

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

MEDICINOS AKADEMIJA

FARMACIJOS FAKULTETAS

FARMAKOLOGIJOS KATEDRA

FAUSTAS LEVULIS

**FENOLINIŲ JUNGINIŲ SUDĖTIES ĮVAIRAVIMAS OBELŲ
LAPUOSE VEGETACIJOS METU**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas

Prof. habil. dr. Valdimaras Janulis

KAUNAS, 2016

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

MEDICINOS AKADEMIJA

FARMACIJOS FAKULTETAS

FARMAKOGNOZIJOS KATEDRA

TVIRTINU:

Farmacijos fakulteto dekanas
prof. dr. Vitalis Briedis

**FENOLINIŲ JUNGINIŲ SUDĖTIES ĮVAIRAVIMAS OBELŲ
LAPUOSE VEGETACIJOS METU**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas

Prof. habil. dr. Valdimaras Janulis

Recenzentas

Darbą atliko

Magistrantas Faustas Levulis

Kaunas 2016

TURINYS

SANTRAUKA	5
SUMMARY	7
SANTRUMPOS	9
ĮVADAS.....	10
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	12
LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1 Obels (<i>Malus</i> L.) genties apibūdinimas.....	13
1.2 Obelių lapų cheminės sudėties tyrimai.....	13
1.3. Flavonoidų kokybinis ir kiekinis įvertinimas.....	14
1.4 Flavonoidų poveikis organizmui	18
1.5. Flavonoidų reikšmė augalams	22
1.6 Apibendrinimas	23
TYRIMO METODAI.....	24
2.1. Reagentai ir medžiagos	24
2.2. Naudota aparatūra	25
2.3. Tiriamojo pavyzdžio paruošimas	25
2.4. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu.....	25
2.5. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu	26
2.6. Bendro proantocianidinų kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu	27
2.7. Obelių lapų ėminių ekstraktų antiradikalinio aktyvumo nustatymas spektrofotometrinio ABTS radikalų-katijonų surišimo metodu.....	27
2.8. Obelių lapų ėminių ekstraktų antiradikalinio aktyvumo nustatymas spektrofotometrinio DPPH [•] radikalų surišimo metodu	28
2.9. Obelių lapų ėminių ekstraktų antiradikalinio aktyvumo nustatymas spektrofotometrinio TFPH radikalų – katijonų surišimo metodu	28
2.10. Obelių lapų ėminių ekstraktų redukcinio aktyvumo nustatymas spektrofotometrinio FRAP metodu.....	28
2.11. Obelių lapų ėminių ekstraktų antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo apskaičiavimas	29
2.12. Tyrimų duomenų statistinis įvertinimas.....	30
REZULTATAI.....	31
3.1. Obelių lapų fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas vegetacijos metu.....	31
3.2. Obelių lapų etanolinių ekstraktų antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo nustatymas vegetacijos metu.....	34

3.3. Obelų lapų etanolinių ekstraktų kiekinės sudėties ir antioksidacinio aktyvumo koreliacinių ryšių vertinimas	38
3.4 Tyrimo rezultatų apibendrinimas	38
IŠVADOS.....	40
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	41
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	42

SANTRAUKA

F. Levulio magistro baigiamasis darbas. Mokslinis vadovas prof. habil. dr. Valdimaras Janulis; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Farmacijos fakulteto, Farmakognozijos katedra – Kaunas.

Raktiniai žodžiai: 'Ligol', obelių lapai, fenoliniai junginiai, flavonoidai, proantocianidinai, spektrofotometrija, antioksidacinis aktyvumas.

Pavadinimas: fenolinių junginių sudėties įvairavimas obelių lapuose vegetacijos metu

Tyrimo tikslas: ištirti Lietuvoje auginamų 'Ligol' veislės obelių lapų ėminių fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimą vegetacijos periodo metu ir įvertinti jų ekstraktų antioksidantinį aktyvumą *in vitro*.

Tyrimo uždaviniai: 1. Nustatyti 'Ligol' veislės obelių lapų bendrą fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimą vegetacijos periodo metu 2. Ištirti 'Ligol' veislės obelių lapų flavonoidų kiekinės sudėties įvairavimą vegetacijos periodo metu 3. Išanalizuoti 'Ligol' veislės obelių lapų proantocianidinų kiekinę sudėtį bei jos rodiklių kitimo dinamiką vegetacijos periodo metu 4. Įvertinti 'Ligol' veislės obelių lapų antioksidacinį aktyvumą ABTS, DPPH, FRAP ir TFPH UV-VIS spektrofotometriniais metodais 5. Nustatyti obelių lapų ėminių fenolinių junginių, flavonoidų, proantocianidinų kiekinės sudėties ir jų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo koreliacinius ryšius.

Tyrimo objektas ir metodai: 'Ligol' obelių lapų ėminiai skinti skirtingais fenologiniais tarpsniais 2013 metais birželio–lapkričio mėnesiais. Bendras fenolinių junginių, flavonoidų ir proantocianidinų kiekis obelių lapų ėminių ekstraktuose nustatytas UV-VIS spektrofotometrinio metodu. Obelių lapų ėminių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas nustatytas DPPH, FRAP, ABTS ir TFPH UV-VIS spektrofotometriniais metodais *in vitro*.

Rezultatai: Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis ($235,15 \pm 10,34$ mg/g) nustatytas lapų vystymosi pradžioje (05-20), mažiausias ($145,81 \pm 7,29$ mg/g) – lapų brandos fenologinio tarpsnio pabaigoje (10-07) skintų obelių lapų ėminiuose. Vegetacijos pabaigoje (11-04) fenolinių junginių kiekis padidėjo iki $167,91 \pm 6,23$ mg/g.

Didžiausias bendras flavonoidų kiekis ($27,37 \pm 0,86$ mg/g) nustatytas vegetacijos periodo pabaigoje (11-04) skintų obelių lapų ėminiuose, mažiausias ($4,4 \pm 0,12$ mg/g) – lapų vystymosi fenologinio tarpsnio metu (06-03) surinktų obelių lapų ėminiuose.

Didžiausias bendras proantocianidinų kiekis ($9,18 \pm 0,36$ mg/g) nustatytas lapų senėjimo metu (11-04), mažiausias kiekis ($1,41 \pm 0,03$ mg/g) – lapų vystymosi pradžioje (05-20) skintų obelių lapų ėminiuose.

Stipriausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas lapų brandos metu (08-09) ir lapų brandos periodo pabaigoje (11-04) rinktų obelių lapų ėminiuose (atitinkamai $134,93 \pm 5,62$ ir $133,93 \pm 8,5$ $\mu\text{mol TE/g}$).

Silpniausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas birželio 17 dieną skintų obelų lapų ėminiuose ($43,16 \pm 2,03 \text{ } \mu\text{mol TE/g}$). Stipriausia teigiama koreliacija ($0,619$, $p < 0,05$) nustatyta tarp bendro fenolinių junginių bei bendro flavonoidų kiekio ir FRAP metodu įvertinto redukcinio aktyvumo.

Išvados: Atlikti tyrimai suteikia naujos informacijos apie augalo vegetacijos metu vykstančius obelų lapų kiekinės sudėties pokyčius. Obelų lapai kaupia didelius fenolinių junginių – natūralių antioksidantų kiekius, todėl obelų lapai yra perspektyvi žaliava maisto papildų, praturtintų obelų lapų ekstraktais gamybai bei individualių specifiniu biologiniu poveikiu pasižyminčių junginių išskyrimui.

SUMMARY

F. Levulis final master's thesis. Research supervisor prof. habil. dr. V. Janulis; Lithuanian University of Health Sciences, Academy of Medicine, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosis – Kaunas.

Keywords: cultivar, apple leaves, '*Ligol*', phenolics, flavonoids, proanthocyanidins, spectrophotometry, antioxidant activity.

Title: Quantitative Composition of Phenolic Compounds in Apple Leaves during Vegetation Period

The aim of the research – investigation of quantitative composition variation of phenolic compounds during vegetation period in apple leaf samples of cultivar '*Ligol*' grown in Lithuania and evaluation of the antioxidant activity of these extracts.

The objectives of the research:

1. Evaluation of quantitative composition variation of phenolic compounds during vegetation period in extracts of apple leaf samples of cultivar '*Ligol*'.
2. Evaluation of quantitative composition variation of flavonoids during vegetation period in extracts of apple leaf samples of cultivar '*Ligol*'.
3. Evaluation of quantitative composition variation of proanthocyanidins during vegetation period in extracts of apple leaf samples of cultivar '*Ligol*'.
4. Evaluation of the antioxidant activity in extracts of apple leaf samples of cultivar '*Ligol*' using ABTS, DPPH, FRAP and TFPH UV-VIS spectrophotometric methods *in vitro*.
5. Determine apple leaves phenolic compounds, flavonoids, proanthocyanidins quantitative composition and the antioxidant activity correlation.

Research object and methodology: '*Ligol*' apple leaves were harvested at different phenology phases between June and November 2013. The total phenolic compound, flavonoid and proanthocyanidin content in the apple leaf extracts was determined with UV-VIS spectrophotometry. Antioxidant activity in apple leaf extracts determined by DPPH, ABTS, FRAP, TFPH, and UV-VIS spectrophotometric methods *in vitro*.

Results: the maximum total amount of phenolic compounds (235.15 ± 10.34 mg/g) in apple leaf samples was established at the beginning of leaf growth (May 20), the smallest (145.81 ± 7.29 mg/g) at the end of phenology period of leaf maturation (October 7). At the end of vegetation (November 4) the amount of phenolic compounds increased to 167.91 ± 6.23 mg/g.

The maximum total amount of flavonoids (27.37 ± 0.86 mg/g) in apple leaf samples was established at the end of the vegetation period (November 4), the minimum (4.4 ± 0.12 mg/g) at the phenology period of leaf development (June 3).

The maximum total amount of proanthocyanidins (9.18 ± 0.36 mg/g) in apple leaf samples was established at the stage of leaf aging (November 4), the smallest amount (1.41 ± 0.03 mg/g) at the beginning of leaf growth (May 20).

The strongest antiradical activity in apple leaf samples was established during leaf maturation phase (August 9) and at the end of maturation period (November 4) (134.93 ± 5.62 and 133.93 ± 8.5 $\mu\text{mol TE/g}$ accordingly). The weakest antiradical activity in apple leaf samples was established in June 17 (43.16 ± 2.03 $\mu\text{mol TE/g}$).

The highest correlation coefficient was determined between flavonoid content and FRAP reduction activity. It amounted to 0,619.

Conclusions: Apple leaves contain large amounts of phenolic compounds therefore they are a promising material for food supplements enriched with apple leaf extracts and for production of individual compounds with specific biological activity.

