2. Antioksidantų veikimo mechanizmai .....	14
4.3. Fenoliniai junginiai .....	15
4.3.1. Fenolinių junginių bendroji charakteristika .....	15
4.3.2. Fenolinių junginių antioksidacinės savybės.....	17
4.3.3. Fenolinių junginių ekstrakcija, suminio kiekio ir antioksidacinio aktyvumo nustatymas auginiuose ekstraktuose .....	19
4.4. <i>Astragalus cicer</i> L. bendroji charakteristika .....	21
4.4.3. <i>Astragalus</i> L. panaudojimas medicinoje.....	22
5. TYRIMO METODIKA IR METODAI .....	24
5.1. Tyrimų objektas .....	24
5.2 Medžiagos ir reagentai .....	24
5.3. Naudota aparatūra .....	25
5.4. Tyrimų metodai.....	25
5.4.1. Tiriamųjų mėginių paruošimas .....	25
5.4.2. Reagentų paruošimas .....	25
5.4.3. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu .....	26
5.4.4. Bendrojo flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu.....	27
5.4.5. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas fotometriniu DPPH radikalų surišimo metodu.....	28
5.4.6. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS radikalų - katijonų surišimo metodu.....	28
5.4.7. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas fotometriniu Fe <sup>2+</sup> jonų surišimo metodu .....	29
5.5 Duomenų analizė .....	30
6. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	31
6.1. Tinkamiausių ekstrakcijos sąlygų parinkimas .....	31
6.1.1. Ekstrahento poliškumo parinkimas.....	31
6.1.2. Ekstrakcijos ultragarsu trukmės parinkimas .....	32
6.2. Fenolinių junginių ir flavonoidų suminio kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu .....	33
6.2.1. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas <i>A. cicer</i> žaliavose.....	33
6.2.2. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas <i>A. cicer</i> žaliavose .....	35
6.3. <i>A. cicer</i> antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	37

6.3.1. <i>A. cicer</i> augalinių žaliavų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH surišimo metodu.....	37
6.3.2 <i>A. cicer</i> augalinių žaliavų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS radikalų – katijonų sujungimo metodu.....	40
6.3.3 <i>A. cicer</i> augalinių žaliavų ekstraktų chelatinio aktyvumo nustatymas Fe <sup>2+</sup> jonų surišimo metodu.....	42
6.4. Koreliacinių ryšių įvertinimas tarp suminio fenolinių junginių ir flavonoidų kiekių ir antioksidacinio aktyvumo .....	44
7. IŠVADOS .....	45
8. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS .....	46
9. LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	47

## SANTRAUKA

Monikos Matulaitytės magistro baigiamasis darbas/mokslinis vadovas doc. dr. Raimondas Benetis; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Farmacijos fakulteto, Vaistų chemijos katedra, Kaunas.

Ilguolinių kulkšnių (*Astragalus cicer* L.) augalų fenolinių junginių ir antioksidacinio aktyvumo tyrimas.

**Tikslas.** Ištirti Lietuvoje kultivuojamų ilguolinių kulkšnių (*Astragalus cicer* L.) augalinių žaliavų fenolinių junginių ir flavonoidų kiekybinę sudėtį bei antioksidacinį aktyvumą.

**Uždaviniai:** 1) Parinkti optimalias fenolinių junginių ekstrahavimo sąlygas iš *A. cicer* žaliavų bandinių. 2) Ištirti fenolinių junginių bei flavonoidų kiekybinę sudėtį ir jos įvairavimą *A. cicer* žaliavų mėginiuose spektrofotometriniu metodu. 3) Įvertinti biologiškai aktyvių medžiagų antioksidacinį aktyvumą *A. cicer* žaliavų ekstraktuose trijose modelinėse (ABTS, DPPH ir FIC) sistemose. 4) Įvertinti koreliacinius ryšius tarp kiekybinės fenolinių junginių ir flavonoidų sudėties rodmenų bei antioksidacinio aktyvumo rodiklių.

**Tyrimo metodika.** Tyrimui atlikti naudotos Lietuvoje kultivuotos ilguolinių kulkšnių (*Astragalus cicer* L.) augalinės žaliavos. Ekstrakcija vykdyta ultragarso vonelėje 15min, esant 50° C temperatūrai, naudojant ekstrahentą - 70 % (V/V) etanolį. Suminis fenolinių junginių kiekis įvertintas pagal kalibracinę galo rūgšties kreivę, taikant spektrofotometrinių Folin–Ciocalteu metodą. Bendras flavonoidų kiekis nustatytas spektrofotometriniu metodu pagal rutiną, taikant reakciją su AlCl<sub>3</sub>. Antiradikalinis junginių aktyvumas įvertintas pagal trolokso kreivę, taikant spektrofotometrinių ABTS radikalų surišimo metodą. Taip pat antioksidacinis ekstraktų aktyvumas, kuris išreikštas procentais, įvertintas, taikant DPPH ir FIC (Fe<sup>2+</sup> jonų surišimo metodą) metodus.

**Rezultatai ir išvados.** *A. cicer* augalinėms žaliavoms būdingas suminių fenolinių junginių ir flavonoidų kiekybinių sudėčių kintamumas: didžiausi fenolinių junginių kiekiai nustatyti *A. cicer* sėklose (27,165 ± 1,923 mg/g), o didžiausi flavonoidų kiekiai įvertinti *A. cicer* lapų žaliavose (3,974 ± 0,080 mg/g). Nustatyta, kad *A. cicer* ekstraktams būdingas antioksidacinis aktyvumas visose trijose *in vitro* modelinėse sistemose. Didžiausiu DPPH radikalų surišimo aktyvumu pasižymėjo sėklų ekstraktai (61,61 ± 0,889 %). Didžiausias antiradikalinis aktyvumas, taikant ABTS radikalų – katijonų surišimo metodą, rastas *A. cicer* liofilizuotų krūmijimosi tarpsnio žaliavų ekstraktuose (TE, 12,008 ± 0,319 μmol/g). Stipriausios chelatinės savybės, taikant FIC metodą, nustatytos sėklų ekstraktuose (95,405 ± 0,121 %). *A. cicer* žaliavose stiprūs koreliaciniai ryšiai nustatyti tarp suminio fenolinių junginių kiekio ir antioksidacinio aktyvumo, įvertinto DPPH ir FIC metodais (atitinkamai 0,820 bei 0,815). Taip pat stipri koreliacija įvertinta tarp bendrojo flavonoidų kiekio ir antioksidacinio aktyvumo, kuris nustatytas ABTS radikalų - katijonų sujungimo (0,843) bei FIC (0,853) metodais.

## SUMMARY

The final master's thesis/research prepared by Monika Matulaitytė and supervised by assoc. prof. PhD. Raimondas Benetis; Department of Drug Chemistry, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas.

The investigation of phenolic compounds and antioxidant activity of cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.) plants.

**The aim:** to examine quantitative composition of phenolic compounds and flavonoids in raw materials of *Astragalus cicer* L. cultivated in Lithuania, also to assess antioxidant activity of extracts.

**The objectives of the study:** 1) To optimize the extraction conditions of phenolics compounds from *A. cicer* raw materials. 2) To determine the quantitative composition of total phenolic compounds and flavonoids and their variation patterns in *A. cicer* raw materials using spectrophotometric methods. 3) To evaluate antioxidant activity and its variability in extracts of *A. cicer* raw materials using three modeling (DPPH, ABTS and FIC) systems. 4) To determine correlation between quantitative composition values of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity.

**Research methodology:** The study was performed using samples of the raw materials of cultivated *A. cicer*. The extraction was carried out in ultrasonic agitation 15min when extraction temperature - 50°C and extractant – 70% (V/V) ethanol. To establish the total content of phenolic compounds the Spectrophotometric Folin-Ciocalteu method was used and results were expressed using calibration curve of gallic acid. Spectrophotometric method using rutin and reaction with  $AlCl_3$  has shown the total content of flavonoids. Antiradical compounds activity was assessed by trolox curve using spectrophotometric ABTS radical scavenging method. Extracts antioxidant activity, were expressed as a percentage, measured using DPPH and FIC ( $Fe^{2+}$  ion binding method) methods.

**Results and conclusions:** *A. cicer* raw materials was characterized by the total phenolics and flavonoids quantitative configurations of variability: the highest number of phenolic compounds was determined in *A. cicer* seeds ( $27.165 \pm 1.923$  mg/g), and the highest amount of flavonoids found in *A. cicer* the raw materials of leaves ( $3,974 \pm 0,080$  mg /g ). It was found that *A.cicer* extracts has antioxidant activity in all three *in vitro* modeling systems. The highest DPPH radical scavenging activity was noted in seed extracts ( $61.61 \pm 0.889\%$ ). The biggest antiradical activity using ABTS radical scavenging method, discovered by *A. cicer* lyophilized tillering stage of raw extracts ( $TE 12.008 \pm 0.319$   $\mu$ mol/g). The strongest chelating properties using the FIC method was found in seed extract ( $95.405 \pm 0.121\%$ ). Strong correlation was determined between the total amount of phenolic compounds and antioxidant activity, measured by DPPH and FIC (0.820 and 0,815 respectively) methods. A strong correlation was also determined between the total flavonoid content and antioxidant activity, which was evaluated by ABTS radical - cations scavenging (0,843) and FIC (0.853) methods.

## 1. SANTRUMPOS

**ABTS** - 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis)

**DNR** – deoksiribonukleorūgštis

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

**F-C** - Folin-Ciocalteu analizės metodas

**FIC** - geležies jonų ( $\text{Fe}^{2+}$ ) surišimo metodas

**RNR** - ribonukleorūgštis

**RNS** – aktyvieji azoto junginiai

**ROS** – aktyvieji deguonies junginiai

**UV** - ultravioletiniai spinduliai

**V/V** – tūrio procentai

## 2. ĮVADAS

Įvairūs augalai jau šimtus metų naudojami daugelio ligų gydyme visame pasaulyje. Pasaulinė sveikatos organizacija (PSO) skelbia, kad per 80% Žemės gyventojų ligų gydymui bei jų prevencijai taiko tradicinę mediciną. Be to, ši terapija pagrinde remiasi įvairių sutrikimų gydymu augalų ekstraktais, fitopreparatais ir juose esančiais aktyviaisiais komponentais. Todėl yra svarbu įvertinti augalinių ekstraktų bioaktyvių komponentų kiekybinius rodiklius, kurie lemia galimą augalo pritaikomumą įvairių būklių gydyme. [48]

Reaktyviosios deguonies formos (ROS) mažomis koncentracijomis yra normalaus ląstelinio metabolizmo rezultatas. Tačiau didelės ROS koncentracijos pažeidžia įvairias ląstelės struktūras ir sukelia oksidacinį stresą. Oksidacinis stresas skatina ląstelės senėjimo procesus bei prisideda prie įvairių organizmo patfiziologinių būsenų, įskaitant aterosklerozę, neurodegeneracinius ir vėžinius susirgimus bei kitų, vystimosi. [1]

Vieni pirmųjų antioksidantų terminą 1995m. detaliau apibūdino Halliwell ir Gutteridge - tai bet kuri medžiaga, kuri palyginti su oksiduojančia medžiaga yra mažos koncentracijos, tačiau žymiai prailgina arba sustabdo oksidacijos procesą. 2007m. Halliwell patikslino termino antioksidantas apibrėžimą – tai bet kuri medžiaga, kuri prailgina, apsaugo ar pašalina oksidacijos žalą tikslinėms molekulėms. Šiais laikais, maisto ir farmacijos pramonėje plačiai vartojami sintetiniai antioksidantai turi pagrindinę funkciją - apsaugoti produktą nuo oksidacijos ir prailginti jo vartojimo trukmę. Deja, nauji duomenys rodo, kad pramonėje vartojami sintetiniai antioksidantai gali turėti kancerogeninį poveikį žmogaus ląstelėms. Todėl vis intensyviau plėtojami tyrimai ieškant naujų, natūralių bei efektyvių antioksidantų. [15]

Nustatyta, kad vaisių ir daržovių vartojimas, kuriuose gausu antioksidantų, įskaitant flavonoidus ir fenolkarboksirūgštis, sumažina lėtinių ligų riziką. [15,18] Fenoliniai junginiai kaip antioksidantai gali veikti net keletu mechanizmų, todėl gali mažinti oksidacinę pažaidą efektyviau negu sintetiniai antioksidantai. Taigi, šiuo metu plačiai vystomi įvairių, išsamiai neištirtų, augalų, kurie gali būti potencialūs natūralių antioksidantų šaltiniai, tyrimai, nustatant juose esančių fenolinių junginių kiekį bei antioksidacines savybes. [48]

*Astragalus* gentis yra viena iš didžiausių pupinių (*Fabaceae* L.) augalų šeimoje. Šios genties augalai yra paplitę vidutinių ir sausringų klimato regiono srityse, auga atšiauriomis klimato sąlygomis. [37] *Astragalus* L. genties augalai jau ilgą laiką vartojami rytų medicinoje įvairių ligų gydymui bei jų profilaktikai. [42] Todėl svarbu iširti bioaktyvių medžiagų kiekius ilguolinių kulkšnių (*A. cicer* L.) žaliavose, kurioms Lietuvoje dar nebuvo atlikti išsamesni antioksidacinio aktyvumo tyrimai.



Šių tyrimų metu buvo tirtos: skirtingų ilguolinių kulkšnių augimo metų, skirtingo fenologinio tarpsnio bei atskirų morfologinių augalų dalių žaliavos. Taip pat tyrimo metu atliktas ekstrakcijos sąlygų optimizavimas. Spektrofotometriniais metodais nustatyti ekstraktų bendri fenolinių junginių, flavonoidų kiekiai ir antioksidacinis aktyvumas. Gauti rezultatai leidžia įvertinti ilguolinių kulkšnių žaliavas kaip galimai potencialų antioksidantų šaltinį.

**Darbo tikslas:** ištirti Lietuvoje kultivuojamų ilguolinių kulkšnių (*Astragalus cicer* L.) augalinių žaliavų fenolinių junginių ir flavonoidų kiekį ir antioksidacinį aktyvumą.

### 3. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

**Darbo tikslas:** ištirti Lietuvoje kultivuojamų ilguolinių kulkšnių (*Astragalus cicer* L.) augalinių žaliavų fenolinių junginių ir flavonoidų kiekį ir antioksidacinį aktyvumą.

**Darbo uždaviniai:**

- 1) Parinkti optimalias fenolinių junginių ekstrahavimo sąlygas iš *A. cicer* žaliavų bandinių.
- 2) Ištirti fenolinių junginių bei flavonoidų kiekybinę sudėtį ir jos įvairavimą *A. cicer* žaliavų mėginiuose spektrofotometriniu metodu.
- 3) Įvertinti biologiškai aktyvių medžiagų antioksidacinį aktyvumą *A. cicer* žaliavų ekstraktuose trijose modelinėse (ABTS, DPPH ir FIC) sistemose.
- 4) Įvertinti koreliacinius ryšius tarp kiekybinės fenolinių junginių ir flavonoidų sudėties rodmenų bei antioksidacinio aktyvumo rodiklių.

## 4. LITERATŪROS APŽVALGA

### 4.1 Oksidacinis stresas

Oksidacinio streso sąvoka apibūdina ląstelinį disbalansą tarp oksiduojančių agentų ir antioksidantų. [1] Dėl oksidacinio streso susidaro dideli laisvųjų radikalų kiekiai, o antioksidaciniai mechanizmai ląstelėje nebegali pilnai funkcionuoti. [2] Oksidacinio streso metu, dėl padidėjusio oksidantų kiekio ir(ar) sumažėjus fermentinių ar ne-fermentinių antioksidacinių sistemų veiksmingumui, gali būti pažeidžiamos biologinės ląstelių funkcijos. [3,4]. Tai gali daryti įtaką daugelio patfiziologinių būklių, tokių kaip neurologiniai sutrikimai, aterosklerozė, hipertenzija, išemija/perfuzija, diabetas ir kitų, vystymuisi ir progresavimui. [1]

Oksidacinis stresas gali veikti daugelį ląstelės sistemų ir struktūrų. [5] Nuo veikimo vietos priklauso ir oksidacinio streso sukiamas klinikinis atsakas, kuris gali skirtis tarp įvairių ląstelių ir sistemų, dėl toje ląstelėje esančių oksiduotų ir neoksiduotų molekulių sąveikos. 1-2% suvartojamo deguonies mitochondrijose yra panaudojama oksiduojančių medžiagų formavimui, o jų poveikis priklauso nuo tam tikrų išorinių ir vidinių veiksnių. [6]

#### 4.1.1 Laisvieji radikalai ir jų susidarymas organizme

Laisvieji radikalai apibrėžiami kaip molekulės, atomai ar cheminės medžiagų grupės, kurie gali nepriklausomai egzistuoti ir turi vieną ar daugiau nesuporuotą elektroną. Vieno ar daugiau nesuporuotų elektronų buvimas sukelia laisvųjų radikalų judėjimą magnetiniame lauke ir daro juos reaktyvius. Laisvųjų radikalų reaktyvumas gali būti įvairus ir skirtis. Laisvieji radikalai gali susiformuoti atiduodant ar prisijungiant vieną elektroną iš ne radikalo arba nutraukiant kovalentinius ryšius, jei vienas elektronas, iš ryšį sudarančios poros, lieka kiekvienam jį sudariusiam atomui. [7] Laisvieji radikalai, į kurių struktūrą įeina azotas, deguonis ir anglis, turi didžiausią įtaką biologinėms sistemoms. [2]

Reaktyviosios deguonies formos (ROS) yra bendrinis terminas, apibūdinantis oksidantų grupes, kurios yra laisvieji radikalai arba molekulių rūšys, gebančios generuoti laisvuosius radikalus. Taigi, reaktyviųjų deguonies formų terminas apima ne tik laisvuosius radikalus, bet ir neradikalinius darinius, kurie virtę laisvaisiais radikalais veikia kaip oksidatoriai. [7,8] Pavyzdžiui, vandenilio peroksidas ( $H_2O_2$ ), Fentono reakcijos metu, katalizuojant geležies jonams, yra paverčiamas į  $\cdot OH$  radikalus, o hipochlorito rūgštis ( $HOCl$ ) reakcijos su vandenilio peroksidu metu yra konvertuojama į  $O_2\cdot^-$ . [2,8] Vandenilio peroksidas gali būti konvertuojamas į  $\cdot OH$  radikalus ir Haber-Veiso reakcijos metu. [2] Kartais ne-radikalinės molekulių rūšys yra naudojamos kaip ROS šaltiniai. [7,8] Reaktyvios deguonies ir azoto formos (RONS) yra dviejų klasių chemiškai reaktyvios molekulės, turinčios deguonies (reaktyviosios deguonies formos, ROS) ar azoto (reaktyviosios azoto formos, RNS). Dauguma RONS

perneša nesuporuotus elektronus. [9] Reaktyviųjų deguonies formų (ROS) pavyzdžiai gali būti superoksido anijonas ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), vandenilio peroksidas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), itin reaktyvus hidroksilo radikalas ( $\text{HO}\cdot$ ) ir peroksilo radikalas ( $\text{HO}_2\cdot$ )<sup>4</sup>. Reaktyviasias azoto formas (RNS) galima laikyti ROS poklase. Reaktyviosioms azoto formoms priskiriami (RNS) radikalai: azoto oksidas ( $\cdot\text{NO}$ ), azoto dioksidas ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato radikalas ( $\text{NO}_3^-$ ), ir ne radikalai: nitrozonio katijonas ( $\text{NO}^+$ ), nitroksilo anijonas ( $\text{NO}^-$ ), peroksinitrato anijonas ( $\text{ONOO}^-$ ), diazoto tetraoksidas ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ), diazoto trioksidas ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) ir nitritinė rūgštis ( $\text{HNO}_2$ ). [10, 11]