SANTRUMPOS

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

ANOVA – (angl. *analysis of variance*)- kriterijus rezultatų statistiniam patikimumui įvertinti;

DC – dujų chromatografija (angl. *gas chromatography*);

DMCA – 4-dimetilaminocinamaldehydas;

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

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

FRAP – trivalentės geležies jonų redukcijos jėga (angl. *ferric reducing antioxidant power*);

MS – masių spektrofotometrija;

ŠŠD – širdies susitraukimų dažnis;

TE – trolokso ekvivalentas;

TEAC – trolokso ekvivalento antioksidantinė galia (angl. *trolox equivalent antioxidant capacity*);

TFPH – trifluorperazinodihidrochlorido radikalo-katijonas;

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas;

SGLT – natrio gliukozės kotransporteris (angl. *sodium/glucosecotransporter*)

UPLC – ultra efektyvioji skysčių chromatografija (angl. *ultra-performance Liquid Chromatography*)

UV – ultravioletinė spinduliuotė.

IVADAS

Ilgus šimtmečius augalai, pasižymintys gydomosiomis savybėmis, buvo pagrindinė priemonė ligoms bei įvairiems negalavimams gydyti. Nors XIX–XX a. atsirado daug naujų sintetinių preparatų, biologiškai aktyvius junginius kaupiančių augalų naudojimas medicinoje ir farmacijoje nepraranda savo reikšmės. Augaliniai vaistiniai preparatai pasižymi farmakologinio poveikio įvairove, yra geriau toleruojami ir rečiau sukelia nepageidaujamą poveikį nei sintetiniai vaistai. Pastaraisiais metais vis didėjantis gyventojų, gydytojų ir mokslininkų susidomėjimas vaistiniais augalais ir jų teikiamomis žaliavoms skatina mokslininkus šiuolaikiniais analizės būdais naujai įvertinti jau naudojamų augalinių žaliavų sudėtį, jų kaupiamų biologiškai aktyvių junginių poveikį bei ieškoti naujų, perspektyvių augalų, kurių teikiamos žaliavos galėtų būti panaudotos medicinos, farmacijos, maisto pramonės, kosmetikos reikmėms.

Viena svarbiausių ir labiausiai mokslininkus dominančių biologiškai aktyvių junginių grupių yra fenoliniai junginiai [1]. Jie pasižymi plačiu biologiniu poveikiu. Fenoliniai junginiai – vieni stipriausių natūralių antioksidantų [1], pasižymi antiuždegiminiu, priešvėžiniu, antimikrobinu, priešgrybeliniu poveikiu, teigiamai veikia širdies ir kraujagyslių sistemą, apsaugo nuo geltonosios dėmės degeneracijos.

Obuoliai yra vieni labiausiai vartojamų vaisių Lietuvoje ir pasaulyje. 2014 metų duomenimis per metus užauginama 80,82 milijonai tonų obuolių. Iš jų Lietuvoje 62 tūkstančiai tonų [2]. Obuolių fenolinių junginių kokybinė ir kiekinė sudėtis yra plačiai tyrinėta įvairių šalių užsienio mokslininkų [3, 4].

Obelių lapų fenolinių junginių sudėties įvairavimas tyrinėtas daug mažiau. Jų tyrimai buvo atliekami, norint nustatyti obelinio raupliagybio įtaką antrinių augalo metabolitų biosintzei [5, 6]. Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad pagrindiniai obelių lapų komponentai yra flavan-3-oliai, fenolinės rūgštys, kvercetino glikozidai ir dihidrochalkonai, mažesni kiekiai monomerinių ir oligomerinių flavan-3-olių be fenolinių rūgščių [7, 8].

Duomenų apie biologiškai aktyvių junginių kaupimosi dėsningumus obelių lapuose mokslinės literatūros šaltiniuose rasta nedaug. Obelių lapuose kaupiamų biologiškai aktyvių junginių kokybinė ir kiekinė sudėtis kinta priklausomai nuo klimatinių sąlygų, ėminių rinkimo laiko, auginimo technologijos, obelių veislės [4]. Aktualu atlikti obelių lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimus, siekiant nustatyti kada sukaupiamas didžiausias biologiškai aktyvių junginių kiekis. Šių tyrimų rezultatai leistų racionaliai planuoti augalinės žaliavos paruošas.

Obelių lapų ėminiuose kaupiami fenoliniai junginiai – natūralūs antioksidantai. Jie suriša laisvuosius radikalus, slopina aktyviųjų deguonies ir azoto formų susidarymo procesus [9, 10], inhibuoja fermentus, skatinančius uždegimus, dėl kurių didėja laisvųjų radikalų sintezė, apsaugo kitus

antioksidantus nuo oksidacinio poveikio ir suardymo, skatina antioksidaciniu veikimu pasižyminčių fermentų išsiskyrimą.

Svarbu įvertinti obelų lapų etanolinių ekstraktų antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą *in vitro*. Gautų tyrimų duomenys leistų tiksliau prognozuoti obelų lapų ekstraktų bei juose kaupiamų fenolinių junginių antioksidantinį aktyvumą *in vivo*.

Moksliniai šaltiniai nurodo, kad 90 proc. visų obelų lapų fenolinių junginių sudaro dihidrochalkonų grupės junginys – floridzinas [11]. Jis pasižymi įvairiapusiu biologiniu poveikiu. Moksliniai tyrimai patvirtina kad šis junginys veikia vėžio ląsteles [12], gerina atmintį, yra svarbus kaulų lūžių prevencijai [13]. Potencialiai vertingiausias biologinis floridzino poveikis yra antidebetinis aktyvumas. Floridzinas sumažina gliukozės kiekį kraujyje be hipoglikemijos rizikos ar skysčių praradimo [14]. Dėl šių poveikių floridzinas yra labai vertingas antrojo tipo cukrinio debeto prevencijai. Taip pat jis gali būti naudojamas antsvorio mažinimui, nes blokuoja gliukozės absorbciją ir reabsorbciją raumenyse [15]. Dėl šios priežasties floridzinas ir floridzinu turtingi augalų ekstraktai galėtų būti įtraukiami į preparatų ir maisto papildų, skirtų svorio mažinimui, cukrinio debeto prevencijai bei gydymui sudėtį. Kolniak-Ostek ir kt. nurodo, kad obelų lapai galėtų būti panaudoti obuolių sulčių praturtinimui floridzinu ir kvercetino glikozidais [16].

Darbo tikslas – ištirti Lietuvoje auginamų '*Ligol*' veislės obelų lapų fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimą augalo vegetacijos periodo metu ir įvertinti jų etanolinių ekstraktų antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą *in vitro*.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas – ištirti Lietuvoje auginamų '*Ligol*' veislės obelų lapų fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimą augalo vegetacijos periodo metu ir įvertinti jų etanolinių ekstraktų antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą *in vitro*.

Uždaviniai:

1. Nustatyti '*Ligol*' veislės obelų lapų bendrą fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimą vegetacijos periodo metu.
2. Ištirti '*Ligol*' veislės obelų lapų flavonoidų kiekinės sudėties įvairavimą vegetacijos periodo metu.
3. Išanalizuoti '*Ligol*' veislės obelų lapų proantocianidinų kiekinę sudėtį bei rodiklių kitimo dinamiką vegetacijos periodo metu.
4. Įvertinti '*Ligol*' veislės obelų lapų antioksidacinį aktyvumą ABTS, DPPH, FRAP ir TFPH spektrofotrometriniais metodais.
5. Nustatyti fenolinių junginių, flavonoidų, proantocianidinų kiekinės sudėties ir ekstraktų antioksidacinio aktyvumo koreliacinius ryšius.

LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Obels (*Malus L.*) genties apibūdinimas

- Karalystė:** Augalai (*Plantae*)
- Skyrius:** Magnolijūnai (*Magnoliophyta*)
- Klasė:** Magnolijainiai (*Magnoliopsida*)
- Poklasis:** Erškėčiažiedžiai (*Rosidae*)
- Eilė:** Erškėtiečiai (*Rosales*)
- Šeima:** Erškėtiniai (*Rosaceae*)
- Pošeimis:** Obeliniai (*Maloideae*)
- Gentis:** Obelis (*Malus*) [17]

Pasaulio mokslininkų tarpe vyksta diskusijos dėl tikslaus Obels (*Malus L.*) genties rūšių skaičiaus. Dauguma botanikos ir augalų taksonomijos specialistų mano, kad obelų rūšių skaičius svyruoja nuo 30 iki 55 rūšių.

Obels (*Malus L.*) šeimai priklausantys augalai yra 4-12 m medžiai su tankiomis viršūnėmis, natūraliai augantys šiaurės pusrutulyje [18]. Obelų vainikas piramidiškas arba rutuliškas, lapai apskriti, kiaušinio arba elipsės formos dantytu arba pjūklišku paviršiumi. Žiedai rausvi (rečiau balti, raudoni), dvilyčiai, susitelkę skėtiniais žiedynais. Vaisius yra obuolys įvairaus dydžio. Laukinių rūšių vaisių skersmuo būna apie 6 cm (*M. sylvestris*), bet gali būti ir didesni. Naminės obels (*Malus domestica* Borkh.) vaisiai (obuoliai) yra ženkliai didesni ir gali siekti net 7-8 cm. Kiekviename obuolyje yra 3-5 lizdai su 2-3 sėklomis lizde. Obuolių odelės paviršius būna įvairių spalvų: žalsva, žalsvai gelsva, gelsva, šviesiai geltona, auksinė. Minkštimas baltas, kreminis, gelsvas, žalsvas, rausvas arbar raudonas; skonis - tirpstantis burnoje, sviestinis, švelnus, purus. Išvesta apie 10 000 veislių. [19]

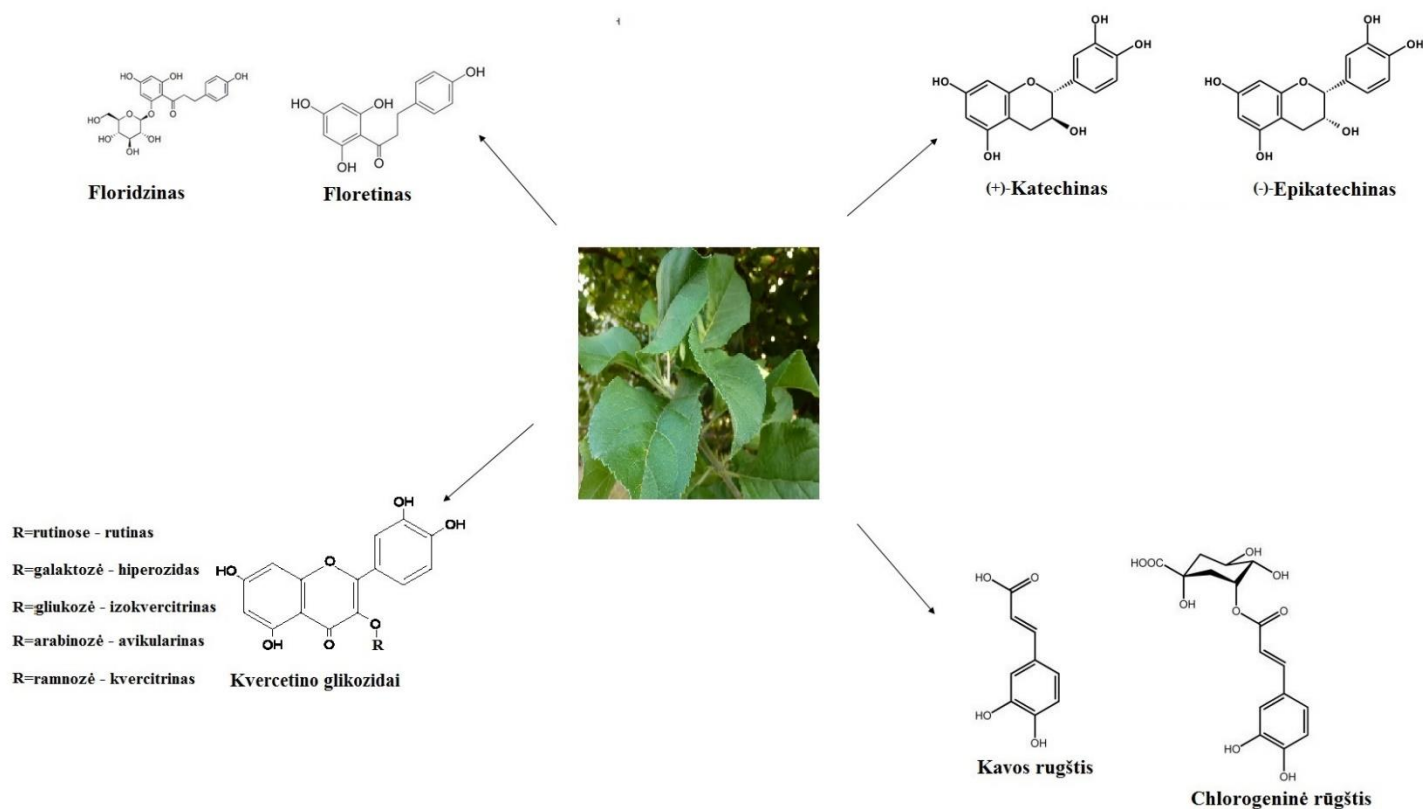
1.2 Obelų lapų cheminės sudėties tyrimai

Obelų lapų cheminė sudėtis įvairavimas priklauso nuo įvairių faktorių: obels veislės, klimato sąlygų, dirvos geocheminės sudėties, medžių amžiaus, žaliavos paruošimo laiko, laikymo sąlygų [20, 21]. Svarbiausi junginiai kaupiami obelų lapuose yra fenoliniai junginiai [22].

Floridzinas yra dominuojantis obelų lapų fenolinis junginys. Jis sudaro net 90 proc. visų obelų lapuose identifikuotų fenolinių junginių [8]. Floridzino nustatyta ir obelų žievėje, ir sėklose, tik mažesniais kiekiais. Kitose *Rosaceae* šeimos augaluose - kriaušėse (*Pyrus communis L.*), vyšniose (*Prunus cerasus L.*) - floridzinas nenustatytas [8]. Nedideliais kiekiais floridzino galima rasti braškėse

[23]. Obelių lapuose identifikuotas floridzino aglikonas floretinas, chlorogeno, kavos rūgštys, (+)-katechinas bei (-)-epikatechinas (1 pav.) [24].

Obelių lapuose nustatyti kvercetino glikozidai: kvercitrinas, hiperozidas, izokvercetrinas, avikuliarinas, rutinas (1 pav.) [25]. Tarp kvercetino glikozidų dominuojantis yra kvercitrinas [21] (8,54 proc.). Nustatytas reinotrinas (2,44 proc.), avikuliarinas (1,39 proc.), hiperozidas (3,40 proc.), rutinas, izokvercitrinas. Labai mažais kiekiais randama apigenino, kemferolio, izoramnetino, apigenino, kemferolio, izoramnetino, 3-hidroksifloridzino, mirecetino, procianidinų B2, B5 ir E-B5. Obuolių lapuose nustatyti triterpenai (ursolo ir oleanolo rūgštys), α -tokoferolis, eteriniai aliejai (eukaliptolis, fitolis ir α -farnesenas), mikroelementai (manganas, cinkas, varis ir geležis), organinės rūgštys (piruvato, citrato, sukcinato, fumaro ir malato), amino rūgštys (asparto, alanino, serino, histidino ir kitos), angliavandeniai - krakmolas ir monosachridai (sorbitolis, fruktozė, galaktozė, maltozė, gliukozė ir kiti) [7].



1 pav. Struktūrinės formulės pagrindinių komponentų nustatytų obuelių lapuose

1.3. Flavonoidų kokybinis ir kiekinis įvertinimas

Fenolinių junginių kokybinė ir kiekinė analizė gali būti tiriama įvairiais fiziko-cheminės analizės būdais.

Molekulinė absorbcinė spektrinė analizė, kai tiriamas ultravioletinis ir regimasis spektras – vadinama spektrofotometrija. Flavonoidai ir fenoliniai junginiai augalinėje žaliavoje gali būti nustatomi spektrofotometriniu metodu. Analizė pagrįsta ultravioletinės ar regimosios šviesos spinduliuotės sugerties principu. Taikant šį fotometrines analizės metodą, naudojama monochromatinė šviesa su griežtai apibrėžto bangos ilgio absorbcija. Optinis tankis matuojamas tiriamosios medžiagos tirpaluose. Tirpikliai naudojami analizėje turi būti skaidrūs nustatomojo spektro dalyje bei patys neabsorbuoti šviesos toje spektro dalyje, kurioje atliekama analizė [26].

Spektrofotometrinei analizei naudojami prietaisai – spektrofotometrai. Ultravioletinės spektro dalies šviesos šaltinis yra vandenilinė lempa, o matomosios – kaitinimo lempa. Reikiamam bangos ilgių intervalui išskirti iš ištisinio spektro kaip monochromatorius yra naudojamos kvarco prizmės. Sukant prizmę, galima gauti norimo bangos ilgio monochromatinės šviesos spindulį. Spindulys, perėjęs pro šviesos filtrą, iš pradžių eina pro tirpiklį kiuvetėje ir patenka į fotoelementą. Jame susidaro fotosrovė, todėl mikroampermetro rodyklė nukrypsta nuo nulinės padėties. Fotosrovės pokytis proporcingas šviesos absorbcijai [26].

Kiekvienas organinis junginys turi tik jam būdingus ultravioletinius spektus, nes šviesos absorbciją lemia tik pats chromoforas ir jo artimiausia aplinka. Grafiškai pavaizduota optinio tankio priklausomybė nuo bangos ilgio vadinama medžiagos spektru. Užrašius nežinomos medžiagos spekta, iš specialių lentelių arba atlasų galima nustatyti medžiagos tapatybę. Šiais metodais galima nustatyti įvairias biologiškai aktyvių junginių grupes daugiakomponentėse augalinėse matricose [26].

UV/VIS spektrofotometrijoje plačiai naudojamos kolorimetrinės reakcijos. Jos tinkamos rutiniam darbui laboratorijoje, nes jų atlikimas yra greitas, pakartojamas, pigus [27]. Fenoliniai junginiai augalų ekstraktuose reaguoja su redokso reagentu (Folin-Ciocalteu reagentas), susidarant mėlynos spalvos fosfotungstikfosfomolibdeno kompleksui [28]. Jis kiekiškai nustatomas UV-VIS spektrofotometru. Folin-Ciocalteu metodas aprašytas keliuose Europos farmakopėjos straipsniuose [29, 28]. Chromatoforo absorbcijos maksimumas šarminiame tirpale lemia fenolinių junginių koncentraciją [30].

Proantocianidinų kiekis ekstrakte nustatomas naudojant DMCA reagentą. Tai populiarus, sudėtingos aparatūros nereikalaujantis, paprastas ir labai greitas proantocianidinų nustatymo metodas. DMCA metodas pasižymi geresniu atkartojamumu, selektyvumu, greitu atlikimu. Ekstraktas sumaišomas su DMCA etanoliniu vandenilio chlorido rūgšties tirpalu. Reagentas yra jautrus (+)-katechino ir (-)-epikatechino oligomerams, polimerams ir monomerams. Spektrofotometriškai nustatomas absorbcijos dydis.

Obelių lapų ekstraktai yra daugiakomponentės matricos, kurių antioksidacinis aktyvumas grindžiamas daugeliu mechanizmų, taigi antioksidacinis aktyvumas negali būti adekvačiai nustatomas vienu metodu. Dėl šios priežasties rekomenduojama naudoti bent du skirtingus antioksidacinio

nustatymo metodus. Antioksidaciniam obelų lapų ekstraktų aktyvumui įvertinti naudojamos DPPH, ABTS, FRAP, TFPH analizės metodikos. Metodikos turi skirtumų. FRAP metodas nustato elektronų redukovimo galią, ABTS ir DPPH tyrimo metodai skirti įvertinti molekulės savybę antioksiduoti laisvuosius ABTS ir DPPH radikalus. ABTS ir DPPH metodai turi keletą skirtumų, kurie lemia skirtingas TE reikšmes. ABTS radikalo katijonas tirpus vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, tai leidžia nustatyti antiradikalinį aktyvumą hidrofilinėse ir lipofilinėse junginiuose. DPPH radikalas tirpus tik organiniuose tirpikliuose, tai trukdo nustatyti antioksidantinį aktyvumą hidrofilinėse medžiagose. [31]

Flavonoidų analizei plačiai naudojami chromatografiniai nustatymo metodai: plonasluoksnė chromatografija (PC) ir efektyvioji skysčių chromatografija (ESC) [32].