Paprastai mažos ir vidutinės ROS koncentracijos yra būtinos normalioms fiziologinėms organizmo funkcijoms vykdyti. [1] ROS būtinas genų ekspresijai, ląstelių augimui, apsaugo nuo infekcijų. Kai kada ROS veikia kaip ląstelių biocheminius procesus stimuliuojantys agentai. ROS katalizuoja molekulių, tokių kaip tiroksino, prostaglandinų biosintezės procesus. Svarbu paminėti, kad tiroidinėse ląstelėse  $\text{H}_2\text{O}_2$  katalizuoja jodo atomų jungimąsi prie tiroglobulino. Didesnės ROS koncentracijos sukelia žalingą poveikį organizmui. [8, 12]

Balansas, tarp ROS gamybos ir neutralizavimo antioksidantais, pasižymi lengvu kintamumu. Kai vyksta ROS perprodukcija, ląstelės yra pažeidžiamos oksidacinio streso. Per didelę ROS generaciją gali skatinti išoriniai ir vidiniai veiksniai. Organizme ROS susidaro fagocitozės, uždegiminių procesų metu, esant išemijai, padidintam fiziniam aktyvumui. Taip pat dėl ksantino oksidazės poveikio, arachidono rūgšties junginių susidarymo metu. [5] Padidintai ROS gamybai daro įtaka ir sumažėjęs fermentinių ir ne-fermentinių antioksidantų aktyvumas. [12]

Sunkieji metalai, atsižvelgiant į jų gebėjimą redukuoti ir oksiduoti, gali veikti keliais ROS generacijos mechanizmais. Red-okso aktyvūs metalai kaip varis ir chromas, dalyvauja Haber-Veiso reakcijose, susidarant hidroksilo radikalams, kurie yra vieni iš labiausiai žalingų ROS formų, sukeliančių oksidacinį stresą. Metalai, kurie nepasižymi stipriomis redukuojančiomis ar oksiduojančiomis savybėmis, tokie kaip kadmis, švinas, cinkas interferuoja fotosintetinius procesus bei skatina superoksido gamybą ląstelėse. Sunkieji metalai slopina antioksidacines sistemas, išekvodami glutatono atsargas ir sudarydami ryšius su fermentinių antioksidantų merkaptų grupėmis. [1,13]

Oksiduojančių medžiagų kiekį gali didinti įvairūs išoriniai faktoriai pvz. rūkymas, aplinkos teršalai, radiacija, vaistai, pesticidai, įvairūs tirpikliai, ozonas, UV spinduliuotė, patogenai ir kiti. [5,12]

#### 4.1.2. Oksidacinio streso poveikis organizmui

Pagrindinės oksidacinio streso pažeidžiamos struktūros yra baltymai, DNR (deoksiribonukleorūgštis), RNR (ribonukleorūgštis), cukrūs ir lipidai. Baltymai, veikiami oksidacinio streso, gali būti modifikuojami veikiant konkrečią amino rūgštį, atskeliant laisvųjų radikalų medijuojamą peptidą ar formuojant kryžmines jungtis tarp baltymų. [5] Cisteino ir metionino skilimo produktai yra ypatingai jautrūs oksidacijai. ROS gali sukelti DNR modifikacijas dėl sukeltos bazių degradacijos, viengubosios ar dvigubosios DNR spiralės pertraukimo. Taip pat sukeliama įvairūs pakitimai bei mutacijos, kryžminių ryšių perkėlimas ar net panaikinimas purinų, pirimidinų ir dezoksi cukraus darinių struktūroje. [1] Hidroksilo radikalai, susidarę Fentono reakcijos metu, gali reaguoti su visais DNR molekulos komponentais. Peroksilo ( $\text{HO}_2^-$ ) ir hidroksilo (OH) radikalai gali sukelti DNR oksidaciją. [5] Dauguma DNR modifikacijų gali būti tiesiogiai susijusios su kancerogenais, senėjimo procesais, neurodegeneraciniais bei širdies ir kraujagyslių sutrikimais, autoimuninėmis ligomis. Tabako dūmai, sunkieji metalai (kadmis, chromas, arsenas) ir kiti kancerogenai gali inicijuoti laisvųjų radikalų susidarymą organizme ar jų ryšių sudarymą su tiolio grupėmis. [1] Oksidacinis stresas sąlygoja lipidų peroksidaciją, netenkant H atomo iš metileno grupės šoninėje riebalų rūgšties grandinėje. Pašalinus vandenilio atomą, galimi molekuliniai struktūros persitvarkymai ir reakcija su deguonimi, susiformuojant peroksidacijos produktams. Oksidacinio streso metu taip pat vyksta cukrų glikozilinimas ir konformaciniai pokyčiai [5] Padidėjęs ROS kiekis gali sukelti ląstelių pažeidimus, žūtį, nekrozę, apaptozę ir daugelį kitų žalingų ląstelei veiksnių. [6]

Oksidacinis stresas skatina daugelio patologinių būklių tokių kaip vėžys, neurologiniai sutrikimai, aterosklerozė, hipertenzija, išemija/perfuzija, diabetas, ūminio respiracinio distreso sindromas, idiopatinė plaučių fibrozė, lėtinė obstrukcinė plaučių liga, astma, Parkinsono, Alzheimerio ligos, progresavimą. [1, 14]

Oksidacinis stresas gali būti audinių pažeidimo priežastimi, esant hiperoksijai ir cukriniam diabetui. *Helicobacter pylori* didina reaktyviojo deguonies ir azoto perprodukciją skrandyje, todėl skatina skrandžio vėžio vystymąsi ir progresavimą. ROS taip pat pažeidžia ląstelinius komponentus kremzlinėse struktūrose, pablogindami chondrocitų atsaką augimo faktoriams bei pažeisdami kremzlės audinius, turi įtakos osteoartrito vystymuisi. ROS perteklius yra susijęs su aortos vožtuvo stenoze bei inkstų akmenlige. [14]

Esant oksidaciniam stresui, ląstelės bando neutralizuoti žalojantį oksidacinį poveikį ir atkurti redokso pusiausvyrą, aktyvuojant ar slopinant atitinkamus genus, kurie koduoja fermentines gynybines sistemas, transkripcijos faktorius ir struktūrinius baltymus. Oksiduoto ir redukuoto glutationo rodiklis (2GSH/GSSG) yra vienas iš svarbiausių veiksnių, lemiančių oksidacinį stresą organizme. Padidintos ROS gamybos pasekmės – galimai pakeista DNR struktūra, dėl baltymų ir lipidų modifikacijos sukelta

streso indukuojama transkripcijos faktorių aktyvacija, uždegimą skatinančių ir priešuždegiminių citokininų gamyba. [1]

## 4.2. Antioksidantai

### 4.2.1. Natūralūs antioksidantai ir jų panaudojimas

Antioksidantai – tai junginiai, kurie prailgina oksidacinių procesų trukmę, panaikina ar apsaugo molekules nuo oksidacinių procesų poveikio, surišdami ir neutralizuodami laisvuosius radikalus, sumažina oksidacinį stresą. [5,15] Antioksidantai skirstomi į dvi grupes: fermentiniai (gliutatio peroksidazė, katalazė, superoksido dismutazė) ir nefermentiniai (vitaminai, kofermentas Q<sub>10</sub>, cinkas, selenas, fenolinės rūgštys). [15] Taip pat antioksidantai gali būti skirstomi į sintetinius ir natūralius. [16]

Įvairūs augalai jau tūkstančius metų vartojami tradicinėje medicinoje ligų gydymui. Augaluose yra kaupiama daugelis bioaktyvių darinių, tokių kaip flavonoidai ar fenolinės rūgštys, kurie gali lemti augalo antioksidacines savybes. [48] Antioksidantai inhibuoja laisvųjų radikalų grandininių reakcijų mechanizmus ir inicijuoja RNS ir ROS pašalinimą. [8, 16] Nors anksčiau augalinės kilmės produktai buvo vartoti tik kaip maistinių medžiagų šaltiniai, tačiau dabar tai svarbūs natūralių antioksidantų šaltiniai. [18,48]

Antioksidantai naudojami kaip konservantai. Jie naudojami kaip maisto priedai, siekiant pratęsti produkto galiojimo laiką ir apsaugoti nuo nesočiųjų riebalų rūgščių oksidacijos. Taip pat antioksidantai, pavyzdžiui β karotenas, naudojami kaip dažikliai. Askorbo rūgšties dariniai tokie kaip askorbo rūgštis, eritorbo rūgštis ir kiti, plačiai naudojami farmacijos pramonėje. [18]

Daugelis natūralių antioksidantų yra randami augalų ir gyvūnų organizmuose. [16] Natūralių antioksidantų ekstrakcija dažniausiai vykdoma įvairias augalo dalis veikiant atitinkamais tirpikliais, tam tikromis sąlygomis. Gautų ekstraktų veiksmingumas ir efektyvumas priklauso nuo antioksidantų fizikinių ir cheminių savybių. Antioksidantai (flavonoidai, fenolinės rūgštys, taninai ir kiti ) turi skirtingas biologines savybes, todėl skirtingos ir jų pritaikymo galimybės. [17]

### 4.2.2. Antioksidantų veikimo mechanizmai

Antioksidantai gali veikti kaip laisvųjų radikalų oksidacijos reakcijų inhibitoriai, kurie slopina lipidinių laisvųjų radikalų susidarymą. Taip pat jie gali nutraukti grandinines autoksidacijos reakcijas. Antioksidantai gali būti singuletinio deguonies slopinamosios medžiagos, sinergistiškai veikti kartu su kitais antioksidantais, inhibuoti lipooksigenazes. Taip pat jie veikia ir kaip redukciniai agentai, kurie

konvertuoja hidroperoksidazes į stabilius junginius, ar metalų katijonų chelatoriai, kurie sujungia prooksidantus į stabilius junginius. [5]

Fermentiniai ir nefermentiniai antioksidantai neutralizuoja oksidantų veikimą. Superoksido dismutazė yra trijų izoformų: vario - cinko forma, kuri yra citozolyje, mangano forma, kuri yra mitochondrijos matricoje ir ekstraląstelinė forma, kuri yra ekstraląstelinėje matricoje. [1] Visos superoksido dismutazės izoformos konvertuoja  $O_2^-$  anijonus į vandenilio peroksidą. [5] Toliau katalazė ir glutationo peroksidazė suskaido vandenilio peroksidą į vandenį. Katalazė egzistuoja kaip tetrameras, sudarytas iš keturių identiškų monomerų, kurių kiekvienas turi aktyvias hemo grupių vietas. Glutationo peroksidazė priskiriama tetrameriniams fermentams, kurie savo aktyviesiuose centruose turi unikalią amino rūgščių selenocisteiną, ir naudoja mažos molekulinės masės tiolius kaip glutationą, siekiant sumažinti lipidų peroksidaciją, paverčiant juos tam tikrais alkoholiais. [1]

Antioksidaciniu aktyvumu pasižymi ir ne-fermentiniai mažos molekulinės masės junginiai, tokie kaip vitaminai A, E,  $\beta$  karotenas, šlapimo rūgštis ir kiti. [1] L-askorbo rūgštis arba kitaip vitaminas C yra redukuojantis agentas, todėl gali neutralizuoti reaktyvias deguonies formas (ROS). Tokochromanolių darinys, vitaminas E, inhibuoja riebalų peroksidacijos reakcijas. [16]  $\beta$  karotenas veikia kaip hidroksilo, peroksilo ir superoksido radikalų gaudyklė. Karotinoidai taip pat apsaugo ląsteles nuo apoptozės. [1]

### 4.3. Fenoliniai junginiai

#### 4.3.1. Fenolinių junginių bendroji charakteristika

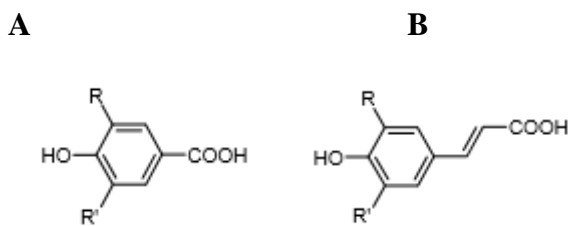
Fenoliniai junginiai, kurie gali būti monofenoliniai ar polifenoliniai dariniai, yra viena iš labiausiai paplitusių antrinių metabolitų klasių gamtoje. Manoma, kad egzistuoja nuo 100 000 iki 200 000 antrinių metabolitų. Net 20% anglies, reikalingos augalų fotosintezei, yra nukreipiama fenilpropanoidų biosintezei, taip natūraliai susidarant įvairiems fenoliniams dariniams. [19]

Fenoliniai junginiai gali slopinti neigiamą ROS poveikį gyvuosiuose organizmuose, todėl kai kurie augalai, pasižymintys stipriu antioksidaciniu poveikiu, vartojami daugelio ligų gydymui. Pastaruoju metu vis labiau plėtojami moksliniai tyrimai augalų, kurie yra mažai tyrinėti, tačiau įtariama, kad gali būti potencialūs natūralių antioksidantų šaltiniai.

Daugelis fenolinių junginių, ypač flavonoidai, pasižymi plačiu biologinio poveikio spektru, įskaitant antioksidacinį aktyvumą, priešuždegiminį, priešvirusinį, antibakterinį, antialerginį, antitrombocitinį veikimą. [20] Taip pat pastebėta, jog fenoliniai junginiai turi priešvėžinį poveikį ląstelėms. [22] Fenoliniai junginiai kaip paprasti junginiai taip pat aptinkami šviežiuose vaisiuose ir

daržovėse, kaip kompleksiniai junginiai – augalų žievėse, šaknyse ir lapuose.[21] Taip pat fenoliniai junginiai turi įtakos augalo spalvai, skoniui, aromatu bei naudingosioms savybėms .[22]

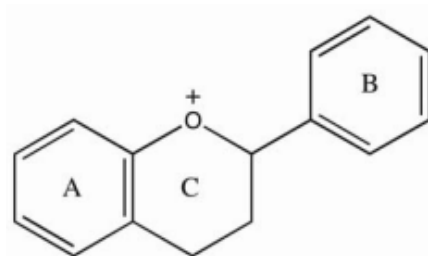
Fenoliniai junginiai skirstomi į keletą skirtingų grupių, kurios tarpusavyje skiriasi anglies atomų skaičiumi fenolinio skeleto struktūroje. Fenoliniams dariniams priskiriami paprastieji fenoliai, fenolinės rūgštys, kumarinai, lignanai ir ligninai, kondensuoti ir hidrolizuojamieji taninai bei flavonoidai. [21,23] Fenolinėms rūgštims priskiriami fenoliai, kurie turi vieną karboksirūgšties funkcinę grupę. Be to, fenolinės rūgštys yra polifenolių biopirmtakai bei jų metabolitai. Paprastai, gamtoje būna dvi pagrindinės fenolinių rūgščių struktūros: hidroksicinamono ir hidroksibenzoato dariniai. (**1 pav**)[22]



**1 pav. A – hidroksibenzoinė rūgštis, B – hidroksicinamono rūgštis [19]**

Fenolinės rūgštys augaluose sutinkamos esterių, glikozidų ar amidų pavidalų, daug rečiau – laisvos formos.[21]

Flavonoidai yra vieni iš labiausiai paplitusių fenolinių junginių augaluose. Visų flavonoidų struktūros pagrindą sudaro aromatinių amino rūgščių, fenilalanino ir tirozino, trijų žiedų struktūra. Flavonoidai savo struktūroje turi 15 anglies atomų, kurie sudaro du aromatinis žiedus, sujungtus per heterociklinį pirano žiedą. Visi flavonoidai turi pagrindinį C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> konstrukcinį skeletą, sudarytą iš dviejų aromatinių žiedų C<sub>6</sub> ir heterociklinio žiedo, kurio sudėtyje yra vienas deguonies atomas. (**2 pav.**) [21]



**2 pav. Bendroji flavonoidų struktūra [21]**

Flavonoidų šeimai priskiriami flavonai, flavonoliai, flavononai, flavan-3-olis, izoflavonoliai, antocianai, antocianinai, proantocianidai ir katechinai. [21,22]



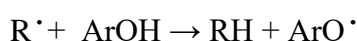
Fenolinių junginių antioksidacinio poveikio mechanizmai gali būti įvairūs. Fenolių hidroksilinės grupės yra geri vandenilio donoriai, kurie gali reaguoti su reaktyviosios deguonies ir reaktyviosios azoto formomis ir nutraukti naujų radikalų susidarymą. Dėl fenolinių junginių hidroksi grupių sąveikos su benzeno žiedo  $\pi$  elektronais, galimas laisvųjų radikalų generavimas. [19] Fenoliniai junginiai dėl savo struktūroje esančių hidroksilo ir karboksilo grupių, gali surišti superoksido radikalus bei sudaryti kompleksus su metalais. [23]

Fenoliniai junginiai yra randami daugelyje augalo dalių ir pasižymi plačiu biologiniu poveikiu, dėl to gali būti panaudoti įvairių ligų gydyme. [24] 2008m. Atmani kartu su kolegomis įrodė, kad mastikinė pistacija (*Pistacia lentiscus*) pasižymi stipriomis redukuojančiomis savybėmis bei ženkliai antioksidaciniu aktyvumu, dėl didelio fenolinių junginių kiekio, aptinkamo šio augalo ekstraktuose. Dėl to, *Pistacia lentiscus* gali būti pritaikoma kardiovaskulinių ligų gydymui. 2008m. Ravikumar su kolegomis ištyrė etanolinius vyšninės viršelės (*Polyalthia cerasoides* (Roxb.) Bedd) ekstraktus nustatė, kad šio augalo ekstraktuose aptinkami nedideli fenolinių junginių kiekiai, tiesiogiai lemia augalo naudingąsias savybes. Farmakologinių tyrimų metu nustatyta, kad *Polyalthia cerasoides* (Roxb.) Bedd žievė padeda sumažinti stresą. [48] 2011m. Wang su kolegomis *in vitro* tyrimais įrodė kad, *Astragalus mongholicus* ekstraktai dėl fenolinių junginių, esančių augalo sudėtyje, apsaugo nuo kardiovaskulinių ligų, stabdo aterosklerozės formavimąsi. [24] 2013m. Krasteva ištyrusi keturias skirtingas *Astragalus* augalų rūšis, įrodė fenolinių junginių įvairumą tarp tos pačios genties *Astragalus* augalų. [25] Svarbu nustatyti fenolinių junginių kiekį bei jų antioksidacinį aktyvumą žaliavose įvairiomis metodikomis, norint įvertinti jų, kaip terapinių priemonių, potencialą bei galimą pritaikymą įvairių ligų gydymui. [21,22]

#### 4.3.2. Fenolinių junginių antioksidacinės savybės

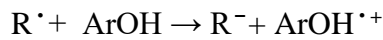
Nustatyta, kad daugelio ligų, tokių kaip aterosklerozė, koronarinė širdies liga, arterinė hipertenzija, širdies nepakankamumas, pagrindinė atsiradimo priežastis yra oksidacinis stresas. Šiuolaikiniai tyrimai atskleidžia, kad dėl antioksidacinių ir chelatinių fenolinių junginių savybių, gali būti išvengiama neigiamų oksidacinio streso padarinių. [22] Manoma, kad fenolinių junginių antioksidacinis veikimas gali būti siejamas su šiais mechanizmais: 1) grandinių reakcijų nutraukimo mechanizmu, 2) ROS ir RNS pašalinimu, slopinant grandinės katalizatorius 3) endogeninių antioksidantų apsauga, 4) pereinamųjų metalų sujungimu. [29,46]

Fenoliniai junginiai stabdo radikalines reakcijas. Laisvasis radikalas prisijungia vandenilio atomą iš antioksidanto. Antioksidantas (ArOH), netekęs vandenilio atomo, pats tampa radikalu:



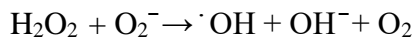
Toliau reaguoja susidaręs  $\text{ArO}^\cdot$  radikalas, nes yra stabilesnis ir reaktyvesnis už  $\text{ArOH}$ .  $\text{ArO}^\cdot$  radikalas vandenilinių jungčių konjugacijos metu, paverčiamas mezomeriškai stabilizuotu tarpiniu fenoksilo radikalų.