Flavonoidų kokybinei ir kiekiniai analizei dažniausiai naudojama atvirkštinių fazių skysčių chromatografija. Naudojama kolonėlė yra 100-250 mm ilgio, vidinis jos diametras siekia 3,9-4,6 mm. Dažniausiai naudojama stacionari fazė – silikagelis, sudarytas iš C_{18} arba C_8 anglies atomų. Gali būti naudojamos ir kitokios stacionariosios fazės: Sephadex, silikagelio ir poliamidų mišinys. Flavonoidų analizei naudojamas izokratinis bei gradientinis eliuojavimo metodas. Mobili fazė – acetonitrilo ir/ar metanolio mišinys su vandeniu. Buferinis tirpalas – skruzdžių rūgštis arba acetatas. Rečiau naudojami fosfatiniai buferiai, nes gali sukelti jonų šaltinio užterštumą kai naudojamas masių spektro (MS) detektorius [33]. Skysčių chromatografija atliekama kambario temperatūroje, tačiau kartais rekomenduojama atlikti skirstymą aukštesnėje nei 40 °C – taip sutrumpinamas analizės laikas. Kolonėlės temperatūrą palaiko termostatas. Plačiausiai kokybinei ir kiekiniai fenolinių junginių ir flavonoidų analizei naudojama ESC dėl trumpo analizės laiko, automatizuotos sistemos, sudėtingų mišinių skirstymo, galimybės patogiai keisti sudėtinę analitės dalis. Vieni dažniausiai naudojami ESC judrios fazės elientai yra acetonitrilas (ACN) – vanduo, metanolis – vanduo [34]. Biologiniuose skysčiuose (serume, plazmoje ir šlapime) flavonoidai egzistuoja glukuronidų ir sulfatų pavidalu. Medicinoje, maisto produktuose, augaluose, arbatose jie nustatomi glikozidų, rečiau aglikonų pavidale. Pagal tai parenkama atitinkama tirpiklių sistema bei pritaikoma analizavimo aparatūra [35].

Ultra efektyvioji skysčių chromatografija – UPLC (Ultra - Performance Liquid Chromatography). Metodas pagrįstas dideliu eliutento tekėjimo greičiu, medžiagų atskyrimas vyksta ypač aukštame slėgyje (1000 bar. palyginimui naudojant ESC – maksimalus slėgis 400 bar.). Kolonėlės ilgis 1-5 mm, porų dydis - 1-2 μ m. Šie efektyviosios skysčių chromatografijos patobulinimai sutrumpina flavonoidų tyrimų analizės laiką, padidina atskiriamąją gebą ir nustatymo jautrį. [36]

Efektyviojoje skysčių chromatografijoje svarbiausias yra atskyrimo procesas. Dalelių skirstymas vyksta analitinėje kolonėlėje. Norint gauti tikslius skirstymo rezultatus labai svarbu pasirinkti tinkamą kolonėlę. Efektyviojoje skysčių chromatografijoje taikant atvirkštinių fazių kolonėlę pasiekiamas geriausias skirtingų klasių fenolinių junginių atskyrimas. Kolonėlė užpildyta specialiu

silicio dioksido sorbentu su metalo likučių kiekiu. Taip pasiekama geriausia smailių simetrija chromatogramoje. [37]

Lentelėje palyginamos flavonoidų kiekinio nustatymo metodikos (1 lentelė).

1 lentelė. Flavonoidų kiekinio nustatymo ESC metodikos

Šaltinis	Naudota kolonėlė	Judri fazė	Judrios fazės kitimo gradientas	λ (nm)
Maddalena Kindt ir kt. 2007 [38]	XTerra MS C18 250 × 4.6-mm	A: skruzdžių rūgštis B: acetonitrilas	0-11 min 20–60 proc. B, 11-12min 60–100 proc. B, 12-13min 100 proc. B, 13-14min 100–20 proc. B	320
Skerget ir kt. 2005 [39]	Symmetry C18, 250x 4,6mm, Waters	A: fosfatinis buferis (pH 3) B: metanolis	0-5 min 5 proc. B, 35 min 100 proc. B	367
E. Enaud ir kt. 2004 [40]	100 RP 18 Lichrosphere 250×4 mm	A:metanolis/vanduo/triflouracto r. (50/50/0.01 (v/v/v)) B:metanolis/trifluoracto r. (100/0.01 (v/v))	0-20 min 20-70 proc. B 70 proc. izokratas	280
AnetaWojdylo ir kt. 2007 [41]	LiChroCART 125-3 Purospher RP-18 (5 lm) MerckLabs	A: skruzdžių rūgštis B: 80 proc. Acetonitrilas, 20 proc. skruzdžių rūgštis	0-1min izokratas 1-16 min A 100-20 proc. 17- 24 min A 20 – 0 proc.	280
Isabelle Pontais ir kt. 2008 [42]	LiChrospher 100 RP18, 12.5 x 4 mm	A: skruzdžių rūgštis B: metanolis	0-13 min 40-90 proc. B	280
Joanna Kolniak-Ostek ir kt. 2013 [16]	Cadenza CD C18 (75 mm× 4.6 mm, 5 mm)	A: skruzdžių rūgštis B: Acetonitrilas	0-30min 0-25 proc. B	280, 320, 360
M. Mikulic Petkovšek ir kt. 2009 [43]	Phenomenex Gemini C18 (150 x 4.60 mm, 3 micron),	A: fosforo rūgštis (0,01M) B: 100 proc. metanolis	5 proc. 10min - 50 proc. B 10-15min – 70 proc. B 15-25 – 100 proc. B	280, 350
BelénSuárez ir kt. 2008 [44]	Nucleosil 120 C18 (250 x 4.6 mm)	A: skruzdžių rūgštis (2 proc.) B: Metanolis (100 proc.)	0-55min – 0-45 proc. B 55-75min – izokratas B	280, 313, 355

Picinelli ir kt. 1995 [45]	Supelcosil LC-18 column (25 x 46 cm; 5 µm, Supelco, Inc., Bellefonte, PA)	A: acto rūgštis B: metanolis	2 proc. B kol pasiekia 42 proc B – 50min, 42proc-50 proc B – 10min Izokratas 50 proc. – 60- 77min	280, 320, 360
---------------------------------------	---	---------------------------------	--	------------------

Flavonoidų aglikonus sudaro du aromatiniai žiedai ir heterociklinis žiedas, kuris sugeria UV spinduliuotės šviesą. Maksimumas trumpabangėje spektro dalyje (240 – 285 nm) nurodo pirmąjį aromatinių žiedų. Maksimumas ilgabangėje spektro dalyje (300-550 nm) nurodo konjugacijas C heterocikliniame žiede. Metilo, metoksi ir nediferencijuotų hidroksilo grupių radikalai neturi didelio poveikio chromatogramoje ir sukelia tik nedidelius pokyčius absorbcijos maksimumų padėtyje. Kelis dešimtmečius UV spektrofotometrija buvo populiariausias metodas skirtas identifikuoti ir kiekiškai nustatyti flavonoidų aglikonus. Šiuo metu naudojami diodų matricos detektoriai (Diode-array detectors). Diodų matricos detektoriai sudaro spektrą UV spinduliuotės dalyje (200-400 nm), kuris lyginamas su etaloninių junginių spektru. Taip identifikuojami fenoliniai junginiai [46].

Flavonoidų analizėje fluorescencinė detekcija nėra dažnai naudojama, nes nedaug flavonoidų pasižymi savybe fluorescuoti (izoflavonai, flavonoidai su OH grupe 3-padėtyje, pvz., 3-hidroflavonas ir katechinas [trans-3, 3', 4', 5, 7-pentahidroflavonas]). Sužadavimo ir emisijos spektrai dažniausiai patenka į UV diapazoną, ši ypatybė yra išnaudojama analitikų, nes fluorescencija padidina jautrumą ir sumažina nereikalingus trukdžius - tokiu būdu supaprastinamas bandinio paruošimas. Naudojant fluorescencinį detektorių kartu su UV detektoriumi atsiranda galimybė atskirti fluorescencuojančius ir nefluorescencuojančius junginius [47].

1.4 Flavonoidų poveikis organizmui

Antioksidacinis poveikis. Grandininės reakcijos, kuriose dalyvauja laisvieji radikalai, gali sukelti širdies ir kraujagyslių ligas, vėžį, kataraktą, pagreitinti organizmo senėjimą, sukelti raumenų, jungiamojo ar kitų audinių uždegimą. Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad flavonoidai yra vieni svarbiausių ir labiausiai paplitusių natūralių antioksidantų. Jie turi keletą poveikio mechanizmų. Nustatyta, kad vienas svarbiausių antioksidacinio poveikio mechanizmų yra šių junginių geba inaktyvinti laisvuosius radikalus. Laisvųjų radikalų surišimas vyksta fenoliniams junginiams atiduodant laisvos hidroksilo grupės vandenilio atomą, dėl to paprastai susidaro mažiau reaktyvūs ir stabilesni fenoksilo radikalai. Fenoliniai junginiai gali efektyviai sujungti daugelį reaktyvių žmogaus organizme susidarančių radikalinių (superoksido ($\cdot\text{O}_2$), peroksilo ($\text{ROO}\cdot$), hidroksilo ($\text{HO}\cdot$), alkoksilo ($\text{RO}\cdot$) ir

azoto oksido ($\text{NO}\bullet$) laisvieji radikalai) ir neradikalinių (vandenilio peroksidas (H_2O_2), singletinis deguonis ($^1\text{O}_2$), peroksinitrilas ($\text{NOO}\cdot$) bei hipochlorito rūgštis (HOCl) oksidantų, taip apsaugodami struktūrines organizmo makromolekules nuo pažeidų [48].

Proceso, dėl kurio susidaro aktyvios deguonies ir azoto formos, slopinimas. Proceso metu fenoliniai junginiai inaktyvuoja metalų jonus (Fe^{2+} ir Cu^+), kurie dalyvauja reakcijose, kurių metu formuojasi reaktyvūs hidroksilo radikalai. Fenoliniai junginiai sujungia metalų jonus - mechanizmas nutrūksta ir taip ląstelės apsaugomos nuo oksidacinio streso [49].

Fenoliniai junginiai inhibuoja uždegimą sukeliančius fermentus (ksantinooksidazės ir proteino kinazės C), dėl kurių didėja $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalų, NO sintazės gamyba [50]. Nustatyta, kad kai kurie fenoliniai junginiai (ypač kvercetas, rutinas) gali apsaugoti kitus antioksidantus nuo jų suirimo. Mechanizmas pagrįstas fenolinių junginių gebėjimu sulaikyti vario ir kitus pereinamuosius metalų jonus, taip vitaminas C apsaugomas nuo šių jonų katalizuojamos oksidacijos. Fenolinių junginių gebėjimas surišti laisvuosius radikalus taip pat apsaugo vitaminą C nuo transformacijos į neaktyvią dehidroaskorbo rūgštį [51].

Fenoliniai junginiai skatina išsiskyrimą fermentų, pasižyminčių antioksidaciniu veikimu. Jie indukuoja genus, koduojančius antioksidacinius (superoksidodismutazės, katalazės) ir II fazės detoksifikuojančius (NAD(P)H-kvinonooksidoreduktazės, glutathiono S-transferazės ir UDP-gliukuronoziltransferazės) fermentus ekspresiją. Taip ląstelė saugojama nuo oksidacinio streso [52].