Be to, fenoliniai junginiai gali prisijungti vandenilio atomą iš laisvojo radikalo, taip tapdami katijonais. [26]:

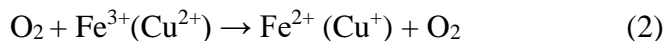
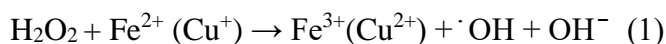


Fenolinių junginių antioksidacinis aktyvumas yra susijęs su jų struktūra: pakaitais, esančiais aromatiniam žiede, ir šoninės grandinės struktūra. [27] Pavyzdžiui, flavonoidų antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo B žiedo 3,4-dihidroksi grupės, C žiedo 2,3 dvigubos ryšio kartu su 4-okso grupe, 3-OH grupės buvimo C žiede bei 5-OH grupės buvimo A žiede. [23] Fenolinių junginių gebėjimas surišti laisvuosius radikalus priklauso nuo hidroksi grupės reaktyvumo. Fenoliniai junginiai, kurie turi daugiau hidroksilinių grupių kaip protokatecho, galo, kavos rūgštys, turi didesnę radikalų surišamąją galią ir aukštą redokso potencialą. [27]

Katalizuojant metalų jonams,  $\text{H}_2\text{O}_2$  kartu su  $\text{O}_2^-$ , gali generuoti labai reaktyvų  $-\text{OH}^-$  hidroksilo radikalą (Haber-Weiso reakcija):



Metalai pasižymintys stipriomis redukuojančiomis savybėmis kaip  $\text{Cu}^+$  ir  $\text{Fe}^{2+}$ , gali konvertuoti  $\text{H}_2\text{O}_2$  Fentono reakcijos metu:



Kiti metalai, nepriklausantys pereinamiesiems metalams, negali dalyvauti Fentono reakcijoje, tačiau gali slopinti antioksidacinių fermentų aktyvumą, ypač glutationo reduktazės, todėl galima ROS akumuliacija. Kadmio sukelia oksidacinį stresą veikdamas netiesiogiai, slopindamas fenolinių junginių antioksidacinius mechanizmus, pavyzdžiui, sutrikdant grandinės elektronų perdavimo reakcijas arba aktyvuojant fermentą lipooksigenazę, kuris inicijuoja lipidų peroksidaciją.

Fenolinių junginių antioksidacinis poveikis pasireiškia metalų jonų inaktyvacija, sudarant chelatus bei slopinant superoksido jonų medijuojamą Fentono reakciją. [23]

Kai kuriais atvejais fenoliniai junginiai gali turėti prooksidacinį aktyvumą. Prooksidacinis aktyvumas gali pasireikšti metalų jonų poveikyje, esant labai didelėms fenolinių junginių

koncentracijoms ir kitomis sąlygomis. Pastebėta, kad nedidelės molekulinės masės fenoliniai junginiai (kvercetas, kemferolis, miricetas) turi savybę lengvai oksiduotis ir veikti kaip prooksidantai. [28]

#### 4.3.3. Fenolinių junginių ekstrakcija, suminio kiekio ir antioksidacinio aktyvumo nustatymas augaliniuose ekstraktuose

Fenolinių junginių sudėtis augaluose bei jų ekstraktuose įvairuoja, todėl individualių fenolinių junginių išskyrimas ir analizė tampa sudėtingu, brangiu ir daug laiko užimančiu procesu. Todėl tikslinga įvertinti suminę augalinių ekstraktų antioksidantinę gebą, nuo kurios gali priklausyti jų gydomosios savybės. Todėl analizės metodo atrankumas, paprastumas, atkartojamumas – tai svarbiausi kriterijai, norint užtikrinti greitą kiekybinę antioksidantų analizę, fenolinių ekstraktų mėginiuose. [29]

Ekstrakcijai gali būti naudojamos šviežios, džiovintos ore ar liofilizuotos augalo dalys. Dažniausiai liofilizuotos žaliavos turi didesnę fenolinių junginių kiekį nei įprastai džiovintos augalinės žaliavos. [30] Ekstahentai naudojami ekstrakcijai gali būti neorganiniai (vanduo) ir organiniai (acetonas, etilo acetatas, alkoholiai ir jų mišiniai su vandeniu). [21]. Etanolis – vienas iš dažniausiai naudojamų ekstrahentų, tinkančių mažos molekulinės masės polifenolinių junginių ekstrakcijai atlikti. Be to, šis ekstrahentas mažiausiai toksiškas žmogaus sveikatai. Taip pat svarbu pasirinkti ekstrakcijos trukmę, temperatūrą, tirpiklio ir mėginio santykį, kurių pasirinkimas priklauso nuo ekstrahuojamos žaliavos savybių bei norimų išekstrahuoti polifenolinių junginių tipo. [30] Ekstrakcijai atlikti taikoma daug metodikų: subkritinė vandens ekstrakcija (*Subcritical Water Extraction*), superkritinė skysčių ekstrakcija (*Supercritical Fluid Extraction*), pagreitinatas ekstrahavimas tirpikliais, ekstrakcija ultragarsu ir kitos. [21, 30].

Bendram fenolinių junginių kiekiui nustatyti taikomi keli metodai, tačiau dėl fenolinių junginių heterogeniškumo ir galimos kitų, lengvai oksiduojamų medžiagų įtakos, nei vienas iš fitocheminiuose tyrimuose naudojamų metodų nėra idealus. Fenolinių junginių kiekio nustatymui taikomi metodai yra Folin-Denis, Folin-Ciocalteu, kolorimetrija su geležies druskomis, permanganometriniu titravimu. [30] Dažniausiai fenolinių junginių kiekiui nustatyti taikomas Folin-Ciocalteu metodas dėl savo paprastumo, atkartojamumo bei pigumo. [31] Kaip lyginamasis etalonas naudojama galo rūgštis, o gautos reikšmės pateikiamos galo rūgšties ekvivalentais. [30] Folin-Ciocalteu metodas remiamas oksidacijos-redukcijos reakcijomis. [31] Šis metodas turi platų fenolinių junginių aptikimo spektrą, tačiau kitos medžiagos tokios kaip aromatiniai aminai, dideli cukrų kiekiai, askorbo rūgštis gali trukdyti tiksliai nustatyti fenolinių junginių kiekį. [30, 31] Sulfitai ir sieros dioksidas gali padidinti nustatinėjamą fenolinių junginių kiekį. [30]

Bendrajam flavonoidų kiekiui nustatyti taikomas spektrofotometriniu metodu, kurio metu vyksta reakcija su  $AlCl_3$ . Šio kolorimetrinio metodo principas – stabilių kompleksų sudarymas su

flavonų ir flavonolių C-4 keto ir/arba C-3 bei C-5 grupėmis. Paprastai,  $\text{AlCl}_3$  sudaro rūgštims neatsparius kompleksus su A ir B flavonoidų žieduose esančiomis *orto*-hidroksi grupėmis. Kaip lyginamasis standartas gali būti naudojamas rutino ar kvercetino tirpalas. Rezultatai išreiškiami mg/g pagal rutino ar kvercetino ekvivalentą. [32]

Tradiciniai spektrofotometriniai metodai yra paprasti ir greitai atliekami, tačiau atsižvelgiant į fenolinių junginių kompleksiško sudėtingumą ir - skirtingą reaktyvumą, gali būti ne visiškai tiksūs, įvertinant kiekybinę fenolinių junginių sudėtį. Atrankesni efektyviosios skysčių chromatografijos metodai derinami su instrumentinės analizės metodais leidžia tiksliau įvertinti kiekybinę fenolinių junginių sudėtį. [30] Tokiems metodams priskiriama dujų chromatografija, efektyvioji skysčių chromatografija, popieriaus chromatografija, plonasluoksnė chromatografija, priešpriešinė chromatografija, kapiliarinė elektroforezė, superkritinė skysčių chromatografija. Nors taikant šiuolaikiškesnes metodikas ir gaunami tikslesni rezultatai, tačiau kiekviena metodika turi savitų trūkumų kaip metodikos sudėtingumas, brangi aparatūra bei reagentai, ilga analizės trukmė, tam tikrų junginių analizės informacijos trūkumas ir kiti. [21]

Fotometrinis DPPH radikalų surišimo metodas padeda nustatyti antioksidantinį efektyvumą. Šis metodas remiasi elektronų perdavimo reakcijomis. Reakcijos metu tirpalo spalva gali kisti nuo tamsiai violetinės iki geltonos, priklausomai nuo antioksidantų gebėjimo surišti laisvuosius radikalus. DPPH metodas yra greitas, paprastas, tikslus, nebrangus, nustatant junginius, kurie gali veikti kaip laisvųjų radikalų sujungėjai ar vandenilio donorai. [33, 34]

ABTS radikalų – katijonų surišimo metodu nustatomas santykinis antioksidantų gebėjimas neutralizuoti ABTS radikalus vandeninėje terpėje. Kaip lyginamasis etalonas naudojamas šviežiai paruoštas trolokso (vandenyje tirpus vitamino E analogas) tirpalas. ABTS radikalai – katijonai gali būti generuojami veikiant stipriai oksiduojančiais junginiais, tokiais kaip kalio permanganatas ar kalio persulfatas. Mėlynai žalio ABTS tirpalo redukcija vyksta antioksidantui atidavus vandenilio atomą. Tiriamojo tirpalo absorbcija matuojama esant šviesos bangos ilgiui 734 nm. ABTS radikalų surišimo efektyvumas išreiškiamas trolokso ekvivalentais. [35] ABTS radikalų – katijonų sujungimo metodas yra techniškai paprastas, gali būti pritaikomas antioksidantų atrankai, leidžia nustatyti hidrofiliųjų ir lipofiliųjų junginių antioksidacinį aktyvumą. [46]

Fotometrinis divalentės geležies (FIC) jonų surišimo metodas leidžia įvertinti fenolinių junginių antiradikalines savybes. Metodo esmė – fenolinių antioksidantų gebėjimas sudaryti chelatus su pereinamųjų metalų jonais. Reakcijos aktyvatorius – ferozinas, mišinio absorbcija matuojama esant 562 nm bangos ilgiui. Gauti rezultatai išreiškiami procentais. [36] Šis metodas techniškai nesudėtingas, patikimas, reikalaujantis kruopštumo. [29]

Antioksidaciniam aktyvumui nustatyti yra ir kitų metodų: deguonies radikalų absorbcijos galia (angl. *Oxygen radical absorbance capacity*), antioksidanto sugaudytų radikalų suminis matas (angl.

*Total radical-trapping antioxidant parametre*), geležies redukcijos antioksidantinė galia (angl. *Ferric reducing antioxidant power*), vario redukcijos antioksidantinė galia (angl. *Copper reduction assay*) ir t.t. Tai svarbūs, skirtingo veikimo mechanizmo metodai, skirti įvertinti antioksidacinį efektyvumą prieš ROS/RNS. [30]

#### 4.4. *Astragalus cicer* L. bendroji charakteristika

Kulkšnių (*Astragalus* L.) gentis yra viena iš didžiausių pupinių šeimai (*Fabaceae* ar *Leguminosae*) priskiriamų žydinčių augalų gentis. Jai priklauso vienmečiai ar daugiamečiai žoliniai augalai, puskrūmiai ar krūmai, plačiai paplitę vidutinių ir sausringų platumų regionuose. Kulkšnių (*Astragalus* L.) genčiai priklauso nuo 2000 iki 3000 augalų rūšių. [37] Manoma, kad saponinai, flavonoidai ir polisacharidai yra pagrindiniai kulkšnių genties atstovų aktyvieji komponentai. Jiems taip pat priskiriami tokie junginiai kaip antrachinonai, alkaloidai, amino rūgštys,  $\beta$ -sitosteroliai, mikro ir makro elementai: Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn. Svarbu paminėti, kad kulkšnių gentyje nustatomas platus flavonoidų spektras. [37] Nustatyta, kad *A. cicer* žaliavoje aptinkami flavonoliai rutinas ir hiperozidas bei kumarinas umbeliferonas. [25] *A. asper* žaliavoje nustatyti flavonoliai nikotiflorinas, kvercetas, kvercetino-7-O-gliukozidas (kvercimeritinas), rutinas, kemferolis, astragalinai. Tuo tarpu *A. membranaceus* žaliavoje aptiktas flavononas likviritigeninas, izoflavonoidai - formononetas, pratenseinas, izomukronulatis ir kiti. [37] Taip pat nustatyta, jog *Astragalus* genties augalų žaliavose kaupiamos fenolinės rūgštys. Pavyzdžiui, *A. membranaceus* žaliavoje aptinkamos homogentizino, protokatechininė, gentisinė, chlorogeninė, p-hidroksibenzoinė, vanilinė, kavos, ferulinė, kumaro, cinamoninė ir kitos fenolinės rūgštys. [49] Pastarąjį dešimtmetį vis daugiau tyrimų atliekama su kulkšnių genties augalais, siekiant iširti jų bioaktyvumą, farmakologines savybes bei galimą pritaikymą ligų gydyme. [37] Natūraliai augančių ir kultivuojamų kulkšnių rūšių žaliavose biologiškai aktyviųjų junginių kokybinė ir kiekybinė sudėtis gali skirtis. Todėl gali kisti ir iš jo paruoštų fitofarmacinių preparatų veiksmingumas bei galimas pritaikymas ligų gydyme. [38] Lietuvos teritorijoje aptinkamos 4 kulkšnių genties rūšys yra saldžialapė kulkšnė (*A. glycyphyllos* L.), smiltyninė kulkšnė (*A. arenarius* L.), juodadantė kulkšnė (*A. danicus* Retz.) ir ilguolinė kulkšnė (*A. cicer* L.). Kai kurios iš jų, kaip ilguolinė kulkšnė (*A. cicer* L.) yra įrašytos į Lietuvos raudonąją knygą. [40] Ilguolinė kulkšnė (*Astragalus cicer* L.) – daugiametis, šaltojo sezono ankštinis augalas.

*Astragalus cicer* L. šaknų sistemą sudaro trumpa ir išsišakojusi liemeninė šaknis bei tankią masę sudarantys šakniastiebiai. Ilguolinės kulkšnės šaknys neįsiskverbia į dirvožemį taip giliai kaip pavyzdžiui augalo liucernos, paprastai iki 1m gylio. *A. cicer* stiebai tuščiaviduriai, mėsingi, auga iki 1,2m aukščio. Augalo lapai pailgi, lacentiški, sudėtiniai: nuo 10 iki 13 porų lapelių, apaugusių plaukeliais, yra priaugę prie bendro lapkočio. Žiedyną sudaro iki 60 nuo šviesiai geltonos iki baltos

spalvos žiedelių. Augalo sėklos – nuo blyškiai geltonos iki juodos spalvos (priklausomai nuo augalo brandos), padengtos storu apsauginiu sluoksniu. Lietuvoje ilguolinė kulkšnė labai retai aptinkama. Auga sausuose miškuose ar pamiškėse ar sausuose šlaituose. [39, 40]



**3 pav. *Astragalus cicer* L.**

#### 4.4.3. *Astragalus* L. panaudojimas medicinoje

*Astragalus* L. genties rūšių augalinės žaliavos yra plačiai vartojamos tradicinėje kinų medicinoje, įvairių ligų, įskaitant širdies bei kraujagyslių, smegenų kraujagyslių, inkstų ligų, virškinimo sutrikimų ir kitų būklių gydymui bei profilaktikai. Šiuolaikinėje kinų medicinoje *Astragalus* genties augalai naudojami atskirai ar kartu su kitais vaistiniais augalais piliulių ar kapsulių forma. Taip pat gaminami injekciniai tirpalai į veną ar raumenį. [41]

Džiovinotos įvairių *Astragalus* genties rūšių šaknys kinų medicinoje vartojamos peršalimo gydymui ir gripo simptomų lengvinimui, žolė – imuninės sistemos stiprinimui, lėtiniam viduriavimui, edemų, cukrinio diabeto gydymui. Pasižymi kardioprotekcinio veikimu. [42].

Manoma, kad *Astragalus* genties rūšių gydomąsias savybes ir pritaikomumą ligų gydyme gali lemti augalų kaupiami antioksidantai. [37]

*Astragalus mongholicus* yra vaistinis augalas, kuris įrašytas į Europos farmakopėją (7 bei 8 leidimas). Pagrindiniai aktyvieji *A. mongholicus* junginiai yra triterpeniniai saponinai ir polisacharidai, dėl kurių šis augalas pasižymi antioksidaciniu aktyvumu ir, kaip aprašyta farmakopėjose bei tradicinės medicinos šaltiniuose, *Astragalus* augalo šaknis gali būti vartojama kaip papildoma priemonė peršalimo simptomų gydymui.

*In vivo* ir *in vitro* tyrimais įrodyta, kad *A. membranaceus* turi imuninę sistemą apsaugantį poveikį. [42]

Tos pačios genties įvairių rūšių augalai gali pasižymėti panašia fitochemine sudėtimi, kuri gali lemti panašų augalų biologinį poveikį. Dėl to, tos pačios *Astragalus* genties augalai gali būti pritaikomi tų pačių ligų gydymui ir profilaktikai.