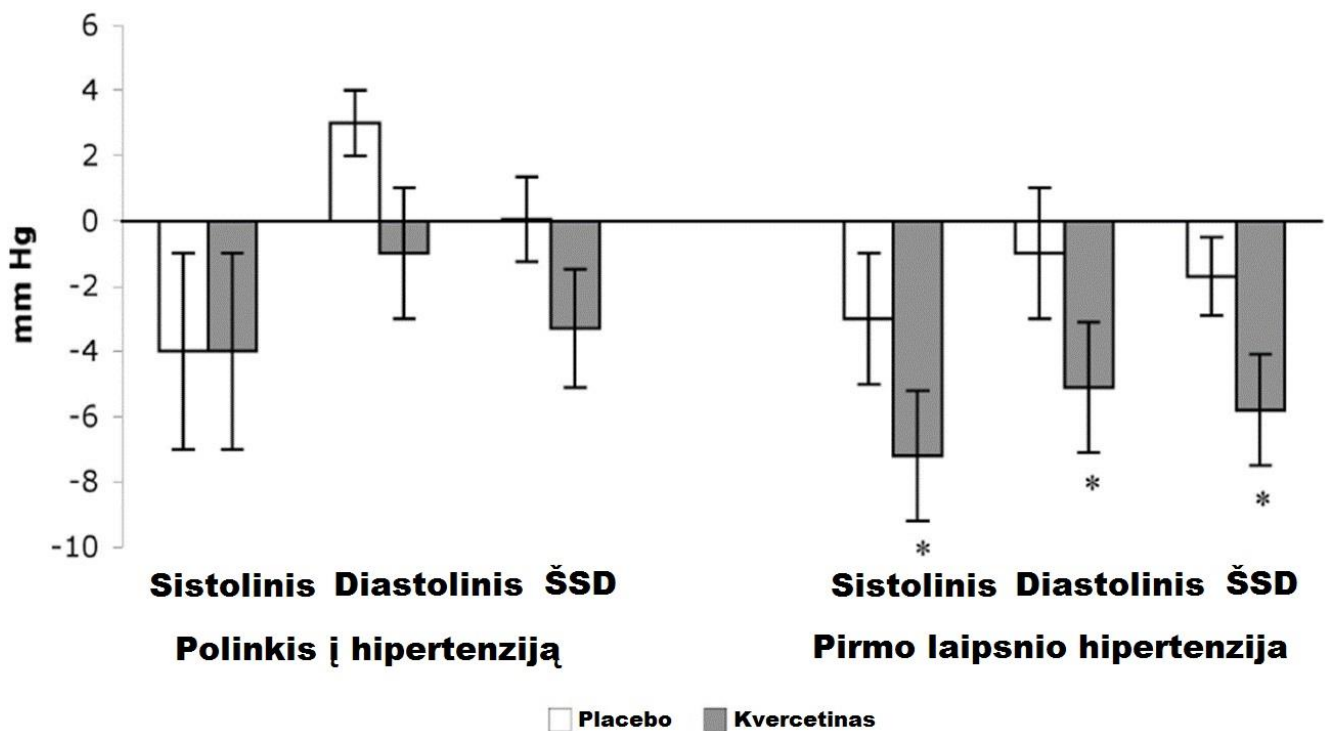
Daugumos flavonoidų antioksidacinis aktyvumas yra gerokai didesnis nei vitaminų C ar E. Pavyzdžiui, epigalokatechinogalato vieno elektrono redukcinis potencialas standartinėmis sąlygomis yra 550mV, vertė mažesnė nei glutathiono (920 mV) ir maždaug lygi alfa-tokoferolio (480 mV) reikšmei [53].

Uždegimą slopinantis poveikis. Fenoliniai junginiai slopina uždegimą, blokuodami fermentą ciklooksigenazę (COX) ir slopindami eikozanoidų (prostaglandinų, prostaciklinų, tromboksanų) sintezę [54]. Įrodyta, kad fenoliniai junginiai slopina fermentus ciklooksigenazę-1 ir ciklooksigenazę-2. Nustatyta kad ciklooksigenazė-2 slopinama selektyviau, kas reiškia, kad sumažėja nepageidaujamų reakcijų rizika [55].

Flavonoidų priešvėžinis aktyvumas. Vėžys - liga kurią gali sukelti daugybė veiksnių. Dieta, kurioje gausu antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių vaisių ir daržovių, mažina riziką susirgti vėžiu. Antioksidantai veiksmingi slopinant vėžio ląstelių augimą. Antioksidantų dieta yra labai rekomenduojama vėžio profilaktikai dėl šių medžiagų mažo toksiškumo, gero prieinamumo ir pasisavinimo. Buvo tiriami fenoliniai junginiai, išskirti iš įvairių augalų. Pastebėta, kad stabdomas vėžio ląstelių augimas įvairiose vėžio augimo etapuose. Braškių fenoliniai junginiai (kemferolis, kvercetas, procianidina B1 ir B2) lėmė vėžio slopinamąjį poveikį žmogaus krūtims, gaubtinės žarnos ir prostatos organuose. Panašūs rezultatai buvo gauti ir anksčiau atliktuose tyrimuose, kuriuose buvo tiriamas vyno ekstraktas bei žalioji arbata. Juose gausiai buvo randama polifenolių: resveratrolis,

kvercetino, katechino, epikatechino. Flavonoidai iš citrusinių vaisių inhibuoja HL-60 leukemijos ląstelių augimą. Studijos su kaemferoliu parodė, kad ši medžiaga sumažina kiaušidžių bei krūties vėžinių ląstelių augimą [56].

Flavonoidų įtaka širdies ir kraujagyslių sistemai. Tyrimų metu nustatyta, kad kvercetinas reikšmingai mažina kraujospūdį. Tyrime dalyvavo pacientai, kurie turėjo pirmo laipsnio hipertenziją (n=22) ir pacientai, kurie turėjo polinkį į hipertenziją (n=19). Tyrimas atliekamas atsitiktinių imčių, dvigubai aklas, placebo kontroliuojamas. Dozė – 730 mg per dieną. Tyrimo trukmė – 28 dienos. Pirmojo laipsnio hipertenzija sergančiųjų pacientų kraujospūdis tyrimo metu buvo reikšmingai sumažėjęs (2 pav.). Sistolinis kraujo spaudimas sumažėjo 7 mm Hg, diastolinis – 5 mm Hg. Bendras vidutinis kraujospūdis buvo sumažėjęs lyginant su placebo grupe. Pacientai, kurie gavo placebo - reikšmingo rezultato nepatyrė. Pacientai, kurie turėjo polinkį į hipertenziją reikšmingo poveikio nepajuto. Tyrimo metu pastebėtas kliniškai reikšmingas poveikis susijęs su insultu ir koronarinės širdies liga. 14 proc. pacientų turinčių pirmo laipsnio hipertenziją mirtingumas sumažėjo nuo paminėtų ligų. Kitų tyrimų metu taip pat buvo nustatyta, kad pacientams neturintiems hipertenzijos kvercetinas neturi reikšmingo poveikio [57].



2 pav. Kvercetino poveikis širdies ir kraujagyslių sistemai [57]

Antimikrobinis, priešvirusinis, antiparazitinis flavonoidų poveikis. Citrusinių augalų vaisiuose nustatytas flavonoidas hisperidinas apsprendžia priešvirusinį, antimikrobinį, antiparazitinį

poveikius. Flavonoidai augaluose atlieka svarbų vaidmenį kovojant bakterijas, grybus, virusus. Ši savybė panaudojama maisto bei farmacijos pramonėje kaip natūralus konservantas.

Augaluose randami glikozilinti flavonoidai, jų sudėtyje yra cukrus – šis faktorius lemia flavonoido bioprieinamumą. Flavonoidai pasižymi antimikrobinio poveikiu, tačiau jų efektyvumas skiriasi. Tai priklauso nuo flavonoido cheminės struktūros, molekulės konformacijos, hidrofiliskumo, tirpumo bei mikroorganizmo rūšies. Flavonoidų antibakterinio poveikio mechanizmas nėra visiškai aiškus. Yra manoma, kad flavonoidai veikia DNR sintezę, taip įtakojamas mikroorganizmo judėjimas, bei fermentų veikla [1].

Tyrimas buvo atliekamas su greipfrutų sulčių ekstraktu. Jame gausu flavanonų: naringinas, hisperidinas. Rezultatai parodė, kad antimikrobinis poveikis pasireiškė tiek prieš gram+, tiek prieš gram-bakterijas [58].

Kitas tyrimas įrodė flavonoidų (kvercetino, kverticrino, hisperidino, rutino) antivirusinį poveikį. Tyrimas atliekamas su žmonių α -herpes virusu. Kvercetinas ir kvercitrinas žymiai sumažino virusinį aktyvumą, tuo tarpu kiti du minėtieji flavonoidai antivirusiniu poveikiu nepasižymėjo. Kvercetinas ir kvercitrinas padidino ląstelės viduje esančio cAMP lygį, tuo tarpu hisperidinas, rutinas cAMP lygio nepaveikė. Tai leidžia daryti išvadą kad antivirusinis poveikis susijęs su ląstelėje padidėjusiu cAMP kiekiu [59].

Atlikta daug tyrimų su natūraliomis augalinėmis vaistinėmis žaliavomis pasižyminčiomis antiparazitiniu poveikiu. Tyrimai buvo atliekami su žmogaus limfinės sistemos parazitais. Rezultatai parodė kad flavonoidas hisperidinas turi antiparazitinį poveikį tik *in vitro*. Atliekant tyrimą *in vivo* - antiparazitinis poveikis nepasireiškė. Tai paaiškinama tuo, kad hisperidinas patekęs į organizmą buvo metabolizuojamas organizmo sistemų ir paverstas neaktyviu metabolitu [60].

Iš citrusinių vaisių išskirti flavonoidai pasižymėjo priešgrybeliniu poveikiu. Flavonoidai (kvercetinas, kverticrinas, hisperidinas, rutinas) buvo veikiami *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium emitectum* ir *Penicillium expansum* grybų šeimų padermėmis. Gauti rezultatai patvirtino, kad flavonoidų mišinys veiksmingai naikina grybų ląsteles. Flavonoidai gali būti panaudoti kaip natūralūs priedai maisto pramonėje [61].

Flavonoidų įtaka imuninei sistemai. Tyrimai buvo atliekami su flavonoidais gausiu maistu bei gėrimais (šviežios ir konservuotos daržovės, juodasis šokoladas, raudonasis vynas, pomidorų, multivitaminų, morkų sultys) įvairaus amžiaus žmonių. Tyrimo dalyviai buvo suskirstyti į tris grupes; sveiki, rizikos grupėje bei sergantys. Rezultatai parodė, kad imunomoduliacinis poveikis sveikiems žmonėms nepasireiškė, rizikos grupėje jis buvo nežymus, sergantiesiems – didelis. Didesnį įtaką flavonoidų gausus maistas turėjo senyviems žmonėms [62].