## 5. TYRIMO METODIKA IR METODAI

### 5.1. Tyrimų objektas

Suminiam fenolinių junginių kiekiui nustatyti ir antioksidaciniam aktyvumui įvertinti naudota *A. cicer* (laukinis ekotipas, katalogas nr. 71) žaliavos. Ilguolinių kulkšnių (*Astragalus cicer* L.) žaliavos kultivuotos centrinėje Lietuvos dalyje (55°23'49"N; 23°51'40"E).

Kolekcija įrengta 2012m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centre, Žemdirbystės instituto bandymų laukuose. Kolekcija pasėta birželio mėnesį. Kolekcija auginta vidutinio sunkumo priemolio rudžemyje, kuriame armuo 25-30 cm, pH 6,5-7,0, humuso 2,0-2,4 %. Be to, tos pačios veislės ir selekcinės medžiagos pasėtos 4 pakartojimais, 2,5 m<sup>2</sup> laukeliais: po 2 eilutes, kurių ilgis 5m., atstumas tarp numerio eilučių – 0,5m., atstumas tarp skirtingų numerių – 0,5m.

Žaliavos buvo renkamos 2013-2014m. žydėjimo stadijoje bei 2014m. krūmijomosi stadijoje. Antrųjų auginimo metų antžeminės dalies mėginiai suskirstyti į dar du mėginius. Iš pirmojo mėginio gautas antžeminės dalies mėginys, o kitas mėginys išskirstytas į morfologines augalo dalis: stiebai, lapai, žiedai. Taip pat – daigintas sėklas, želmenis. Surinkti mėginiai atsargiai plauti vandeniui, skalauti distiliuotu vandeniui, džiovinti ant filtrinio popieriaus. Žaliavos smulkintos, 15min. laikytos 105 ° C, džiovintos 65±1 ° C džiovyklėje, vėliau vėl smulkintos ir sijotos. Pusė mėginio liofilizuota. Žaliavų mėginiai apdoroti tą pačią dieną, kai buvo nuskinti.

Ilguolinių kulkšnių žaliavų mėginius sudaro: pirmųjų auginimo metų (2013 m.) antžeminė augalo dalis ir sėklos. Antrųjų auginimo metų (2014 m.) antžeminė augalo dalis bei atskiros morfologinės dalys (žiedai, lapai, stiebai), bei daigintos sėklos, želmenys. Taip pat krūmijomosi metu surinkta žaliava (2014 m. rugsėjo 2 d.), kuri džiovinta įprastai ir liofilizuojant.

### 5.2 Medžiagos ir reagentai

Fenolinių junginių nustatymui naudotas galo rūgšties monohidratas (≥98,0%), įsigytas iš Sigma-Aldrich chemie GmbH (Kinija), natrio karbonatas (99,5-100,5%) įsigytas iš Sigma-Aldrich chemie GmbH (Prancūzija) bei Folin-Ciocalteu fenolinis reagentas (2M) įsigytas iš Sigma-Aldrich chemie GmbH (Šveicarija). Antioksidacinio aktyvumo nustatymo tyrimams naudoti DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo) (95%) radikalas įsigytas iš Alfa Aesar GmbH & Co (Karlsruhe, Vokietija), rutino hidratas (≥94%) įsigytas iš Sigma-Aldrich chemie GmbH (Vokietija), heksametilentetraminas (≥99,5%) įsigytas iš Sigma-Aldrich chemie GmbH (Rusija), natrio karbonatas (99,5-100,5%) įsigytas iš Sigma-Aldrich chemie GmbH (Prancūzija), aliuminio chlorido heksahidratas (≥95%), acto rūgštis (100%) įsigyti iš Carl Roth GmbH (Vokietija), bevandenis geležies (II) chloridas (99,5%), ferozinas (≥97,0%)



įsigytas iš Sigma-Aldrich chemie GmbH (JAV), ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis), įsigytas Sigma-Aldrich chemie GmbH (Prancūzija), kalio persulfatas, įsigytas Sigma-Aldrich chemie GmbH (Prancūzija). Visi naudoti reagentai yra analitinio švarumo. Taip pat naudotas 96% etanolis, įsigytas iš UAB Stumbras (Kaunas, Lietuva) bei išgrynintas vanduo.

### 5.3. Naudota aparatūra

Ultragarso vonelė „ElmaSonic S40H“ (Elma Schmidbauer GmbH, Vokietija), orbitalinė kratyklė „IKA®KS 130 basic (Vokietija), spektrofotometras „Genesys 2“ (Spectronic, JAV).

### 5.4. Tyrimų metodai

#### 5.4.1. Tiriamųjų mėginių paruošimas

Ilgolinių kulkšnių ekstraktai buvo ruošiami 0,1 g tiriamosios žaliavos užpilant 10ml 70% (V/V) etanoliumi (1:100). Toliau mėginiai veikiami 15min., esant  $50 \pm 5$  °C temperatūrai, ultragarso vonelėje ir filtruojami pro popierinį filtrą į matavimo kolbą. Žaliavų likučiai ant filtro praplaunami 70% (V/V) etanoliumi iki 10ml tūrio. Taip paruošta 30 ilguolinės kulkšnės ekstraktų.

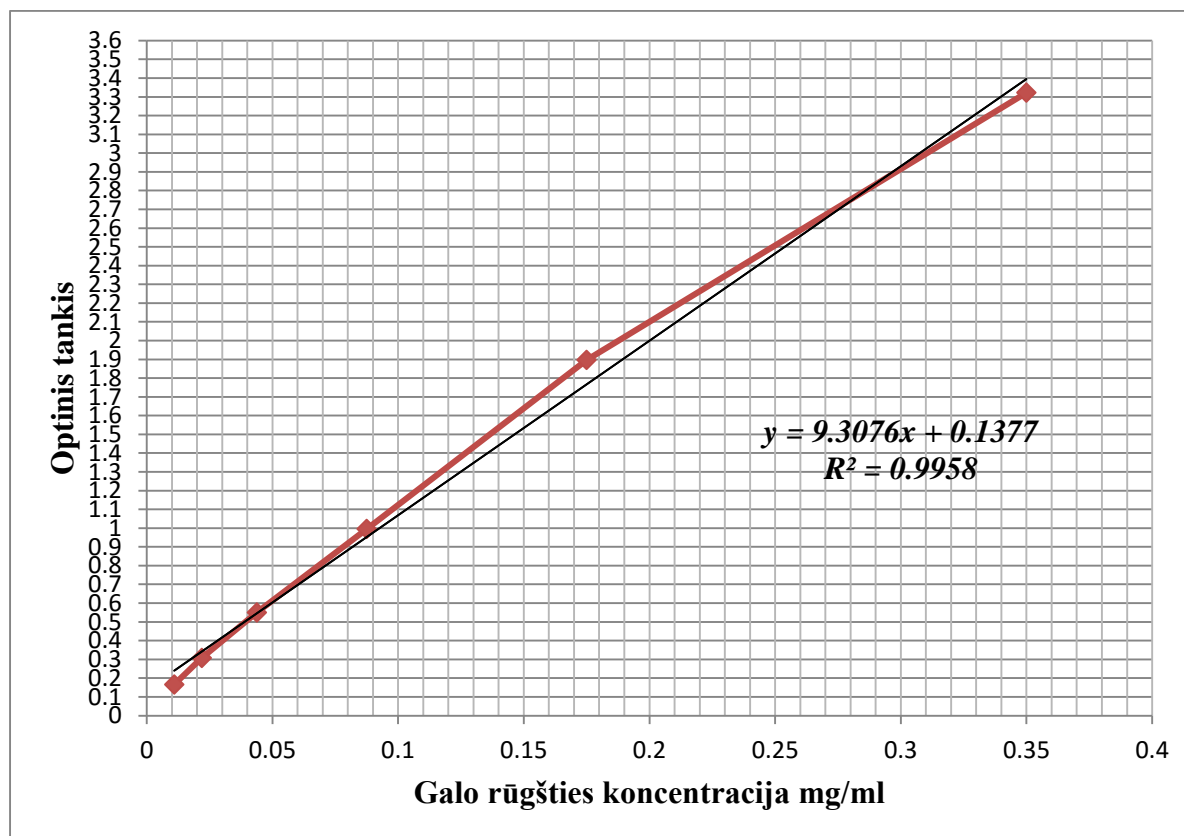
#### 5.4.2. Reagentų paruošimas

1000ml 70% etanolinio tirpalo (V/V) paruošiama matavimo cilindre 665ml 96% (V/V) etanolio praskiedžiant 335ml išgryninto vandens. 100ml 0,2 N Folin-Ciocalteu reagento paruošiama, 10ml 2M Folin-Ciocalteu reagento tirpalo matavimo kolboje praskiedžiant išgrynintu vandeniu iki 100ml. 100ml 7,5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tirpalo paruošiama matavimo kolboje, ištirpinant 7,5 g bevandenio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  miltelių 100ml išgryninto vandens. 100ml 33% acto rūgšties tirpalo paruošiama, 33ml 99,8% ledinės acto rūgšties matavimo kolboje praskiedžiant iki 100ml išgrynintu vandeniu. 50ml 10% aliuminio chlorido tirpalo paruošiama 5,0 g aliuminio chlorido miltelių, ištirpinant 50ml išgryninto vandens matavimo kolboje. 50ml 5% heksametilentetramino tirpalo paruošiama, 2,5g heksametilentetramino miltelių ištirpinant matavimo kolboje 50ml išgryninto vandens. 25ml rutino etanolinio tirpalo paruošiama, 99% grynumo 0,025 g rutino miltelių kruopščiai ištirpinant matavimo kolboje 25ml 70% (V/V) etanolinio tirpalo. 50ml  $6 \times 10^{-5}$  M DPPH (2,2-difenil-1-pikrikhidrazilas) tirpalo paruošiama, tiksliai atsveriant 0,00118 g chemiškai švaraus DPPH reagento miltelių ir juos ištirpinant 50ml tamsaus stiklo butelyje 96% (V/V) etanolyje. Kiekvieną dieną ruošiamas šviežias DPPH tirpalas, kuris laikomas tamsaus stiklo talpoje. 25ml 2mM  $\text{FeCl}_2$  tirpalo paruošiama, 0,0063g tiksliai atsvertų  $\text{FeCl}_2$  miltelių ištirpinant

matavimo kolboje 25ml išgryninto vandens. Kaip ir DPPH tirpalas,  $\text{FeCl}_2$  tirpalas kiekvieną dieną ruošiamas šviežias. 25ml 5mM ferozino tirpalo paruošiama, tiksliai atsvertus 0,0616g ferozino miltelius ištirpinant matavimo kolboje 25ml išgryninto vandens. 50ml ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis) tirpalo paruošiama, tiksliai atsvertus 0,0548g ABTS miltelius ištirpinus 50ml distiliuoto vandens tamsaus stiklo buteliuke bei pridendant 200 $\mu$ l 70mM kalio persulfato tirpalo. Paruoštas tirpalas laikomas apsaugotas nuo šviesos poveikio 16val. 50ml 70mM kalio persulfato tirpalo paruošiama, tiksliai atsvertus 0,000945g kalio persulfato miltelius ištirpinant matavimo kolboje 50ml išgryninto vandens.

#### 5.4.3. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

Spektrofotometriniu metodu, naudojant Folin-Ciocalteu reagentą, buvo nustatinėjamas bendrasis fenolinių junginių kiekis ilguolinių kulkšnių žaliavose. Analizei atlikti, 1ml tiriamojo ekstrakto (1:100) sumaišoma su 5ml 0,2N Folin-Ciocalteu reagento, o po 2-3min pridinama 4ml 7,5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tirpalo. Praėjus 60min., esant 765nm nustatytam šviesos bangos ilgiui, o kaip palyginamąjį tirpalą naudojant išgrynintą vandenį, spektrofotometru matuojamas optinis tankis. Analizei naudojamų ekstraktų optinis tankis matuojamas po tris kartus iš kiekvieno ekstrakto.



4 pav. Galo rūgšties kalibracinė kreivė (n=3)

Bendras fenolinių junginių kiekis apskaičiuojamas, remiantis kalibracine galo rūgšties kreive, taikant formulę bei išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentais (GRE):

GRE (mg/g) =  $c \times V/m$ , kur:

$c$  - galo rūgšties koncentracija (mg/ml);

$V$  - pagaminto ekstrakto tūris (ml);

$m$  – atsvertos žaliavos kiekis (g);

#### 5.4.4. Bendrojo flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

Bendrojo flavonoidų kiekio nustatymui ruošiami tiriamasis ir lyginamasis tirpalai. Tiriamasis tirpalas ruošiamas sumaišius 1ml tiriamojo ekstrakto (1:100) su 10ml 96% (V/V) etanolio, 0,5ml 33% acto rūgšties, 1,5ml 10% aliuminio chlorido tirpalo, 2ml 5% heksametilentetramino tirpalo bei visas mišinys 25ml kolbutėje skiedžiamas išgrynintu vandeniu iki žymės. Po 30min. matuojamas tiriamojo tirpalo absorbcijos dydis. Gauta reikšmė lyginama su palyginamojo tirpalo absorbcijos dydžiu, esant nustatytam 407nm bangos ilgiui.

Palyginamasis tirpalas ruošiamas sumaišius 1ml etanolinio ekstrakto (1:100) su 10ml 96% etanolio, 0,5ml 33% acto rūgšties. Visas mišinys 25ml kolbutėje praskiedžiamas išgrynintu vandeniu iki žymės.

Gautas absorbcijos koeficiento dydis lyginamas su etaloninio rutino tirpalo, kuris kaip ir palyginamasis rutino tirpalas ruošiamas vietoj 1ml tiriamojo ekstrakto pridėdant 1ml etanolinio rutino tirpalo, absorbcijos koeficientu.

Bendras flavonoidų apskaičiuojamas, taikant formulę ir išreiškiamas mg/g:

$$X \left( \frac{mg}{g} \right) = \frac{m_R \times A \times V}{m \times A_R \times V_R} \times 1000;$$

$m_R$  – rutino masė (g), skirta etaloninio rutino tirpalo gamybai;

$A$  – augalinio ekstrakto tiriamojo tirpalo absorbcijos dydis;

$V$  – augalinio ekstrakto tūris (ml);

$m$  – augalinio bandinio masė (g), sunaudota ekstraktui paruošti;

$A_R$  – etaloninio rutino tirpalo absorbcijos dydis;

$V_R$  – etaloninio rutino tirpalo tūris (ml).

#### 5.4.5. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas fotometriniu DPPH radikalų surišimo metodu

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo) metodas remiasi elektronų perdavimo reakcijomis, kurių metu vyksta radikalų surišimas. Todėl šis metodas yra taikomas antioksidacinio aktyvumo įvertinimui atlikti. Analizei vykdyti, mėginys ruošiamas 50 μl tiriamojo augalinio etanolinio ekstrakto (1:100) sumaišius su 2 ml  $6 \times 10^{-5}$  M DPPH tirpalo 1 cm kvarcinėje kiuvetėje. Tuščias bandinys taip pat ruošiamas 1 cm kvarcinėje kiuvetėje, 50 μl 70% (V/V) etanolio sumaišius su 2 ml  $6 \times 10^{-5}$  M DPPH tirpalo. Kiekvienas ekstraktas spektrofotometru matuojamas po tris kartus, esant nustatytam 515 nm šviesos bangos ilgiui ir kaip palyginamąjį tirpalą naudojant 70% (V/V) etanolį. Mėginių matavimas vyksta tol, kol pasiekama pusiausvyra (30 min).

Antiradikalinis ekstraktų aktyvumas apskaičiuojamas, taikant formulę, ir išreiškiamas procentais:

$$\text{DPPH surišimas} = [(A_b - A_a) / A_b] \times 100\%;$$

$A_b$  – tuščio bandinio absorbcijos dydis ( $t = 0$  min);

$A_a$  – bandinio su tiriamuoju ekstraktu absorbcijos dydis (po 30 min).

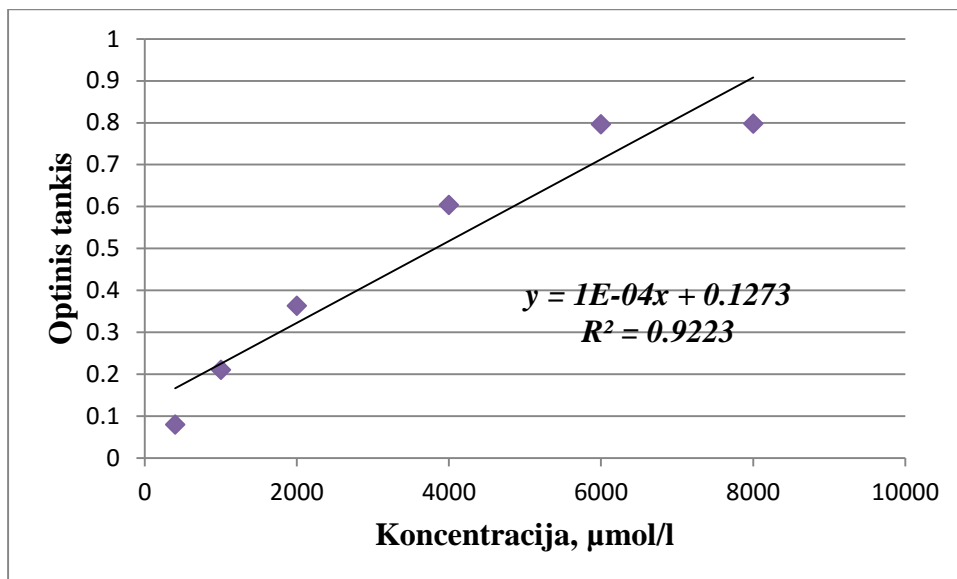
#### 5.4.6. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS radikalų - katijonų surišimo metodu

ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfono rūgštis) metodas remiasi elektronų perdavimo reakcijomis (aktyvuotas ABTS veikia kaip vandenilio radikalo donoras), kurių metu ABTS radikalai yra sujungiami. Pirmiausia pagaminamas 2 mM motininis ABTS tirpalas: sveriamas 0,0548 g (tikslus svėrinys). ABTS reagentas ištirpinamas 50 ml išgryninto vandens, tamsaus stiklo buteliuke, kad apsaugoti nuo šviesos. Motininis tirpalas aktyvuojamas 70 mM kalio persulfato tirpalu, kruopščiai sumaišomas ir paliekamas tamsioje vietoje 15-16 val. Taip yra pagaminamas  $ABTS^{\bullet+}$ , su kuriuo reaguoja augalinės žaliavos ekstraktuose esančios BAM, pasižyminčios antiradikaliniu aktyvumu.

Gautas pradinis  $ABTS^{\bullet+}$  tirpalas skiedžiamas išgrynintu vandeniu, kol gaunama tiksli tirpalo absorbcija ( $0,800 \pm 0,03$ ), esant 734 nm bangos ilgiui.