Antiglikeminis flavonoidų poveikis. Tyrimai buvo atliekami iš *Jatropha gossypifolia* L. augalo išskirtais flavonoidais. Eksperimentas buvo atliekamas naudojant laboratorinės peles. Buvo

vertinamas gliukozės pasisavinimas C2C12 raumenų ląstelėse ir 3T3-L1 adipocituose. Tyrimų rezultatai parodė, kad flavanoidų ekstraktas žymiai sumažino gliukozės kiekį audiniuose (32 proc.), tačiau jokio pasikeitimo nebuvo pastebėta vertinant kraujo gliukozės kiekį. Nustatyta, kad raumenų ląstelėse efektas buvo didesnis nei adipocituose [63]. Obelių lapuose kaupiamas dihidrochalkonų grupės junginys floridzinas yra konkurencinis SGLT1 ir SGLT2 inhibitorius, nes konkuruoja su D-gliukoze dėl prisijungimo prie receptorių pernešėjų; tai sumažina gliukozės transportą inkstuose, dėl to sumažėja gliukozės kiekis kraujyje [64]. Floridzinas yra potencialus farmacijos produktas antrojo tipo cukrinio debeto gydymui, tačiau atsiradus sintetiniams analogams gilesni jo antidiabetinio poveikio tyrimai buvo nutraukti [65].

1.5. Flavonoidų reikšmė augalams

Flavonoidų glikozidai apsaugo augalų lapus nuo ilgalaikių regimosios šviesos sukeliamų oksidacinių pažeidimų. Kvercetino junginiai gali apsaugoti augalo membraniniame apvalkale išsidėsčiusius chloroplastus nuo regimosios šviesos sukiamo singletinio deguonies generavimo [66]. Natūralių antioksidantų dažniausiai aptinkama sveikų augalų lapų ląstelėse. Antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių flavonoidų biosintezė padidėja tiek esant žemo lygio, tiek ir aukšto lygio apšvietimui (šviesos radiacijai), kaip atsakas į azoto išsekimą augaluose [67]. Glikozidų pasisavinimas padidėja ne tik dėl augalo apšvitos UV - B (315 - 280 nm bangos ilgio) spinduliais, bet gali padidėti ir dėl kitokio stresinio aplinkos poveikio, pavyzdžiui, šaknų zonos druskingumo padidėjimo [68]. Fotooksidacinis stresas augaluose pasireiškia dėl reaktyvių deguonies formų susidarymo. Natūralūs antioksidantai geba neutralizuoti neigiamą reaktyvių deguonies formų poveikį, sugerdami dalį ultravioletinių saulės spindulių, taip pat sudarydami kompleksus su geležies ir vario jonais [66]. Flavonoidai, be gebėjimo apsaugoti augalų lapus nuo fotooksidacinio streso, taip pat padeda augalui išgyventi ir veikiant kitokiems stresiniams aplinkos poveikiams, pavyzdžiui, sausrui, aukštai aplinkos temperatūrai, aplinkos taršai [66, 69, 70]. Apibendrinus, galima teigti, kad flavonoidai yra svarbūs, siekiant pagerinti augalų atsparumą tiek biotiniams, tiek ir abiotiniams stresams.

Flavonoidai atlieka pirmines antioksidacines funkcijas atsakydami į įvairius abiotinius stresus augaluose. Jie yra veiksmingi endogeninio augsino judėjimo reguliatoriai, todėl gali atlikti augalų vystymosi reguliatorių vaidmenį [71]. Flavonoidai geba kontroliuoti atskirų augalo organų ir viso augalo vystymąsi. Taip natūralūs antioksidantai prisideda prie streso sukeltų morfogeninių atsakų augaluose. Apibendrinus, galima teigti, jog flavonoidai padeda efektyviai kontroliuoti vystymosi procesus eukariotinėse ląstelėse.

1.6 Apibendrinimas

Flavonoidai pasižymi plačiu terapinio poveikio spektru. Obelų lapai kaupia didelius kiekius biologiškai aktyvių junginių. Obelų lapų ekstraktu praturtinti preparatai gali būti naudojami ligų gydymui. Literatūroje plačiai aprašomi obelų lapų kokybiniai tyrimai, o kiekinė obelų lapų sudėtis nagrinėta mažiau. Aktualu atlikti kiekinės sudėties tyrimus obelų lapuose vegetacijos metu. Tyrimo rezultatai leistų nustatyti kada obelų lapai kaupia didžiausią kiekį aktyvių junginių, tai leistų racionaliai planuoti vaistinės žaliavos paruošas.

TYRIMO METODAI

2.1. Reagentai ir medžiagos

Obuolių ir obelių lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimams panaudoti 'Ligol' veislės obelių lapų ėminiai, užauginti Lietuvoje, Babtuose, LAMMC filiale Sodininkystės ir daržininkystės instituto eksperimentiniame sode. 'Ligol' veislė (žieminė veislė, sukurta Lenkijoje) yra viena iš pagrindinių Lietuvoje kultivuojamų komerciniams tikslams skirtų obelių veislių. Tai viena geriausių žieminių obelių veislių intensyviems sodams, vertinama dėl gero derliaus ir ilgai išsilaikančių, puikios prekinės kokybės vaisių. Obelių lapų fenolinių junginių kiekinės sudėties palyginamiesiems tyrimams ėminiai rinkti 2013 m. Obelių lapų ėminiai fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimo tyrimams vegetacijos metu rinkti skirtingais fenologiniais tarpsniais 2013 m. (2 lentelė).

Reagentai:

Išgrynintas vanduo, etanolis 96,3 proc. v/v („Stumbras“, Kaunas, Lietuva), natrio karbonatas („Carl Roth GmbH + Co. KG“, Karlsruhe, Vokietija), vandeninis aliuminio (III) chloridas („Fluka“, Seelze, Vokietija), ledinė acto rūgštis („Fluka“, Seelze, Vokietija), vandeninis heksametilentetraminas („Lachema“, Neratovice, Čekija), natrio acetatas („Sigma-Aldrich Chemie GmbH“, Vokietija), Folin-Ciocalteu reagentas („Sigma-Aldrich Chemie GmbH“, Vokietija), TPTZ reagentas („Alfa Aesar“, Karlsruhe, Vokietija), DPPH reagentas („Alfa Aesar“, Karlsruhe, Vokietija), geležies (III) chlorido heksahidratas („Mecobenzon“, Copenhagen, Danija). Naudoti reagentai ir tirpikliai yra analitinio švarumo.

2 lentelė. Fenologiniai tarpsniai pagal Meier [72]

Data	Metų diena	Stadija
Gegužės 20	140	Lapų vystymasis (skleidimasis)
Birželio 3	154	
Birželio 17	168	Pirmieji pilnai išsiskleidę lapai, auga ir skleidžiasi nauji lapai
Liepos 1	182	
Liepos 15	196	
Liepos 29	210	
Rugpjūčio 12	224	

Rugpjūčio 26	238	Branda. Lapai pilnai subrendę, produktyvūs, intensyviai vykdančys fotosintezę
Rugsėjo 9	252	
Rugsėjo 23	266	
Spalio 7	280	
Spalio 21	294	Lapų senėjimas
Lapkričio 4	308	

2.2. Naudota aparatūra

Ultragarso vonelė „Sonorex Digital 10P Bandelin“ (Berlynas, Vokietija), spektrofotometras „Beckman DU-70 Spectrophotometer“ (Fulertonas, JAV), vakuuminė spinta „SPT.200 Vacuum Drier“ (Krokuva, Lenkija), svarstyklės „Sartorius CP64-0CE“ (Vokietija), filtro popierėliai „Filtrak GmbH“ (Niederschlag, Vokietija), pipetės „Eppendorf Research“ (JAV)

2.3. Tiriamojo pavyzdžio paruošimas

Surinkti obelių lapai džiovinti liofilizatoriuje „Zirbus“ („Zirbus technology GmbH“, Vokietija). Liofilizavimas vykdytas 0,01 mbar slėgyje, kondensoriaus temperatūra -85°C . Liofilizuoti obelių lapai homogenizuojami naudojant elektrinį malūną „Retsch 200“ („Retsch GmbH“, Vokietija). Atsveriama 0,25 g. Atsvertus mėginius, atitinkamai po kiekvieną užpilame 10ml 70 proc. etanoliu ir ekstrahuojame ultragarso vonelėje Sonorex Digital 10 P („Bandelin electronic GmbH“, Vokietija) 60°C temperatūroje, 40 min. Ultragarso stipris – 480 W, dažnis – 35000 Hz. Gautas ekstraktas centrifuguojamas 7 min., naudojant „Hermle Z206A“ centrifugą („Denville Scientific Inc.“, JAV). Centrifugos rotorius apskukų dažnis – 7000 apsisukimų per minutę. Po centrifugavimo supernatantas nupilamas nuo nuosėdų.

2.4. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu

Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas spektrofotometru, naudojant Folin-Ciocalteu reagentą.

Reagentai:

1) Darbinis Folin-Ciocalteu tirpalo paruošimas: 10 ml Folin-Ciocalteu reagentas praskiedžiamas iki 100ml distiliuotu vandeniu.

2) 7,5 proc. Na_2CO_3 tirpalo paruošimas: 75g NaCO_3 ištirpinama distiliuotame vandenyje 1000 ml matavimo kolboje.

Tirpalas A. 0,2 ml tiriamojo ekstrakto sumaišoma su 4 ml 96 proc. (v/v) etanolio.

Tirpalas B. Paruoštas 1ml A tirpalas sumaišomas su 5ml 10proc. Folin-Ciocalteu reagento ir 4 ml 7,5 proc. natrio karbonato tirpalu. Lyginamasis mėginys gaminamas vietoje tirpalo A naudojant 0,25 ml išgryninto vandens. Tirpalas laikomas 1 val tamsoje.

Mėginių šviesos absorbciją matuojame bangos ilgiui (λ) esant 765nm. Bendras fenolinių junginių kiekis galo rūgšties ekvivalentu (mg/ml) pagal kalibracijos lygtį. Galo rūgšties koncentracijų intervalas 0-8 mg/ml

Kalibracijos lygtis: $y=0,12x + 0,0173$; $R^2=0,9988$

Bendras fenolinių junginių kiekis (X, mg/g) absoliučiai sausoje žaliavoje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$X \text{ (mg/g)} = \frac{X_1 \times V}{m}$$

X_1 - bendras fenolinių junginių kiekis mg/ml;

V - tiriamos žaliavos ekstrakto gamybai naudoto ekstrahento tūris ml;

m - absoliučiai sausos žaliavos masė g.