A. *cicer* augalinių žaliavų etanolinių ekstraktų antiradikalinis aktyvumas matuojamas į 3,0 ml darbinio  $ABTS^{\bullet+}$  tirpalo įpilant 30 μl tiriamojo ekstrakto. Mišinys laikomas kambario temperatūroje, 60 min. Nustatomas absorbcijos kitimas esant 734 nm bangos ilgiui. Kiekvienas ekstraktas matuojamas ne mažiau trijų kartų. Kaip palyginamasis tirpalas naudojamas išgrynintas vanduo.

Laisvųjų radikalų surišimo geba išreiškiama trolokso ekvivalentais (TE), remiantis trolokso kalibracine kreive: (5pav):



5 pav. Trolokso kalibracinė kreivė ABTS radikalų-katijonų sujungimo metodu (n=3)

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

c – trolokso koncentracija pagal kalibracijos kreivę (µmol/l) ;

V- pagaminto ekstrakto tūris (ml);

m – atsvertos žaliavos kiekis (g);

#### 5.4.7. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas fotometriniu Fe<sup>2+</sup> jonų surišimo metodu

Antioksidacinis fenolinių junginių aktyvumas priklauso ir nuo fenolinių junginių chelatinųjų savybių. Jos įvertinamos matuojant Fe(II) ir ferozino komplekso sumažėjimą, esant nustatytam 562nm šviesos bangos ilgiui. Analizei atlikti, 1ml tiriamojo ekstrakto (1:100) sumaišoma su 50µl 2mM FeCl<sub>2</sub> tirpalo. Praėjus 5min. pridedama 0,2ml 5mM ferozino tirpalo, gerai sumaišoma, paliekama 10min. pastovėti kambario temperatūroje ir matuojama tirpalo absorbcija, esant 562nm bangos ilgiui. Kiekvienas ekstraktas matuojamas po tris kartus. Palyginamuoju tirpalu naudojamas 70% (V/V) etanolis. Tuščias bandinys paruošiamas sumaišius 1ml 70% (V/V) etanolio su 50 µl 2mM FeCl<sub>2</sub> ir 0,2 ml 5mM ferozino tirpalais.

Ekstraktų gebėjimas sudaryti chelatus išreiškiamas procentais ir apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Fe}^{+2} \text{ surišimas} = [(A_b - A_a) / A_b] \times 100\% ;$$

A<sub>b</sub> – tuščio bandinio absorbcijos dydis;

$A_a$  – tiriamojo ekstrakto paruošto bandinio absorbcijos dydis.

## 5.5 Duomenų analizė

Gautų rezultatų statistinė analizė atlikta kompiuterine programa „MS Excel 2013“ (Microsoft, JAV) ir Statistica 13 (StatSoft, JAV) statistiniu paketu. Statistiškai vertinant duomenis buvo apskaičiuotas matematinis vidurkis, mediana, standartinis nuokrypis, standartinė paklaida. Atliktas koreliacinio ryšio nustatymas, taikant Pirsono tiesinės koreliacijos koeficientą.

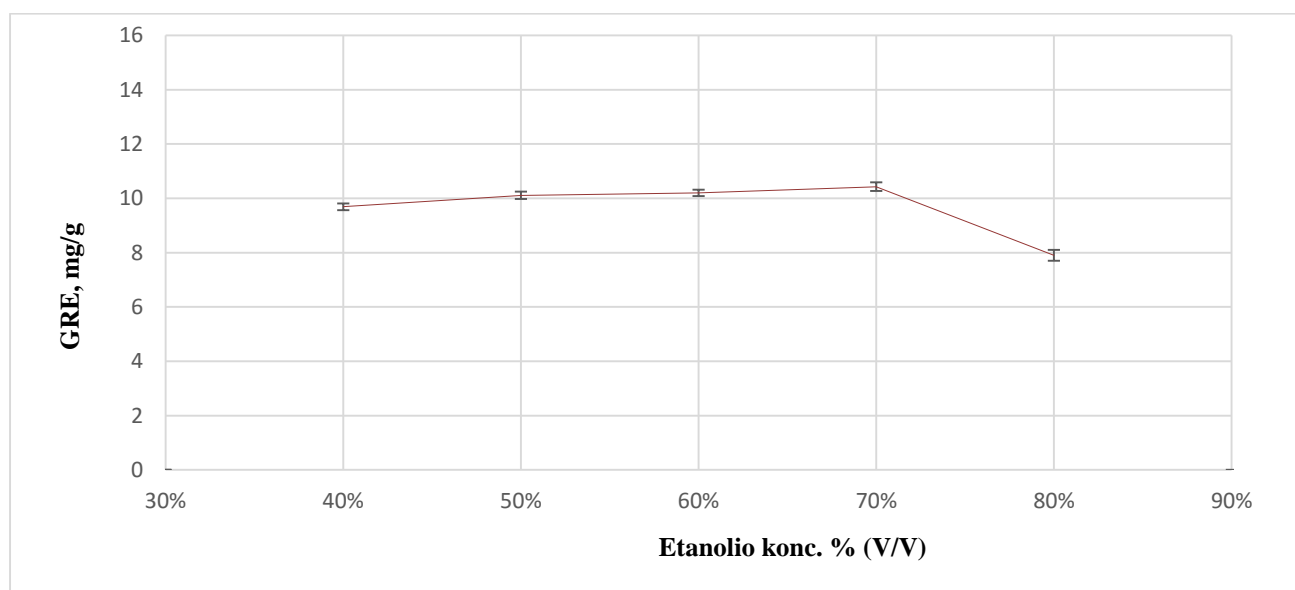
## 6. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### 6.1. Tinkamiausių ekstrakcijos sąlygų parinkimas

Vieni svarbiausių parametru, nuo kurių priklauso veikliųjų junginių ekstrakcijos kokybiniai ir kiekybiniai rodmenys, yra ekstrakcijos trukmė, ekstrakcijos tirpiklio prigimtis ir kiekis, ekstrakcijos temperatūra. Dėl skirtingų tos pačios rūšies augalų žaliavų savybių, kurias gali lemti ne vienodos augalų augimo sąlygos, klimato kaita, skirtingos augvietės, žaliavos apdorojimo būdas ir kiti išoriniai veiksniai, būtina optimizuoti ekstrakcijos sąlygas kiekvienam konkrečiam augalui. Pasirinktas ekstrakcijos tirpiklis yra vandens-etanolio mišinys, dėl savo, kaip organinio tirpiklio, mažesnio toksiškumo žmogui bei įvairiapusiško pritaikomumo skirtingų polifenolinių junginių ekstrakcijai. [17,21,29] Nuspręsta optimizuoti ekstrakcijos sąlygas *Astragalus cicer* L. žaliavai - parinkti optimaliausią ekstrakcijos trukmę bei ekstrahento poliškumą.

#### 6.1.1. Ekstrahento poliškumo parinkimas

Taikytas paprastosios maceracijos metodas, norint išsiaiškinti optimaliausią ekstrahentą *A. cicer* žaliavoms ekstrahuoti. Pagaminti 40%, 50%, 60%, 70%, 80% (V/V) koncentracijos etanoliniai ekstraktai, o žaliavos - ekstrahento santykis 1:100. Tyrimui naudotos pirmųjų auginimo metų *A. cicer* augalų antžeminės dalies žaliavos. Ruošta po tris mėginius kiekvienam skirtingos koncentracijos ekstraktui. Tikslus antžeminės dalies svėrinys (0,100g) užpilamas atitinkamos koncentracijos etanolio-vandens mišiniu ir 1 val. purtoma automatinėje kratyklėje bei laikoma 24val. tamsioje, sausoje vietoje. Praėjus 24val., vėl 1 val. purtoma, o gautas ekstraktas nufiltruojamas. Gauti rezultatai pateikiami grafike (5 pav).

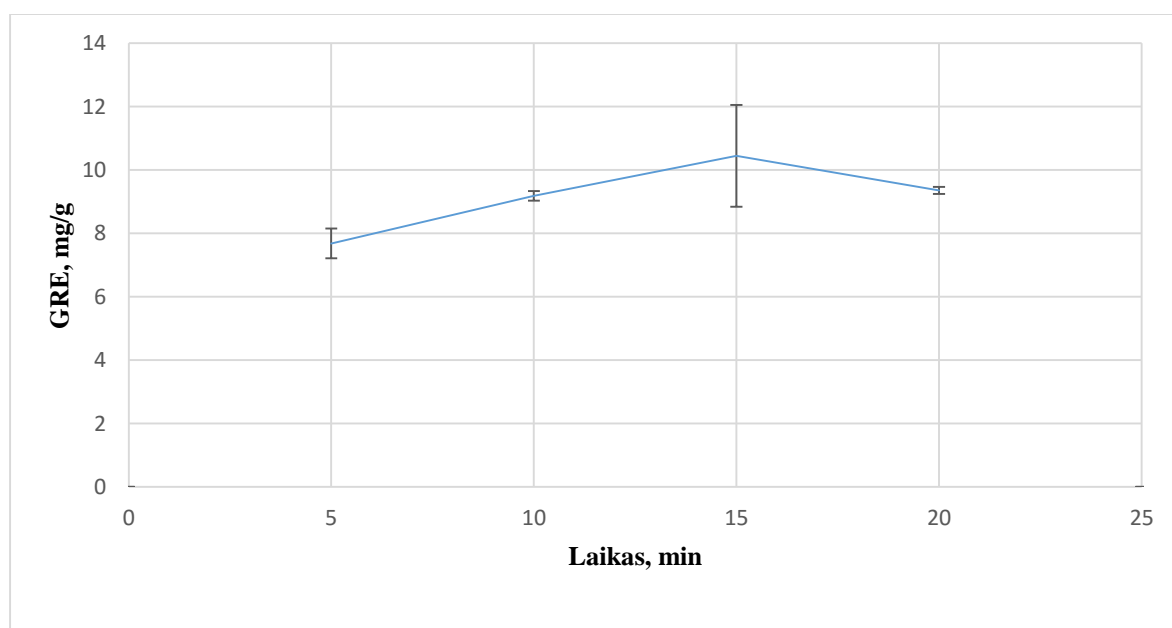


**5pav. Ekstrahento poliškumo įvertinimas paprastosios maceracijos būdu, *A. cicer* pirmųjų auginimo metų augalų antžeminės dalies mėginiuose (vidurkis  $\pm$  standartinė paklaida). GRE galo rūgšties ekvivalentai. ( $n=3$ )**

Iš grafike pateiktų duomenų (5pav.) matyti, kad daugiausia fenolinių junginių išekstrahuojama su 70% (V/V) etanolio-vandens mišiniu ( $10,428 \pm 0,155$  mg/g). Tolimesniems tyrimams pasirenkamas 70% (V/V) etanolis dėl didesnės fenolinių junginių gavybos išeišos.

### 6.1.2. Ekstrakcijos ultragarsu trukmės parinkimas

Ekstrakcijos ultragarsu laiko nustatymui naudojama ultragarso vonelė, 70% (V/V) etanolio-vandens mišinys, pirmųjų auginimo metų *A. cicer* antžeminės dalies žaliavos. Ekstrakcijos tirpiklio ir žaliavos santykis 1:100. Paruošti bandiniai veikiami ultragarso vonelėje 5, 10, 15, 20 min. Atsižvelgiant į anksčiau vykdytų tyrimų rezultatus, buvo pasirinkta vykdyti ekstrakciją ultragarsu, esant 50° C temperatūrai. [29] Ruošiama po tris mėginius kiekvieno laiko intervalui. Gauti rezultatai pateikiami grafike (6pav.):



**6 pav. Ekstrakcijos ultragarsu trukmės įvertinimas *A. cicer* pirmųjų auginimo metų antžeminės augalo dalies mėginiuose (vidurkis  $\pm$  standartinė paklaida). GRE - galo rūgšties ekvivalentai. ( $n=6$ )**

Iš grafike pateiktų rezultatų matyti, kad daugiausia fenolinių junginių išekstrahuojama, bandinius veikiant ultragarsu 15min. ( $10,450 \pm 1,608$ mg/g). Ilgėjant ekstrakcijos trukmei, fenolinių



junginių išeiga mažėja (20min. –  $9,356 \pm 0,110$  mg/g). Todėl tolimesniems tyrimams pasirinktas ekstrakcijos laikas – 15min. Ekstrakcijos atlikimas paprastosios maceracijos metodu užima ženkliai daugiau laiko nei ekstrakcijos atlikimas ultragarsu (atitinkamai 26val. ir 15min.). Be to, vykdant ekstrakciją ultragarsu, išekstrahuojamas didesnis bendras fenolinių junginių kiekis ( $10,450 \pm 1,608$ mg/g) nei vykdant ekstrakciją paprastosios maceracijos būdu ( $10,428 \pm 0,155$  mg/g). Todėl tikslingiau rinktis ekstrakciją ultragarsu.

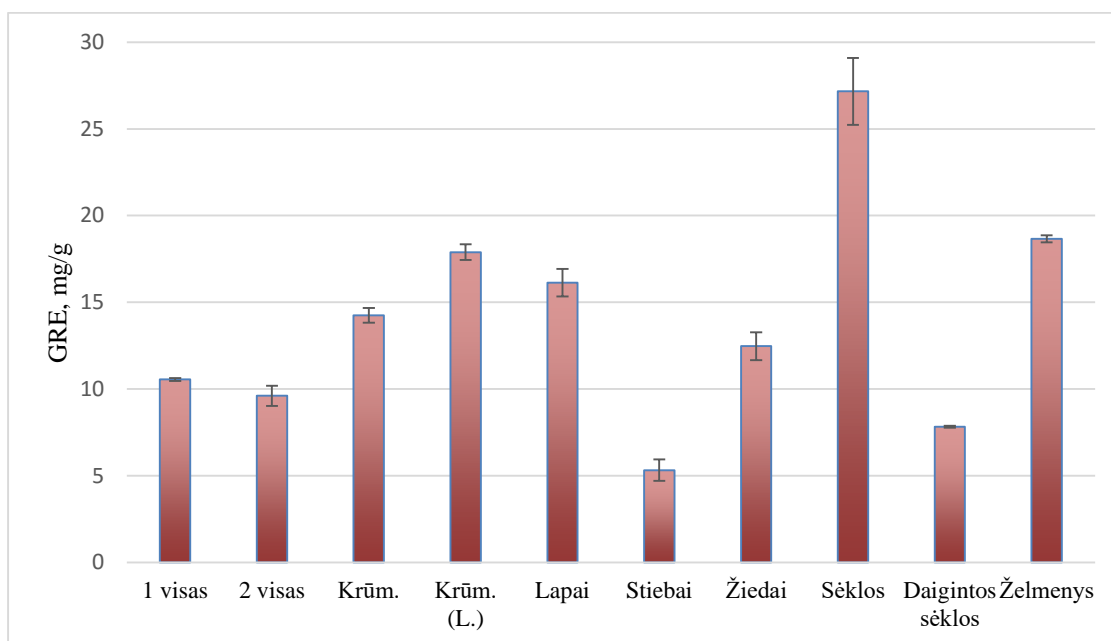
Apibendrinant optimaliausių ekstrakcijos sąlygų parinkimo rezultatus, galima teigti, kad gauti duomenys yra panašūs su kitų mokslininkų atliktų ekstrakcijos sąlygų optimizavimo rodmenimis. [29,50] Tolimesniems tyrimams visų *A. cicer* žaliavų mėginių ekstraktai ruošiami, taikant ekstrakciją ultragarsu, ekstrakcijos laiko intervalą pasirenkant 15min, o ekstrakcijos temperatūrą -  $50 \pm 5^\circ\text{C}$  bei ekstrahentą - 70% (V/V) etanolio-vandens mišinį.

## 6.2. Fenolinių junginių ir flavonoidų suminio kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

Fenolinių junginių kiekybinei analizei atlikti naudojama daugelis spektrofotometrinių metodų, kurie pagrįsti skirtingais atlikimo principais ir naudojami nustatyti struktūroms, esančioms fenoliniuose junginiuose. Taikant spektrofotometriją, nustatomas suminis fenolinių junginių kiekis, kurį įvertinus nuspėjamas galimas bendras antioksidacinis aktyvumas ir pritaikomumas ligų gydyme. Atskiros fenolinės struktūros nustatinėjamos daug rečiau, nes tai sudėtingas bei labai brangus procesas. [43] Siekiant atlikti *A. cicer* žaliavų ekstraktų analizę ir tiksliau nustatyti suminius fenolinių junginių bei flavonoidų kiekius, analizės metodai buvo modifikuoti ir panaudoti kiekybinei fenolinių junginių analizei atlikti.

### 6.2.1. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas *A. cicer* žaliavose

Tyrimo metu spektrofotometriniu Folin - Ciocalteu metodu, nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis *A. cicer* žaliavose, kurios kultivuotos Lietuvoje. Gauti *A. cicer* bendrojo fenolinių junginių kiekio žaliavose duomenys pateikti **8 pav**:



**8 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis *A. cicer* 70% (V/V) etanolinių ekstraktų mėginiuose (vidurkis ± standartinė paklaida). 1 visas – pirmųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. 2 visas – antrųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. Krūm. – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta įprastai. Krūm. (L.) – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta liofilizuojant. (n=3)**

Tyrimo rezultatai parodė, kad fenolinių junginių kiekis *A. cicer* žaliavų ekstraktuose įvairuoja nuo 5,316 mg/g iki 27,165 mg/g. Pastebėtas fenolinių junginių kintamumas skirtingų auginimo metų žaliavose: didesnis fenolinių junginių kiekis nustatytas pirmųjų auginimo metų antžeminių dalių žaliavose ( $10,551 \pm 0,058$  mg/g), lyginant su antrųjų auginimo metų augalo antžeminių dalių ( $9,605 \pm 0,581$  mg/g) žaliavomis. Taip pat pastebėta, kad fenolinių junginių įvairavimas *A. cicer* žaliavose priklauso nuo augalų fenologinio tarpsnio: ženkliai didesni fenolinių junginių kiekiai įvertinti antrųjų *A. cicer* auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliavose, džiovintose įprastai, ( $14,250 \pm 0,429$  mg/g), lyginant su antrųjų auginimo metų antžeminėmis dalimis ( $9,605 \pm 0,581$  mg/g), kurios surinktos masinio žydėjimo metu. Be to, tyrimo metu nustatyta, kad žaliavos paruošimo būdas turi įtakos fenolinių junginių kiekiui ekstraktoje: krūmijimosi tarpsnio žaliavose, kurios džiovintos liofilizuojant, nustatytas didesnis fenolinių junginių kiekis ( $17,894 \pm 0,455$  mg/g) nei krūmijimosi tarpsnio žaliavose, kurios džiovintos įprastai ( $14,250 \pm 0,429$  mg/g). Tyrimai atskleidė, kad bendro fenolinių junginių kiekio rodmenims būdingas ženklus įvairavimas tarp morfologinių *A. cicer* dalių. Didžiausias bioaktyvių junginių kiekis nustatytas tiriamosiose lapų žaliavose ( $16,123 \pm 0,795$  mg/g), tuo tarpu žiedynų žaliavose nustatytas fenolinių junginių kiekis yra mažesnis ( $12,470 \pm 0,799$  mg/g). Mažiausias fenolinių junginių kiekis aptiktas *A. cicer* stiebuose ( $5,316 \pm 0,613$  mg/g).

Daugiausia fenolinių junginių nustatyta sėklose ( $27,165 \pm 1,923$  mg/g). Remiantis literatūra, tam galėjo turėti įtakos ne tik *Astragalus* L. genties sėklose kaupiamos fenolinės rūgštys ir flavonoidai, bet ir galimai ekstrakcijos metu išsiskyrę saponinai. [51,37] Daigintose sėklose ( $7,828 \pm 0,057$  mg/g) bendras fenolinių junginių kiekis ženkliai mažesnis (3,45 karto), o želmenų žaliavose fiksuojamas didesnis jų kiekis ( $18,666 \pm 0,201$  mg/g).

2012m. Naghiloo S. su kolegomis atliktame tos pačios genties augalų, *Astragalus compactus* Lam., tyrime taip pat didesnis fenolinių junginių kiekis įvertintas *A. compactus* lapų nei žiedynų žaliavose. Fenoliniai junginiai lapuose atlieka apsauginę funkciją: saugo augalo audinius nuo UV spindulių sukeltos fotodestrukcijos. Dėl šios priežasties, esant intensyviai saulės spindulių poveikiui, galima didesnė fenolinių junginių gamyba lapuose nei žieduose. [44]

Remiantis užsienio mokslininkų atliktais tyrimais, bendras fenolinių junginių kiekis kitų *Astragalus* genties augalų, *A. membranaceus*, ekstraktuose gali siekti  $22,78$  mg/g, kurių 9,13% sudaro fenolinės rūgštys. [49] Tai turi panašumų su mūsų atlikto tyrimo rezultatais. Mūsų tyrimo metu gauti duomenys parodė, kad bendras fenolinių junginių kiekis *A. cicer* sėklose yra kiek didesnis -  $27,165$  mg/g.

Deja, mokslinėje literatūroje nepavyko rasti informacijos apie *A. cicer* žaliavose kaupiamų fenolinių junginių suminį kiekį bei kintamumą.

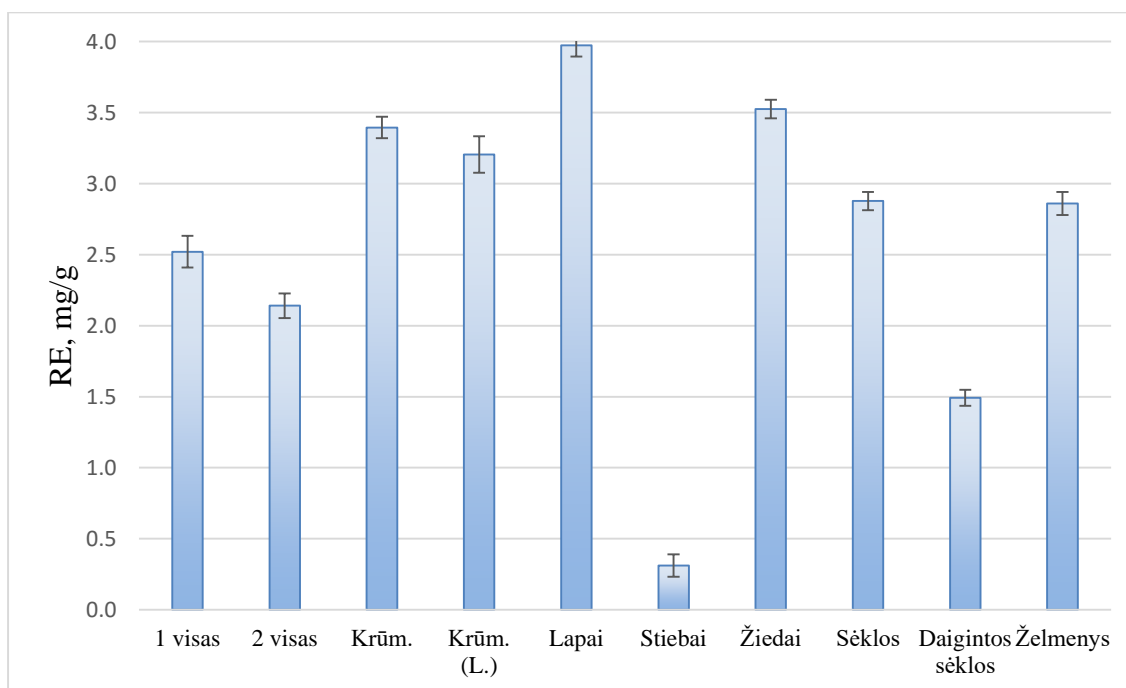
### 6.2.2. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas *A. cicer* žaliavose

Spektrofotometriniu metodu nustatytas suminis flavonoidų kiekis *A. cicer* žaliavose. Flavonoidų suminio kiekio nustatymas pasirinktu metodu yra pagrįstas reakcija tarp aliuminio chlorido ir flavonoidų, kurios metu susidaro stabilus flavonoido – aliuminio chlorido kompleksas. Flavonoidų kiekis - svarbus aspektas, norint įvertinti tiriamojo augalo antioksidacines savybes. Tyrimo rezultatai yra pateikti **10 pav.**

Tyrimo rezultatai prarodė, kad bendras flavonoidų kiekis *A. cicer* žaliavose įvairuoja nuo  $0,311$  mg/g iki  $3,974$  mg/g. Nustatyta, kad didesni flavonoidų kiekiai aptinkami pirmųjų ( $2,521 \pm 0,112$  mg/g) nei antrųjų ( $2,141 \pm 0,086$  mg/g) auginimo metų antžeminių dalių, surinktų masinio žydėjimo metu, žaliavose. Įvertinta, kad flavonoidų kiekiui ekstraktuose turi įtakos fenologinis tarpsnis: ženkliai didesnis flavonoidų kiekis nustatytas krūmijimosi tarpsnio žaliavose ( $3,396 \pm 0,075$  mg/g), lyginant su antrųjų auginimo metų antžeminių dalių žaliavomis ( $2,141 \pm 0,086$  mg/g), surinktomis masinio žydėjimo metu. Atlikus suminio flavonoidų kiekio tyrimą, pastebėta, kad krūmijimosi tarpsniu surinktose žaliavose, kurios džiovintos įprastai ( $3,396 \pm 0,075$  mg/g), nustatytas didesnis kiekis flavonoidų nei krūmijimosi tarpsnio žaliavose, kurios apdorotos liofilizacijos būdu ( $3,205 \pm 0,128$

mg/g). Nustatant morfologinio kintamumo duomenis, nustatyta, kad lapų žaliavose sukaupiama daugiau flavonoidų ( $3,974 \pm 0,080$  mg/g), šiek tiek mažiau žieduose ( $3,525 \pm 0,065$  mg/g), o mažiausiai - stiebuose ( $0,311 \pm 0,079$  mg/g). Palyginus sekoje sėklos, daigintos sėklos ir želmenys, stebimas flavonoidų kiekio kintamumas išsidėstė sekančiai: sėklų ( $2,878 \pm 0,064$  mg/g)  $\geq$  želmenų ( $2,861 \pm 0,081$  mg/g)  $>$  daigintų sėklų ( $1,491 \pm 0,056$  mg/g). Suminio flavonoidų kiekio kaupimosi dėsningumai sekoje sėklos-daigintos sėklos-želmenys sutampa su bendru fenolinių junginių kiekio įvairavimo tendencijomis.

Nustatyta, kad ilguolinės kulkšnės žiedų žaliavose flavonoidai sudaro 28,27% visų fenolinių junginių kiekio. Šiek tiek mažesnę dalį (24,65%) visų fenolinių junginių, flavonoidai sudaro lapų žaliavose. Tuo tarpu panašią dalį visų fenolinių junginių flavonoidai (atitinkamai 23,89% ir 22,29%) sudaro pirmųjų ir antrųjų auginimo metų augalų dalyse. Flavonodai sėklose, daigintose sėklose bei želmenyse atitinkamai užima 10,59%, 19,05%, 15,33% visų fenolinių junginių kiekio. Mažiausias flavonoidų santykinis kiekis nustatytas *A. cicer* stiebuose (5,85%).



**10 pav. Bendras flavonoidų kiekis *A. cicer* žaliavų 70% (V/V) etanolinių ekstraktų mėginiuose (vidurkis  $\pm$  standartinė paklaida). 1 visas – pirmųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. 2 visas – antrųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. Krūm. – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta įprastai. Krūm. (L.) – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta liofilizuojant. RE - rutino ekvivalentai. (n=3)**

Remiantis Lietuvoje atliktų *Astragalus* genties augalų tyrimų duomenimis, bendrasis flavonoidų kiekis *A. glycyphyllos* ekstraktuose varijuoja 0,96 mg/g – 20,38 mg/g ribose. Pastebėta ta pati tendencija,

kaip ir *A. cicer* bendrojo flavonoidų kiekio nustatymo metu: didžiausi flavonoidų kiekiai įvertinti lapų ( $20,38 \pm 0,31$  mg/g) bei žiedų ( $15,23 \pm 0,16$  mg/g) žaliavose. [50]

Remiantis užsienio mokslininkų tyrimų duomenimis, *A. cicer* žaliavose identifikuoti flavonoidai yra rutinas bei hiperozidas. [25] Asgarpanah ir kolegų atlikto suminio flavonoidų kiekio tyrimo kitų *Astragalus* genties augalų, *A. squarrosus* Bunge, žaliavose metu įvertinta, kad bendrasis flavonoidų kiekis *A. squarrosus* B. žaliavose siekia 26,0 mg/g. [52]

Deja, mokslinėje literatūroje informacijos apie *A. cicer* žaliavose kaupiamų flavonoidų suminį kiekį bei jo įvairavimo tendencijas nepavyko rasti.

### 6.3. *A. cicer* antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Daugelis vaistinių augalų kaupia įvairių struktūrų bioaktyvius junginius. Antioksidantai, įskaitant fenolinius junginius, gali veikti nepriklausomai vienas nuo kito ar sinergistiškai. Be to, šie bioaktyvūs junginiai pasižymi laisvuosius radikalus surišančiomis savybėmis. Dėl to įvairūs vaistiniai augalai gali būti sėkmingai pritaikomi įvairių ligų gydyme. Daugelio *Astragalus* genties augalų biologinis poveikis ir savybės nėra detalios žinomos. Todėl svarbu ištirti ir įvertinti *Astragalus* genties augalų antioksidacinį aktyvumą ir polifenolinių junginių pritaikymo galimybes. [37,45]

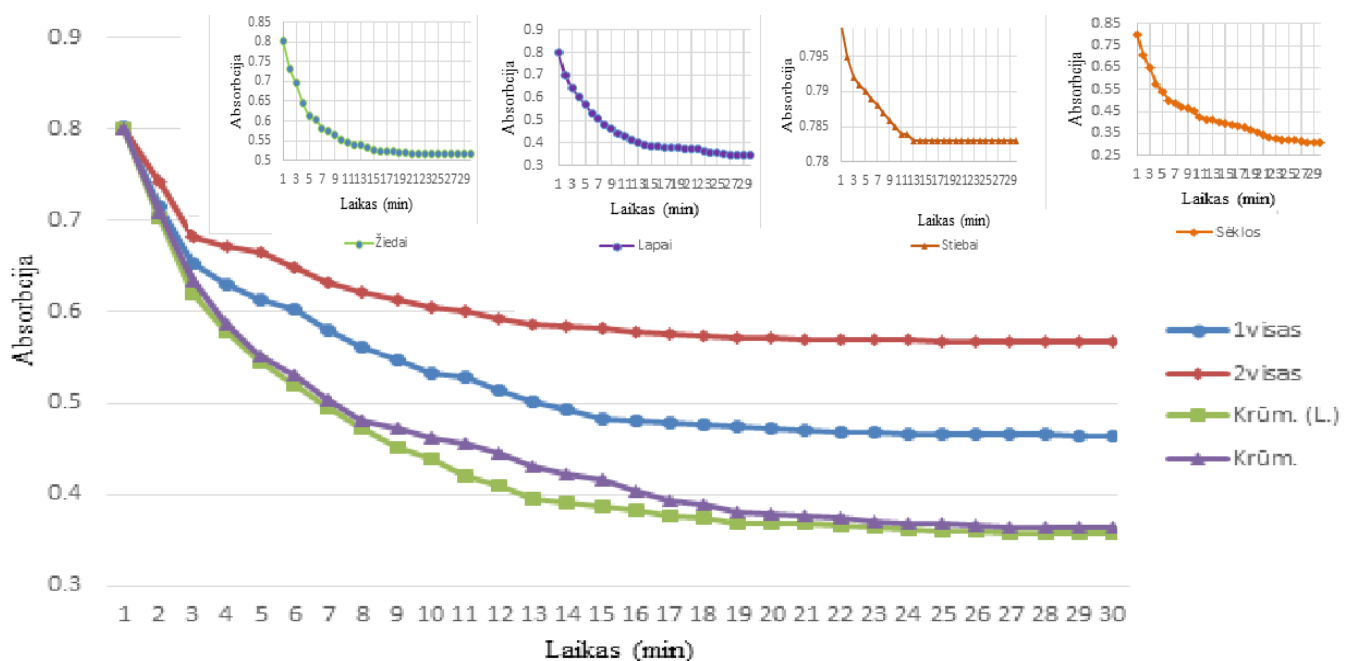
Siekiant kuo išsamiau įvertinti galimą *A. cicer* žaliavų antioksidacinį aktyvumą, ekstraktų analizei pasirinkti metodai: laisvųjų radikalų surišimo metodas (DPPH ir ABTS radikalų) ir  $Fe^{2+}$  jonų surišimo (FIC) metodas. Analizei pasirinkti metodai pasižymi skirtingu veikimo mechanizmu. DPPH ir ABTS laisvųjų radikalų sujungimo metodo esmė - augaliniame ekstrakte esančių bioaktyvių junginių gebėjimas surišti laisvuosius radikalus, kurie gali sukelti oksidacinį stresą žmogaus organizme. FIC metodo esmė – augaliniame ekstrakte esančių biologiškai aktyvių junginių gebėjimas veikti kaip chelatoriai, surišant pereinamųjų metalų ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) jonus. Šis metodas remiasi kenksmingu organizme vykstančių grandininų reakcijų nutraukimu. Tiek laisvųjų radikalų surišimo metodas, tiek ir  $Fe^{2+}$  jonų surišimo (FIC) metodas pasirinkti, siekiant įvairiapusiškiau įvertinti *A. cicer* žaliavų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą.

#### 6.3.1. *A. cicer* augalinių žaliavų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH surišimo metodu

Pirmiausia buvo atlikti tyrimai, norint įvertinti DPPH inaktyvavimo kinetinius parametrus. Mokslinėje literatūroje pateikiama, kad laisvųjų radikalų surišimas, sumaišius reagentus, gali būti matuojamas po įvairaus laiko tarpo: nuo 1min. iki 240min. [34] Dėl to, nuspręsta DPPH metodą optimizuoti ir nustatyti laiką, per kurį reakcija pasiekia dinaminę pusiausvyrą. Tyrimas atliktas esant

nustatytam 515nm bangos ilgiui, kas 60s matuojant mišinio absorbciją. Metodo optimizacija atlikta su *A. cicer* pirmųjų ir antrųjų auginimo metų antžeminių dalių bei krūmijimosi tarpsnio žaliavų, džiovintų įprastai bei taikant liofilizaciją, ekstraktais. Taip pat įvertinta reaktyvavimo kinetika su atskirų *A. cicer* morfologinių dalių ( žiedų, lapų, sėklų, stiebų) ekstraktais. Absorbcijos pokyčiai bėgant laikui pateikti **11 pav.**

Tyrimo metu pastebėta, kad labiausiai tiriamųjų mėginių absorbcija kito per pirmąsias 15min., vėliau absorbcijos kitimas šiek tiek sulėtėjo. Tačiau tolimesniam tyrimui buvo pasirinkta 30min., kai absorbcijos kitimas nuo 25 iki 30min. visų žaliavų ekstraktuose buvo nežymus (1,2 – 2,0 %).

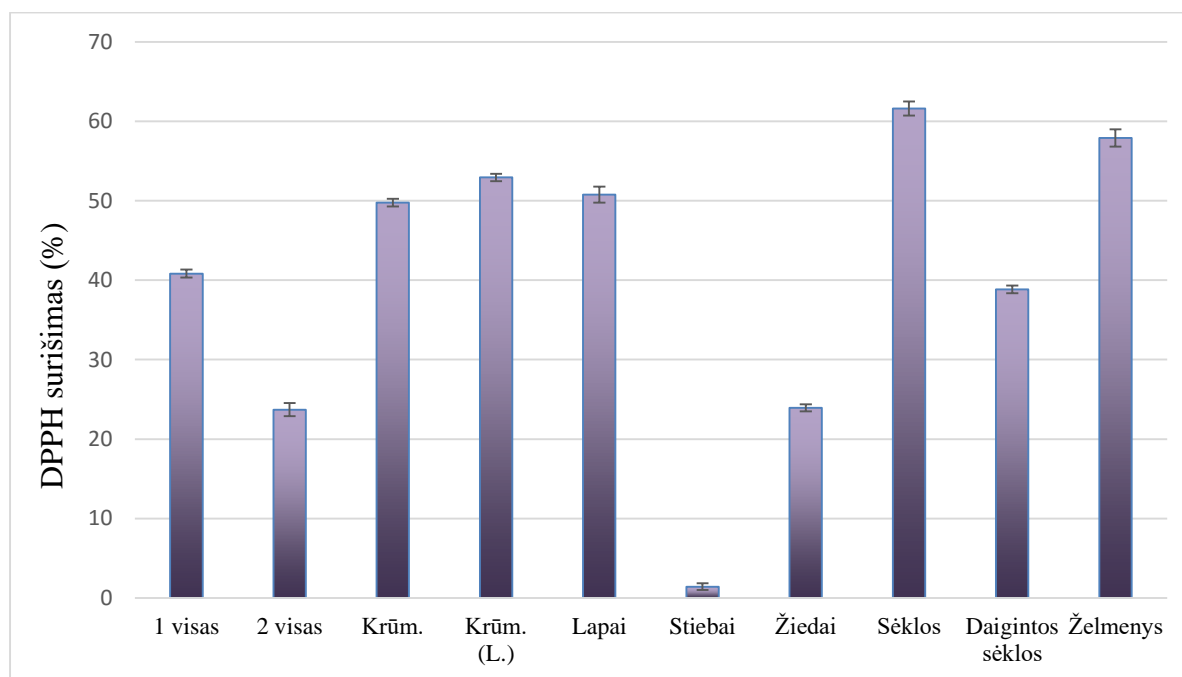


**11 pav. DPPH radikalo surišimo kinetinės kreivės *A. cicer* tiriamuosiuose žaliavų ekstraktuose. 1 visas – pirmųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. 2 visas – antrųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. Krūm. – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta įprastai. Krūm. (L.) – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta liofilizuojant.**

Laisvųjų DPPH radikalų surišimas *A. cicer* tiriamuosiuose 70% etanoliniuose ekstraktuose pateiktas **12 pav.**

*A. cicer* tiriamųjų ekstraktų DPPH radikalų surišamoji galia ženkliai įvairavo nuo 1,416 % iki 61,61 %. Ilguolinių kulkšnių augalų pirmųjų auginimo metų antžeminių dalių ekstraktuose nustatytas didesnis DPPH radikalų surišimas ( $40,824 \pm 0,508$  %), lyginant su antrųjų augalų auginimo metų antžeminių dalių ekstraktais. Be to, tyrimo metu pastebėta, kad laisvųjų radikalų surišimo gebos kintamumas priklauso nuo augalo sezoninio vystimosi etapo: krūmijimosi tarpsnio įprastai džiovintų

žaliavų ekstraktai ( $49,779 \pm 0,485$  %) pasižymėjo didesniu antiradikaliu aktyvumu nei masinio žydėjimo antžeminių dalių ekstraktai ( $23,701 \pm 0,823$  %). Įvertinta, kad žaliavos apdorojimo būdas turi įtakos augalinių ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui: krūmijimosi tarpsnio žaliavų, apdorotų liofilizuojant, ekstraktuose ( $52,944 \pm 0,465$  %) nustatyta didesnė DPPH radikalų surišamoji geba, lyginant su krūmijimosi tarpsnio žaliavų, kurios apdorotos įprastai ( $49,779 \pm 0,485$  %), ekstraktais. Antiradikalinio aktyvumo nustatymo metu, įvertinti morfologinio kintamumo duomenys: didesnis antiradikalinis aktyvumas nustatytas lapų ekstraktuose ( $50,759 \pm 1,016$  %), 2,1 karto mažesnis antioksidacinis aktyvumas pastebėtas žiedų ( $23,942 \pm 0,438$  %), o mažiausias – stiebų ekstraktuose ( $1,416 \pm 0,434$  %). Didžiausias antiradikalinis aktyvumas sekoje sėklos-daigintos sėklos-želmenys nustatytas tiriamuosiuose ilguolinių kulkšnių sėklų ekstraktuose ( $61,61 \pm 0,889$ %), šiek tiek mažesnis – želmenų ( $57,897 \pm 1,082$  %) ir, palyginti su sėklų ekstraktais, 1,6 karto mažesnis - daigintų sėklų ( $38,834 \pm 0,485$  %) ekstraktų bandiniuose.