2.5. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu

Bendras flavonoidų kiekis nustatomas spektrofotometru taikant reakciją su aliuminio (III) chloridu, rūgščioje aplinkoje.

Naudojama modifikuota Urbonavičiūtės ir kt. straipsnyje aprašyta metodika [73].

Tiriamojo mėginio paruošimas: 0,2 ml ekstrakto sumaišoma su 2 ml 96,3 proc. (v/v) etanolio, 0,1 ml 30 proc. (v/v) vandeninio acto rūgšties tirpalo, 0,3 ml 10 proc. (v/v) vandeninio aliuminio chlorido tirpalo, 2 ml išgryninto vandens, 0,4 ml 5 proc. (v/v) vandeninio heksametilentetramino tirpalo.

Lyginamojo mėginio paruošimas: 0,2 ml ekstrakto, sumaišoma su 2 ml 96 proc. (v/v) etanolio, įpilama 0,1 ml 30 proc. acto rūgšties ir 2,7 ml išgryninto vandens

Tiriamųjų tirpalų šviesos absorbcija matuojama po 30 min (bangos ilgis $\lambda=407$). Bendras flavonoidų kiekis išreiškiamas rutino ekvivalentu (mg/ml) pagal kalibracijos lygtį. Rutino koncentracijų intervalas 0-0,85 mg/ml.

Kalibracijos lygtis: $y=1,0269x + 0,004$; $R^2=0,9990$

Penkių lygmenų kalibravimo grafikas sudarytas, naudojant koncentracijos etaloninius rutino tirpalus.

Bendras flavonoidų kiekis (mg/g) absoliučiai sausoje žaliavoje apskaičiuojamas iš formulės:

$$X \text{ (mg/g)} = \frac{X_1 \times V}{m}$$

X_1 - bendras flavonoidų kiekis mg/ml;

V - tiriamos žaliavos ekstrakto gamybai naudoto ekstrahento tūris ml;

m - absoliučiai sausos žaliavos masė g.

2.6. Bendro proantocianidinų kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu

Bendras proantocianidinų kiekis nustatytas spektrofotometru taikant reakciją su DMCA (4-dimetilaminocinamaldehydas) etanoliniu vandenilio chlorido rūgšties tirpalu (9:1 v/v).

Obelių lapų ekstraktas (10 µl) sumaišomas su 3 ml 0,1 proc. DMCA etanoliniu vandenilio chlorido rūgšties tirpalu. Lyginamasis tirpalas: 3 ml 0,1 proc. DMCA tirpalo sumaišoma su 10 µl išgryninto vandens. Po 5 min matuojama šviesos absorbcija (bangos ilgis $\lambda=640$). Bendras proantocianidinų kiekis išreiškiamas (–)-epikatechino ekvivalentu (mg/ml) pagal (–)-epikatechino kalibracijos lygtį. (–)-Epikatechino koncentracijų intervalas 0-1 mg/ml

Kalibracijos lygtis: $y=4,6598x + 0,042$; $R^2=0,9997$

Bendras proantocianidinų kiekis (mg/g) absoliučiai sausoje žaliavoje apskaičiuojamas iš formulės:

$$X \text{ (mg/g)} = \frac{X_1 \times V}{m}$$

X_1 - bendras fenolinių junginių kiekis mg/ml;

V - tiriamos žaliavos ekstrakto gamybai naudoto ekstrahento tūris ml;

m - absoliučiai sausos žaliavos masė g.

2.7. Obelių lapų ėminių ekstraktų antiradikalinio aktyvumo nustatymas spektrofotometrinio ABTS radikalų-katijonų surišimo metodu

Antiradikalinis tiriamųjų obelių lapų ekstraktų aktyvumas įvertintas ABTS metodu, naudojant modifikuotą R. Re ir kt. pasiūlytą metodiką [74]. ABTS motininis tirpalas gaminamas iš ABTS miltelių (2 mmol/l) juos tirpinant 0,7 mmol/l vandeniniame kalio persulfato tirpale. Gautas tirpalas laikomas 16-17 val. kambario temperatūroje, tamsoje vietoje. Per šį laiką ABTS ir kalio persulfato tirpalas visiškai sureaguoja ir išlieka stabilus ilgiau nei 2 paras. Darbinio $ABTS^{*+}$ tirpalo gamyba: $ABTS^{*+}$ motininis tirpalas skiedžiamas išgrynintu vandeniu, kol matuojant 734 nm bangos ilgio šviesos absorbciją nustatomi $0,8 \pm 0,03$ absorbcijos vienetai.

Tiriamąo tirpalo gamyba: 1 µl tiriamąo ekstrakto sumaišoma su 3 ml darbinio ABTS⁺ tirpalo. Kaip lyginamasis tirpalas naudojamas išgrynintas vanduo. Po 60 min. spektrofotometru matuojamas tiriamąo tirpalo šviesos absorbcijos sumažėjimas esant 734 nm bangos ilgiui. Antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas µmol TE/g pagal trolokso kalibracinę lygtį. Trolokso koncentracijų intervalas 0-2 mg/ml.

$$\text{Kalibracijos lygtis: } y=0,00008x + 0,0112; \quad R^2=0,9997$$

2.8. Obelų lapų ėminių ekstraktų antiradikalinio aktyvumo nustatymas spektrofotometriniu DPPH[•] radikalų surišimo metodu

Antiradikalinis obelų lapų ekstraktų aktyvumas nustatytas DPPH[•] laisvojo radikalo surišimo metodu, taikant modifikuotą Brand-Williams ir kt. naudotą metodiką [31]. Darbinis DPPH[•] tirpalas standartizuojamas pagal jo absorbciją $0,8 \pm 0,03$ ($\lambda=517\text{nm}$). Lyginamasis tirpalas - 96 proc. etanolis. 10 µl tiriamąo ekstrakto sumaišoma su 3 ml darbinio DPPH[•] tirpalo. Po 30 min. matuojamas tiriamąo tirpalo šviesos absorbcijos sumažėjimas esant 517 nm bangos ilgiui. Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuojamas µmol TE/g pagal trolokso kalibracinę lygtį. Trolokso koncentracijų intervalas 0–2 mg/ml.

$$\text{Kalibracijos lygtis: } y=0,0002x+0,048; \quad R^2=0,9954.$$

2.9. Obelų lapų ėminių ekstraktų antiradikalinio aktyvumo nustatymas spektrofotometriniu TFPH radikalų – katijonų surišimo metodu

100 ml matavimo kolboje 0,5 ml paruošto TFPH tirpalo sumaišoma su 0,1 ml 100 mM K₂S₂O₈ ir 70 ml 4 M sulfato rūgšties. Pripilama 4M sulfato rūgšties iki 100 ml. Gautas tirpalas laikomas tamsoje 15-20 min. Spektrofotometru matuojame tirpalo absorbcijos dydį prie $\lambda=502\text{nm}$ bangos. Išmatuota absorbcija turi būti $0,70 \pm 0,1$. Į mėgintuvėlius pilame 3ml darbinio TFPH⁺ tirpalo ir po 10µl ekstrakto. Paliekame stovėti tamsoje 30 min. Matuojame tirpalo absorbcijos dydį. TFPH⁺ radikalo surišimas išreiškiamas µmol TE/g pagal trolokso kalibracinę lygtį. Trolokso koncentracijų intervalas 0 — 0,4 mg/ml.

$$\text{Kalibracijos lygtis: } y=0,00004x - 0,0037; \quad R^2=0,9992$$

2.10. Obelų lapų ėminių ekstraktų redukcinio aktyvumo nustatymas spektrofotometriniu FRAP metodu

Redukcinis aktyvumas nustatomas tiriamąjį tirpalą veikiant FRAP tirpalu. Paimame natrio acetato trihidrato, TPTZ ir geležies chlorido heksahidrato tirpalus ir juos sumaišome atitinkamai santykiu 10:1:1, naudojant modifikuotą Benzie ir Strain metodiką [75].

Natrio acetato trihidrato gamyba. Gaminamas 300 mM acetatinis buferis: atsveriamas 3,1 g natrio acetato, suberiama į 1000 ml kolbą, įpilama 16 ml ledinės acto rūgšties ir skiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės (pH=3,6).

TPTZ tirpalo gamyba. 50 ml distiliuoto vandens sumaišoma su 0,1695 ml koncentruota chloro rūgštimi. Gautame 40 mM vandenilio rūgšties tirpale tirpinama 0,1562 g TPTZ miltelių. Gaunamas 10 mM TPTZ tirpalas (2,4,6–Tri(2–Pyridyl)1,3,5–triazine 98 proc.).

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

Tiriamasis tirpalas: 10 µl tiriamojo ekstrakto sumaišoma su 3 ml FRAP reagento tirpalo. Lyginamasis tirpalas: 3 ml FRAP reagento tirpalo sumaišoma su 10 µl išgryninto vandens. Po 30 min. matuojama 593 nm bangos ilgio šviesos absorbcija

Antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas µmol TE/g pagal trolokso kalibracinę lygtį. Trolokso koncentracijų intervalas 0 — 2 mg/ml.

Kalibracijos lygtis: $y=0,0001x + 0,0433$ $R^2=0,9966$

2.11. Obelių lapų ėminių ekstraktų antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo apskaičiavimas

Obelių lapų ėminių ekstraktų antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas apskaičiuotas pagal trolokso kalibravimo grafiką ir išreikštas µmol TE/g absoliučiai sausai žaliavai. TE atitinka trolokso kiekį (µmol), kuris tokiomis pat tyrimo sąlygomis turi identišką antioksidacinį aktyvumą, kaip 1 g augalinės žaliavos. TE apskaičiuojamas iš formulės:

$$TE (\mu\text{mol/g}) = \frac{A + b}{a \times 100} \times \frac{V_{band.(l)}}{m_{band.(g)}}$$

Čia: A – bandinio šviesos absorbcijos dydis;

a – nuolydis (angl. *slope*) iš trolokso kalibracinės kreivės lygties;

b – nuokrypis (angl. *y-intercept*) iš trolokso kalibracinės kreivės lygties;

$V_{band.}$ – tiriamos augalinės žaliavos ekstrakto bandinio tūris (ml);

$m_{band.}$ – tiriamos augalinės žaliavos atsvertas (tikslus) kiekis (g).

2.12. Tyrimų duomenų statistinis įvertinimas

Tyrimų metu gautų rezultatų matematinė statistinė analizė atlikta taikant „MS Office 2013“ („Microsoft“, JAV) paketą bei "SPSS 20" („IBM" JAV) programą. Tekste ir grafikuose duomenys pateikiami kaip trijų pakartojimų vidurkis±standartinis nuokrypis. Statistiškai patikimi skirtumai tarp skirtingu laiku nuskintų obelų lapų nustatyti atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę (ANOVA) ir taikant daugkartinio palyginimo Tukey kriterijų. Koreliacinių ryšių stiprumui įvertinti apskaičiuotas Pirsono koreliacijos koeficientas. Koreliacijos koeficiento reikšmė gali būti teigiama arba neigiama, bet ne didesnė už 1. Didelės šio koeficiento reikšmės, nepaisant to, ar jos yra teigiamos, ar neigiamos parodo stiprią koreliaciją, o mažos reikšmės – silpną koreliaciją. Skirtumai laikyti statistiškai patikimais, kai $p < 0,05$ [76, 77].