**12 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu *A. cicer* 70% (V/V) etanoliniuose žaliavų mėginiuose (vidurkis ± standartinė paklaida). 1 visas – pirmųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. 2 visas – antrųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. Krūm. – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta įprastai. Krūm. (L.) – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta liofilizuojant. (n=3)**

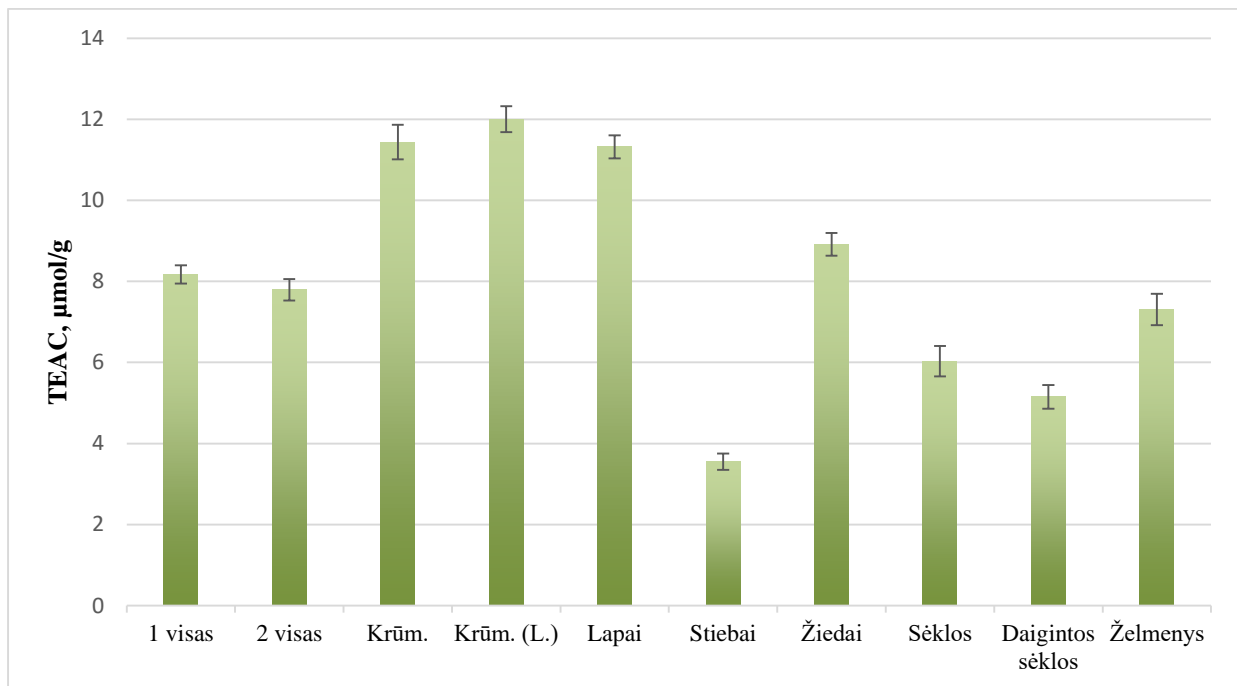
Remiantis užsienio mokslininkų tyrimų duomenimis, kitų *Astragalus* genties augalų *A. sinicus* L. etanolinių sėklų ekstraktų DPPH radikalų surišamoji geba gali siekti 84,1 %. [51] Mūsų atlikto tyrimo metu, didžiausia DPPH radikalų sujungimo galia taip pat pasižymėjo *A. cicer* sėklų ekstraktai ( $61,61 \pm 0,889$ %). Tai rodo, kad *Astragalus* L. genties sėklų ekstraktuose esama ne mažai biologiškai aktyvių,

lipofiliškų junginių. Dėl to, sėklų ekstraktai galėtų padėti apsaugoti biologines sistemas nuo įvairių oksidacinių pažeidimų, o atlikus išsamesnius tyrimus *Astragalus* L. sėklas rekomenduoti kaip potencialų antioksidantų šaltinį.

Nepavyko rasti mokslinės literatūros apie *A. cicer* augalų bei morfologinių dalių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvairavimą DPPH radikalų sujungimo metodu.

### 6.3.2 *A. cicer* augalinių žaliavų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS radikalų – katijonų sujungimo metodu

ABTS radikalų – katijonų sujungimo metodas, kaip ir DPPH radikalų surišimo metodas, yra paremtas elektronų perdavimo reakcijomis, kurių metu vyksta ABTS radikalų surišimas. Sumaišius visus reakcijos reagentus, mišinio absorbcija matuojama praėjus 60min. (nusistovėjus reakcijos dinaminei pusiausvyrai). *A. cicer* antioksidacinio aktyvumo tiriamųjų 70 % etanolinių ekstraktų įvertinimo rezultatai ABTS metodu pateikti **13 pav.**



**13 pav.** Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu *A. cicer* žaliavų mėginiuose 70% (V/V) etanoliniuose ekstraktuose (vidurkis ± standartinė paklaida). 1 visas – pirmųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. 2 visas – antrųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. Krūm. – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta įprastai. Krūm. (L.) – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta liofilizuojant. (n=3)



Tyrimo metu nustatyta, kad *A. cicer* 70% (V/V) etanolinių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas kinta nuo TE, 3,548  $\mu\text{mol/g}$  iki TE, 12,008  $\mu\text{mol/g}$ . Pastebėta, kad antioksidaciniam ekstraktų aktyvumui turi įtakos augalų auginimo metai: pirmųjų auginimo metų antžeminių dalių ekstraktų mėginiai pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu (TE, 8,174  $\pm$  0,224  $\mu\text{mol/g}$ ) nei antrųjų augalų auginimo metų antžeminių dalių ekstraktų mėginiai (TE, 7,797  $\pm$  0,265  $\mu\text{mol/g}$ ). Be to, įvertinta fenologinio tarpsnio įtaka ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui: krūmijimosi tarpsnio įprastai apdorotų augalinių žaliavų ekstraktuose nustatytas didesnis antioksidacinis aktyvumas (TE, 11,441  $\pm$  0,428  $\mu\text{mol/g}$ ), lyginant su antžeminių dalių (TE, 7,797  $\pm$  0,265  $\mu\text{mol/g}$ ), surinktų masinio žydėjimo metu, ekstraktais. Taip pat pastebėta, kad augalinių žaliavų apdorojimo būdas turi įtakos antiradikaliniam ekstraktų aktyvumui, kuris nustatytas ABTS radikalų – katijonų sujungimo metodu: krūmijimosi tarpsniu surinktų ilguolinių kulkšnių žaliavų, apdorotų liofilizuojant, ekstraktai pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu (TE, 12,008  $\pm$  0,319  $\mu\text{mol/g}$ ), lyginant su krūmijimosi tarpsniu surinktų žaliavų, kurios džiovintos įprastai, ekstraktais (TE, 11,441  $\pm$  0,428  $\mu\text{mol/g}$ ). Atsižvelgiant į augalų morfologinių dalių kintamumą, antiradikalinio tyrimo duomenys įvairavo: didžiausia ABTS radikalų–katijonų surišamoji galia nustatyta lapų ekstraktuose (TE, 11,319  $\pm$  0,285  $\mu\text{mol/g}$ ), šiek tiek mažesnė – žiedų ekstraktuose (TE, 8,919  $\pm$  0,280  $\mu\text{mol/g}$ ). Tuo tarpu net 3,2 karto, lyginant su gautais lapų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo duomenimis, mažesnis antiradikalinis aktyvumas nustatytas stiebų ekstraktų mėginiuose (TE, 3,548  $\pm$  0,203  $\mu\text{mol/g}$ ).

Įdomu pažymėti, kad skirtingai nuo antioksidacinio aktyvumo, nustatyto DPPH radikalų sujungimo metodu, šiuo atveju šiek tiek didesnis antiradikalinis aktyvumas įvertintas želmenų (TE, 7,308  $\pm$  0,390  $\mu\text{mol/g}$ ) ekstraktuose, lyginant su sėklų ekstraktų mėginiais (TE, 6,030  $\pm$  0,374  $\mu\text{mol/g}$ ). Mažesniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo daigintų sėklų ekstraktai (TE, 5,152  $\pm$  0,291  $\mu\text{mol/g}$ ).

Remiantis užsienio mokslininkų atliktų tyrimų duomenimis, nustatyta, kad kitų *Astragalus* genties augalų, pvz. *A. lagurus*, vandeninių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas siekė 67,43 mg TE/g. [53]

Deja, nepavyko rasti mokslinės literatūros apie *A. cicer* augalų bei morfologinių dalių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvairavimą ABTS radikalų – katijonų sujungimo metodu.

Palyginus DPPH radikalų surišimo metodu gautus rezultatus su ABTS radikalų – katijonų sujungimo metodu gautais duomenimis, pastebėta esminių skirtumų. Remiantis DPPH radikalo surišimo metodo duomenimis, didžiausiu DPPH radikalų surišimu pasižymėjo sėklų ir želmenų ekstraktai. Tuo tarpu, taikant ABTS radikalų – katijonų surišimo metodą, sėklų ir želmenų ekstraktuose pastebėtas silpnėnis gebėjimas sujungti ABTS radikalus. Kadangi DPPH radikalas yra netirpus vandenyje, tačiau tirpus organiniuose tirpikliuose, šiuo metodu dažniausiai nustatinėjami lipofiliniai antioksidantai. Tuo tarpu ABTS radikalas yra tirpus tiek organiniuose, tiek neorganiniuose tirpikliuose, todėl šiuo metodu

galima nustatyti ir lipofilinių, ir hidrofilinių antioksidantų aktyvumą ekstraktuose. [46] Tai ir galėjo sąlygoti skirtingo antiradikalinio aktyvumo rezultatus įvertinus du *in vitro* metodus.

### 6.3.3 A. *cicer* augalinių žaliavų ekstraktų chelatinio aktyvumo nustatymas $Fe^{2+}$ jonų surišimo metodu

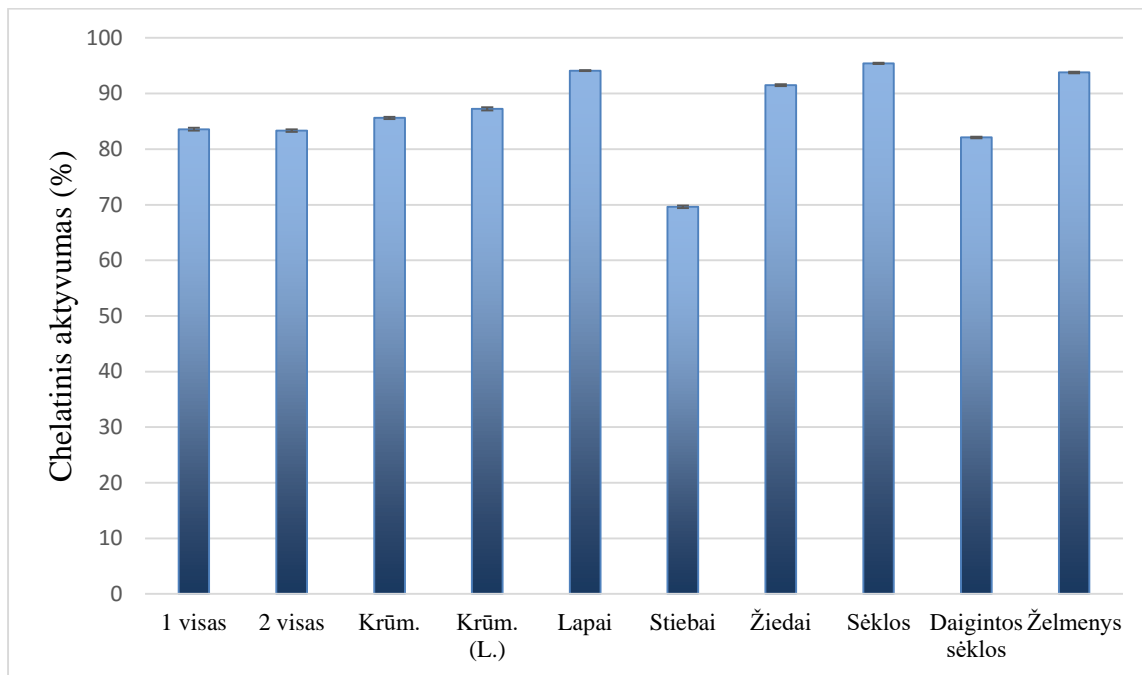
Chelatinis aktyvumas tiriamuosiuose A. *cicer* ekstraktuose vertinamas, taikant  $Fe^{2+}$  jonų surišimo metodą (FIC) ir atsižvelgiant į  $Fe(II)$  ir ferozino komplekso absorbcijos sumažėjimą. Tyrimo duomenys pateikti **14 pav.**

A. *cicer* 70% (V/V) etanoliniuose ekstraktuose, skirtingai nuo antiradikalinio aktyvumo tiriamųjų žaliavų ekstraktuose, chelatinis aktyvumas buvo didelis (69,63-95,405 %). Atsižvelgiant į auginimo metų įtaką chelatiniam aktyvumui, panašiomis chelatinėmis savybėmis pasižymėjo pirmųjų auginimo metų augalų antžeminių dalių ekstraktai ( $83,574 \pm 0,246$  %) bei antrųjų auginimo metų augalų antžeminių dalių ekstraktai ( $83,340 \pm 0,219$  %). Įvertinus augalo sezoniškumo įtaką antioksidaciniam efektyvumui, nustatyta, kad didesniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo antrųjų auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliavų ( $85,610 \pm 0,212$  %) nei antžeminių dalių ( $83,340 \pm 0,219$  %), surinktų masinio žydėjimo metu, ekstraktai. Kaip ir antiradikalinio aktyvumo nustatymo metu, pastebėtas antioksidacinio aktyvumo kintamumas tarp krūmijimosi tarpsnio žaliavų, apdorotų skirtingais būdais. Krūmijimosi tarpsniu surinktų žaliavų, apdorotų liofilizuojant, 70 % (V/V) etanoliai ekstraktai pasižymi stipresnėmis chelatinėmis savybėmis ( $87,248 \pm 0,303$  %) nei krūmijimosi tarpsniu surinktų, įprastai džiovintų žaliavų, 70 % etanoliniai ekstraktai ( $85,610 \pm 0,212$  %). Priklausomai nuo A. *cicer* morfologinės dalies chelatinis aktyvumas įvairavo: lapų ekstraktuose jis nustatytas didžiausias ( $94,113 \pm 0,101$  %), truputį mažesnis - žiedų ekstraktuose ( $91,505 \pm 0,173$  %), o mažiausias chelatinis aktyvumas įvertintas stiebų ekstraktuose ( $69,633 \pm 0,229$  %).

Sekoje sėklos-daigintos sėklos-želmenys, sėklų ekstraktų mėginiai pasižymėjo stipriausiomis chelatinėmis savybėmis ( $95,405 \pm 0,173$  %). Šiek tiek mažesnis chelatinis aktyvumas, lyginant su sėklų ekstraktais, nustatytas želmenų ekstraktų mėginiuose ( $93,792 \pm 0,138$  %) ir palyginti mažas – daigintų sėklų ekstraktuose ( $82,101 \pm 0,157$  %).

Palyginus gautus rezultatus su Lietuvoje tirtų tos pačios *Astragalus* genties augalų, A. *glycyphyllos*, duomenimis, chelatinis saldžialapės kulkšnės ekstraktų aktyvumas įvairavo nuo 61,00% iki 91,97%. [50] Gauti duomenys turi panašumų su mūsų atlikto tyrimo duomenimis (nustatytas A. *cicer* ekstraktų chelatinio efektyvumo kintamumas nuo 69,633 % iki 95,405 %). Įvertintas A. *glycyphyllos* žiedynų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas ( $91,97 \pm 1,26$ %) sutampa su mūsų atlikto tyrimo rezultatais ( $91,505 \pm 0,173$  %).

Deja, nepavyko rasti mokslinės literatūros apie *A. cicer* augalų bei morfologinių dalių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvairumą FIC metodu.



**14 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas  $Fe^{2+}$  jonų surišimo (FIC) metodu *A. cicer* tiriamuosiuose žaliavų ekstraktuose (vidurkis  $\pm$  standartinė paklaida). 1 visas – pirmųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. 2 visas – antrųjų auginimo metų antžeminė *A. cicer* dalis. Krūm. – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta įprastai. Krūm. (L.) – antrųjų augalo auginimo metų krūmijimosi tarpsnio žaliava, džiovinta liofilizuojant. (n=3)**

Apibendrinant rezultatus, galima teigti, jog žaliavos apdorojimo būdas turi įtakos augalinės žaliavos kokybei, savybėms bei galimam pritaikomumui ligų gydyme. Tyrimo metu atlikta analizė su krūmijimosi tarpsnio žaliavomis, kurios buvo apdorotos taikant liofilizacijos metodą bei džiovintos įprastai. Analizės metu, pastebėta, kad didesnis fenolinių junginių kiekis aptinkamas 70% (V/V) etanoliniuose liofilizuotų *A. cicer* žaliavų ekstraktuose. Taip pat tyrimo metu nustatyta, kad didesniu antiradikaliniu ir chelatininiu aktyvumu, pasižymėjo krūmijimosi tarpsniu surinktų žaliavų, apdorotų liofilizuojant, ekstraktai. Tik šiek tiek didesnis flavonoidų kiekis aptiktas *A. cicer* žaliavų, džiovintų įprastai, ekstraktuose. Taigi tolimesniems augalo *A. cicer* žaliavų ekstraktų tyrimams plėtoti, optimaliau rinktis žaliavos apdorojimą liofilizacija. Liofilizacijos metu išlaikomas didesnis bioaktyviųjų junginių kiekis, žaliava nepraranda skonio bei kvapo. [29]

Tyrimo metu gauti duomenys parodė, kad polifenolinių junginių gavybai iš *A. cicer* augalų tinkamiausios morfologinės dalys - sėklos bei lapai. Taip pat lapų ekstraktuose aptinkamas didžiausias kiekis flavonoidų. Tyrimų metu nustatyta, kad didesnis fenolinių junginių kiekis aptinkamas pirmųjų augalo auginimo metų antžeminių dalių nei antrųjų augalo auginimo metų antžeminių dalių žaliavose.

Remiantis literatūra, tam gali turėti reikšmės ne tik žaliavose natūraliai sukaupiami bioaktyviųjų junginių kiekiai, bet ir išoriniai veiksniai kaip nepalankios augalo augimo sąlygos. Taip pat rekomenduojama atlikti išsamesnius fitocheminius tyrimus.[37,40,44]

#### **6.4. Koreliacinių ryšių įvertinimas tarp suminio fenolinių junginių ir flavonoidų kiekių ir antioksidacinio aktyvumo**

Atlikus *A. cicer* žaliavų ekstraktų analizę, iš gautų fitocheminių duomenų matyti, kad gauti tirtų junginių kitimo dėsningumai skirtingose ilguolinių kulkšnių žaliavose, yra panašūs abiejuose tyrimuose. Todėl nuspręsta nustatyti statistinio ryšio stiprumą tarp suminio fenolinių junginių ir flavonoidų kiekio bei antioksidacinio aktyvumo. Koreliacijos analizei taikytas Pirsono koreliacijos koeficientas, kuris atspindi dviejų kintamųjų tarpusavio ryšio stiprumą. Pavyzdžiui, jei gautasis koreliacijos koeficientas lygus 0,00 - 0,19, tai laikoma labai silpnu tarpusavio ryšiu, tačiau jei gautoji reikšmė artimesnė 0,90 – 1,00, tai laikoma labai stipriu tarpusavio ryšiu. Taigi, 0,2 – 0,39, 0,4 – 0,69 bei 0,7 – 0,89, atitinkamai laikomos silpno, vidutinio ir stipraus ryšio reikšmėmis. [47]

Atlikus *A. cicer* gautų duomenų analizę, nustatytas stiprus koreliacinis ryšys ( $r=0,820$ ,  $p<0,05$ ) tarp suminio fenolinių junginių kiekio ir antioksidacinio aktyvumo, nustatyto DPPH radikalo surišimo metodu. Taip pat stiprus koreliacinis ryšis ( $r=0,815$ ,  $p<0,05$ ) įvertintas tarp suminio fenolinių junginių kiekio *A. cicer* žaliavose bei jų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo, nustatyto  $Fe^{2+}$  jonų surišimo metodu. Vidutinė koreliacija stebėta tarp suminių fenolinių junginių ir flavonoidų ( $r=0,614$ ,  $p<0,05$ ) kiekių žaliavose bei flavonoidų kiekio ir antioksidacinio aktyvumo, nustatyto DPPH radikalo surišimo metodu ( $r=0,672$ ,  $p<0,05$ ). Beje, pastebėta, kad gana stipriai koreliuoja skaitinės suminio flavonoidų kiekio ir antioksidacinio aktyvumo, nustatyto ABTS ir FIC metodais (atitinkamai  $r=0,843$  bei  $r=0,853$ ,  $p<0,05$ ) reikšmės. Atlikus gautų duomenų statistinį įvertinimą, galima teigti, jog didėjant suminiam fenolinių junginių ir flavonoidų kiekiui, kartu didėja ir antioksidacinis *A. cicer* ekstraktų aktyvumas.

## 7. IŠVADOS

1) Parinktos optimalios fenolinių junginių ekstrakcijos sąlygos iš *A. cicer* žaliavų. Daugiausia fenolinių junginių išekstrahuota ultragarso vonelėje su 70% (V/V) vandens-etanolio mišiniu, kai ekstrakcijos trukmės intervalas yra 15 min, palaikant 50 °C temperatūrą.

2) Suminis fenolinių junginių kiekis *A. cicer* žaliavose įvairuoja nuo 5,316 mg/g iki 27,165 mg/g. *A. cicer* augalinėms žaliavoms būdingas suminių fenolinių junginių ir flavonoidų kiekybinių sudėčių kintamumas, kuris tiesiogiai priklauso nuo augalo morfologinės dalies, auginimo metų bei fenologinio tarpsnio. Didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis nustatytas sėklų ( $27,165 \pm 1.923$  mg/g) žaliavose, o mažiausias stiebuose ( $5,316 \pm 0,613$  mg/g). Tuo tarpu didžiausias flavonoidų kiekis nustatytas *A. cicer* lapų žaliavose ( $3,974 \pm 0,080$  mg/g). Mažiausi flavonoidų kiekiai aptikti stiebuose ( $0,311 \pm 0,079$  mg/g). Nustatyta, kad didesni suminiai fenolinių junginių ir flavonoidų kiekiai randami krūmijimosi tarpsnio antžeminių dalių žaliavose nei masinio žydėjimo metu surinktose žaliavose. Suminio flavonoidų ir fenolinių junginių kiekio morfologinio kitimo tendencijos sekoje sėklos-daigintos sėklos-želmenys yra panašios.

3) Nustatyta, kad *A. cicer* žaliavų ekstraktams būdingas antioksidacinis aktyvumas visose trijose *in vitro* modelinėse sistemose. Vertinant antioksidacinį ekstraktų aktyvumą DPPH radikalų surišimo metodu nustatyta, kad ekstraktams būdingas ženklus antiradikalinio aktyvumo įvairavimas (1,42-61,61%). Vertinant ekstraktų antiradikalinį efektyvumą ABTS radikalų – katijonų sujungimo metodu, nustatyta, kad aktyvumas yra mažesnis (TE, 3,548-12,008  $\mu$ mol/g). Didžiausios antioksidacinio aktyvumo reikšmės DPPH radikalų surišimo metodu įvertintos sėklų ekstraktuose ( $61,61 \pm 0,889\%$ ), o ABTS metodu – krūmijimosi tarpsnio liofilizuotų antžeminių dalių ekstraktuose (TE.  $12,008 \pm 0,319$   $\mu$ mol/g). Įvertinant ekstraktų chelatinės savybes, tyrimai parodė, kad visi *A. cicer* žaliavų ekstraktai pasižymėjo stipriu gebėjimu chelatuoti  $Fe^{2+}$  jonus (69,63-95,40%). Didžiausiu chelatininiu aktyvumu pasižymėjo sėklų ekstraktai ( $95,405 \pm 0,121$  %).

4) Atlikta rezultatų statistinė analizė parodė, kad stiprūs koreliaciniai ryšiai yra tarp *A. cicer* žaliavų suminių fenolinių junginių bei flavonoidų kiekių ir antioksidacinio aktyvumo. Stiprūs koreliaciniai ryšiai nustatyti tarp suminio fenolinių junginio kiekio *A. cicer* žaliavose bei jų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo, įvertinto DPPH radikalų surišimo ( $r=0,820$ ,  $p<0,05$ ) bei FIC ( $r=0,815$ ,  $p<0,05$ ) metodais. Taip pat stipri priklausomybė stebėta tarp suminio flavonoidų kiekio ir antioksidacinio aktyvumo, kuris nustatytas ABTS radikalų – katijonų sujungimo ( $r=0,843$ ,  $p<0,05$ ) bei FIC ( $r=0,853$ ,  $p<0,05$ ) metodais.

## 8. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1) Atlikti ilguolinių kulkšnių (*Astragalus cicer* L.) augalinių žaliavų tyrimai parodė, kad augalinės žaliavos kaupia polifenolinius junginius. Ištirta bendra fenolinių junginių, flavonoidų kiekybinė sudėtis bei antioksidacinio aktyvumo rodikliai skirtingų vegetacijos tarpsnių antžeminėse augalų dalyse, vegetatyviniuose ir generatyviniuose organuose. Įvertinus gautus rezultatus, galima preliminariai teigti, kad ilguolinių kulkšnių sėklose sukaupiami didžiausi polifenolinių junginių kiekiai ir jų ekstraktai pasižymi ženkliu antiradikaliu (DPPH sistemoje) ir chelatinio aktyvumu. Svarbu paminėti, kad sekoje sėklos-daigintos sėklos-želmenys, nustatytas didžiausias fenolinių junginių kiekis bei antiradikalinis aktyvumas sėklų mėginiuose, o daigintų sėklų bandiniuose šie rodmenys yra ženkliai mažesni. Tačiau želmenų žaliavų mėginiuose nustatyti bendras fenolinių junginių kiekis bei antioksidacinis aktyvumas yra labai panašūs, lyginant su gautais sėklų bandinių rezultatais. Tai gali būti svarbu vykdant daugiaveiksmių, natūralių polifenolinių junginių gavybos potencialių šaltinių paieškas.

2) Būtų tikslinga atlikti tolimesnius ilguolinių kulkšnių (*Astragalus cicer* L.) kokybinės ir kiekybinės fenolinių junginių sudėties tyrimus fenologinio tarpsnio kaitoje bei skirtingų augalo morfologinių dalių mėginiuose. Išsamesni *A. cicer* antioksidacinių savybių bei augalų kaupiamų fenolinių junginių (flavonoidų ir fenolkarboksirūgščių) tyrimai, leistų tiksliau suvokti augalo antioksidacinių poveikio mechanizmus bei galimą augalo pritaikomumą medicinos srityje.

## 9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. **Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O.** Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9–19.
2. **Kazakevičius R.** Hipoksija. Oksidacinis stresas. Apoptozė: metodinė knygelė. 2007; Vilnius: Vilniaus universitetas: 32-33.
3. **Halliwell B, Poulsen HE.** Cigarette smoke and oxidative stress. *Chemistry & ...* 2006.
4. **Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M.** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J SPJ Off Publ Saudi Pharm Soc.* 2013; 21(2): 143–52.
5. **Carocho M, Ferreira ICFR.** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology.* 2013; Vol.51: 15–25.
6. **Circu ML, Aw TY.** Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine.* 2010; Vol. 48: 49–62.
7. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free Radicals in Biology and Medicine. *Free Radical Biology and Medicine.* 2007; Vol. 10: 449-50
8. **Kunwar A, Priyadarsini K.** Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Med Allied Sci.* 2011; 1(2): 53–60.
9. **Weidinger A, Kozlov AV.** Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules.* 2015; 5(2): 472–84.
10. **Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS.** Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol.* 2010; 48(5): 425–35.
11. **Del Rio LA.** ROS and RNS in plant physiology: An overview. *Journal of Experimental Botany.* 2015; Vol.66: 2827–37.
12. **Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M.** Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J Bot.* 2012; Vol.12: 1–26.
13. **Juknys R, Vitkauskaite G, Račaitė M, Vencloviene J.** The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley. *Cent Eur J Biol.* 2012; 7(2): 299–306.
14. **Rahman T, Hosen I, Islam MMT, Shekhar HU.** Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol.* 2012; 03(07): 997–1019.
15. **Shebis Y, Iluz D, Kinel-Tahan Y, Dubinsky Z, Yehoshua Y.** Natural Antioxidants: Function and Sources. *Food Nutr Sci.* 2013; 04(06): 643–9.
16. **Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Usman LA, Ameen OM, Lawal A.** Antioxidants : Its medicinal

- and pharmacological applications. *African J Pure Appl Chemistry*. 2010; 4(8): 142–51.
17. **Oroian M, Escriche I.** Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*. 2015; Vol. 74: 10–36.
  18. **Tirzitis G, Bartosz G.** Determination of antiradical and antioxidant activity: Basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol*. 2010; 57(2): 139–42.
  19. **Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB.** Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*. 2009; 14(6): 2202–11.
  20. **Asif M.** Chemistry and antioxidant activity of plants containing some phenolic compounds. *Chem Int*. 2015; 1(1): 35–52.
  21. **Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH.** Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Tech Anal Plant Phenolic Compd*. 2013; (18): 2328–75.
  22. **Saxena M, Saxena J, Pradhan A.** Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2012; Vol. 16: 130–4.
  23. **Michalak A.** Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Plant Cell*. 2006; 15(4): 523–30.
  24. **Wang D, Zhuang Y, Tian Y, Thomas GN, Ying M, Tomlinson B.** Study of the effects of total flavonoids of Astragalus on atherosclerosis formation and potential mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*. 2012.
  25. **Krasteva NI.** Phenolic Compounds in Four Astragalus Species. *European Journal of Medicinal Plants* 2012; 3(4): 616-23.
  26. **Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M.** Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *J Phys Chem A*. 2004; 108(22): 4916–22.
  27. **Mathew S, Abraham TE, Zakaria AZ.** Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *J Food Sci Technol September* 2015; 52(9): 5790-8.
  28. **Yordi EG, Molina Perez E, Joao Matos M, Uriarte Villares E.** Structural Alerts for Predicting Clastogenic Activity of Pro-oxidant Flavonoid Compounds: Quantitative Structure-Activity Relationship Study. *Vol. 17, Journal of Biomolecular Screening*. 2012; Vol. 17,216-224.
  29. **Kaminskaitė A.** Šilinio dobilo (*Trifolium medium* L.) augalų fenolinių junginių ir antioksidantinio aktyvumo tyrimas [*Magistro baigiamasis darbas*]. Lietuva, Kaunas, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, 2015.



30. **Dai J, Mumper RJ.** Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; Vol.15: 7313–52.
31. **Agbor GA, Vinson JA, Donnelly PE.** Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay Description of Folin Ciocalteu Reagent. *Int J Food Sci Nutr Diet*. 2014; 3(38): 147–56.
32. **Hassan MS, Aqil Al AA, Attimarad M.** Determination of crude saponin and total flavonoids content in guar meal. *Advancement in Medicinal Plant Research* February 2013; 1(1): 24-8.
33. **Garcia EJ, Cadorin Oldoni TL, de Alencar SM, Reis A, Loguercio AD, Miranda Grande RH.** Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Braz Dent J*. 2012; 23(1): 22–7.
34. **Marinova G, Batchvarov V.** Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 2011; (1): 11-24.
35. **Shalaby AE, Shanab MMS.** Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* September 2013; 42(5): 556-64.
36. **Ying L, Xu P, Huang S, Wang Y.** Antioxidant activity of bioactive compounds extracted from *Ampelopsis grossedentata* leaves by optimized supercritical carbon dioxide. *Journal of Medicinal Plants Research* September 2011; 5(17): 4373-81.
37. **Li X, Qu L, Dong Y, Han L, Liu E, Fang S.** A review of recent research progress on the astragalus genus. *Molecules*. 2014; 19(11): 18850–80.
38. **Li K, Hao X, Gao F, Wang G, Zhang Z, Du G, Qin X.** Identification of Cultured and Natural Astragalus Root Based on Monosaccharide Mapping. *Molecules* 2015; 20: 16466-90.
39. **Acharya S, Kastelic J, Beauchemin K, Messenger D.** A review of research progress on cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.). *Can J Plant Sci Sci*. 2006; 86(38): 49–62.
40. **Leknavičius A.** Vadovas augalams pažinti. „MOKSLAS”. 1989.
41. **Zhang Hong W, Lin Zhi X, Xu C, Leung C, Chan Lai S.** Astragalus (a traditional Chinese medicine) for treating chronic kidney disease . *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014.
42. **Lysiuk R.** Plants of the genus *Astragalus* used for medicinal purposes. *ResearchGate*. 2014.
43. **Ignat I, Volf I, Popa VI.** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem*. 2011; 126(4): 1821–35.
44. **Naghiloo S, Movafeghi A, Delazar A, Nazemiyeh H, Asnaashari S, Dadpour MR.** Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots, leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. *BioImpacts*. 2012; 2(2): 105–9.
45. **Ozkan G, Kamiloglu S, Ozdal T, Boyacioglu D, Capanoglu E.** Potential Use of Turkish Medicinal Plants in the Treatment of Various Diseases. *Molecules* 2016; Vol.21, 257.

46. **Raudonis R.** Skysčių chromatografijos pokolonėlinių metodų optimizavimas augalinių antioksidantų tyrimams [*Daktaro disertacija*]. Lietuva, Kaunas, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, 2012.
47. **Kasiulevičius V, Denapienė G.** Statistikos taikymas mokslinių tyrimų analizėje. *Gerontologija* 2008; 9(3): 176–180.
48. **Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R.** A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process.* 2011; 89(3): 217–33.
49. **Jun MY, Kim HE, Lim JJ, Kim HS, Kim HS, Lim DJ, Cheoi SD, Cheoi SY, Yu YC, Chung M.** Variation of Phenolic Compounds Contents in Cultivated Astragalus membranaceus. *Korean J. Medicinal Crop Sci* 2012; 20(6): 447–53.
50. **V. Radzevičiūtė.** Saldžialapės kulkšnės (*astragalus glycyphyllos* l.) žaliavų tyrimas ir perspektyvų širdies - kraujagyslių sistemos ligų profilaktikai ir pagalbinei terapijai prognozė [*Magistro baigiamasis darbas*]. Lietuva, Kaunas, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, 2015.
51. **Lim DH, Choi D, Choi OY, Cho KA, Kim R, Choi HS.** Effect of Astragalus sinicus L. seed extract on antioxidant activity. *J Ind Eng Chem.* 2011; 17(3): 510–6
52. **Asgarpanah J, Motamed SM, Farzaneh A, Ghanizadeh B, Tomraee S.** Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content of Astragalus squarrosus Bunge. *African Journal of Biotechnology*, 2011; 10(82): 19176-80.
53. **Zengin G, Ceylan R, Guler OG, Carradori S, Uysal S, Aktumsek A.** Enzyme Inhibitory Effect and Antioxidant Properties of Astragalus Lagurus Extracts. *An essential journal of Current Enzyme Inhibition.* 2016;12(2).