Pagal koreliacijos koeficiento reikšmę nustatomas koreliacijos stiprumas (3 lentelė).

3 lentelė. Koreliacijos stiprumo priklausomybė nuo koeficiento reikšmės

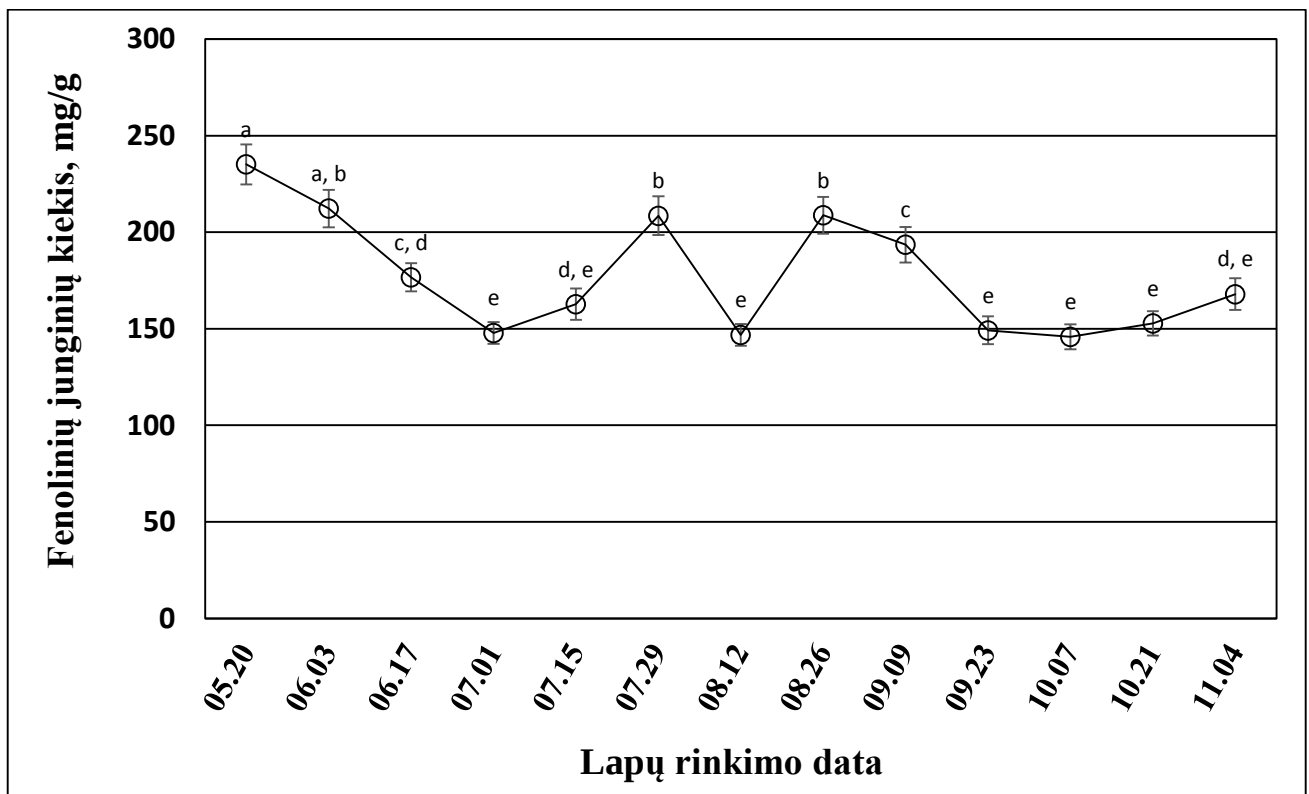
KORELIACIJOS KOEFICIENTO REIKŠMĖ	KORELIACIJOS STIPRUMAS
0,2-0,5	SILPNA
0,5-0,7	VIDUTINĖ
0,7-0,9	STIPRI
0,9-1	LABAI STIPRI

REZULTATAI

Augalo vegetacijos periodo metu antrinių metabolitų kiekinė sudėtis kinta. Priklausomai nuo fenologinio tarpsnio, klimato sąlygų šių junginių biosintezės procesai vienuose augalo organuose intensyvėja, kituose – sulėtėja. Vertinant obelų lapų fitocheminę sudėtį, svarbu nustatyti jų fenolinių junginių, flavonoidų, proantocianidinų kiekinės sudėties ir antioksidacinio aktyvumo įvairavimą vegetacijos periodo metu. Tyrimų rezultatai pateiks naujų žinių apie obelų lapų fenolinių junginių sudėties įvairavimą skirtingais fenologiniais tarpsniais, leis išsiaiškinti, kada sukaupiami didžiausi šių junginių kiekiai ir tikslingai planuoti obelų lapų – kaip potencialiai vertingos augalinės žaliavos paruošas.

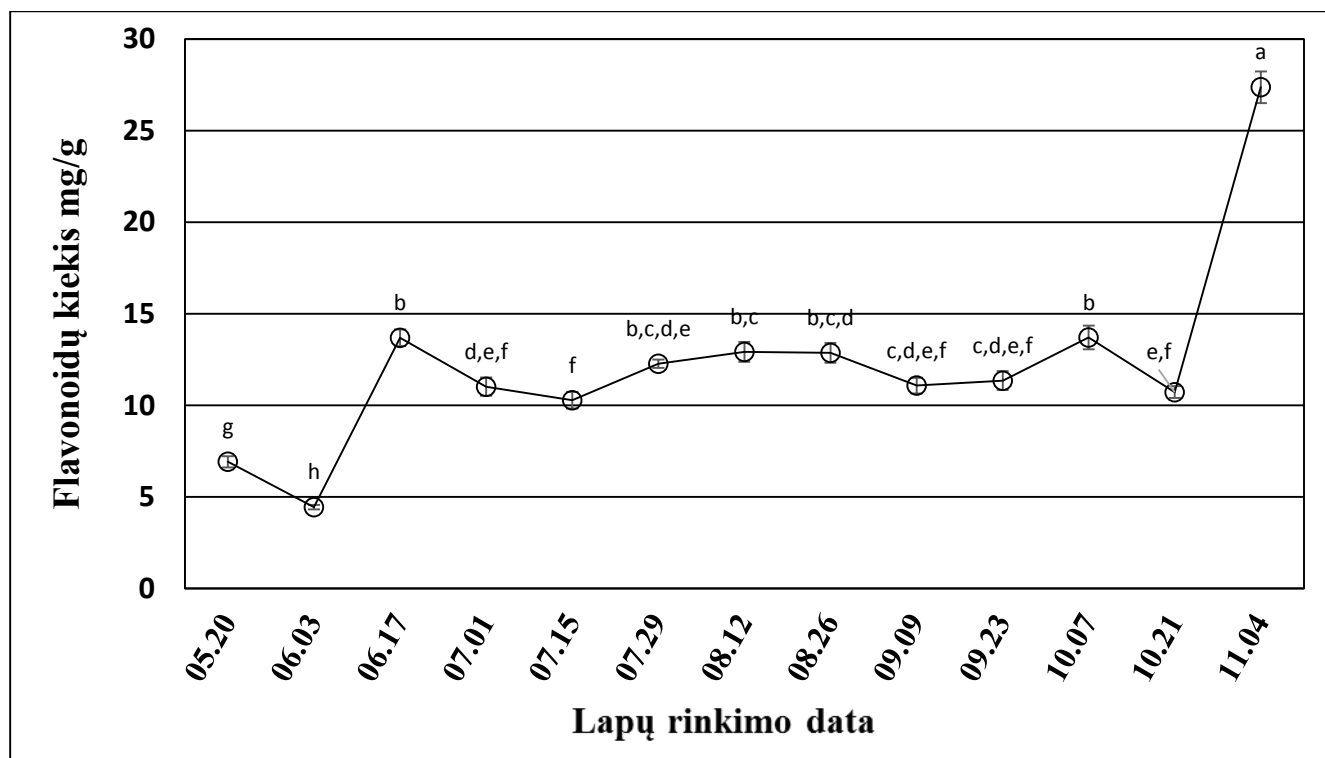
3.1. Obelų lapų fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas vegetacijos metu

Fenoliniai junginiai - vieni stipriausių natūralių antioksidantų, pasižymi antiuždegiminiu, priešvėžiniu, antimikrobinu, priešgrybeliniu poveikiu, teigiamai veikia širdies ir kraujagyslių sistemą, apsaugo nuo geltonosios dėmės degeneracijos. Aktualu atlikti obelų lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimus, siekiant nustatyti, kada sukaupiamas didžiausias biologiškai aktyvių junginių kiekis. Tyrimų rezultatai leistų racionaliai planuoti augalinės žaliavos paruošas.



3 pav. Fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas obelų lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu
 *Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių

Vegetacijos metu fenolinių junginių kiekis įvairavo. Didžiausias fenolinių junginių kiekis obelų lapuose buvo nustatytas gegužės 20 dieną ($235,15 \pm 10,34$ mg/g) (3 pav.). Rezultatai statistiškai patikimai skyrėsi nuo visų kitų bandinių rezultatų (išskyrus birželio 3 dieną rinkto bandinio) ($212,26 \pm 7,35$ mg/g) (3 pav.). Fenolinių junginių kiekis obelų lapuose mažėjo iki liepos 1 ($147,78 \pm 5,67$ mg/g). Pirmuose pilnai išsiskleidusiuose lapuose fenolinių junginių kiekis didėja ir liepos 29 dieną pasiekia $208,56 \pm 10$ mg/g (3 pav.) Fenologinio tarpsnio pabaigoje fenolinių junginių kiekis mažėja ir rugpjūčio 12 dienos ėminyje yra mažiausias $146,76 \pm 5,65$ mg/g (3 pav.) Obelų lapų brandos pradžioje fenolinių junginių kiekis padidėja iki $208,76 \pm 9,56$ mg/g rugpjūčio 26 dienos ėminyje, tačiau brandos metu minėtųjų medžiagų kiekis mažėja ir pabaigoje siekia $145,81 \pm 6,53$ mg/g spalio 7 dienos ėminyje (3 pav.). Senėjimo stadijoje šių junginių kiekis šiek tiek padidėjo dėl šalnų poveikio, bet šis padidėjimas nebuvo statistiškai reikšmingas.

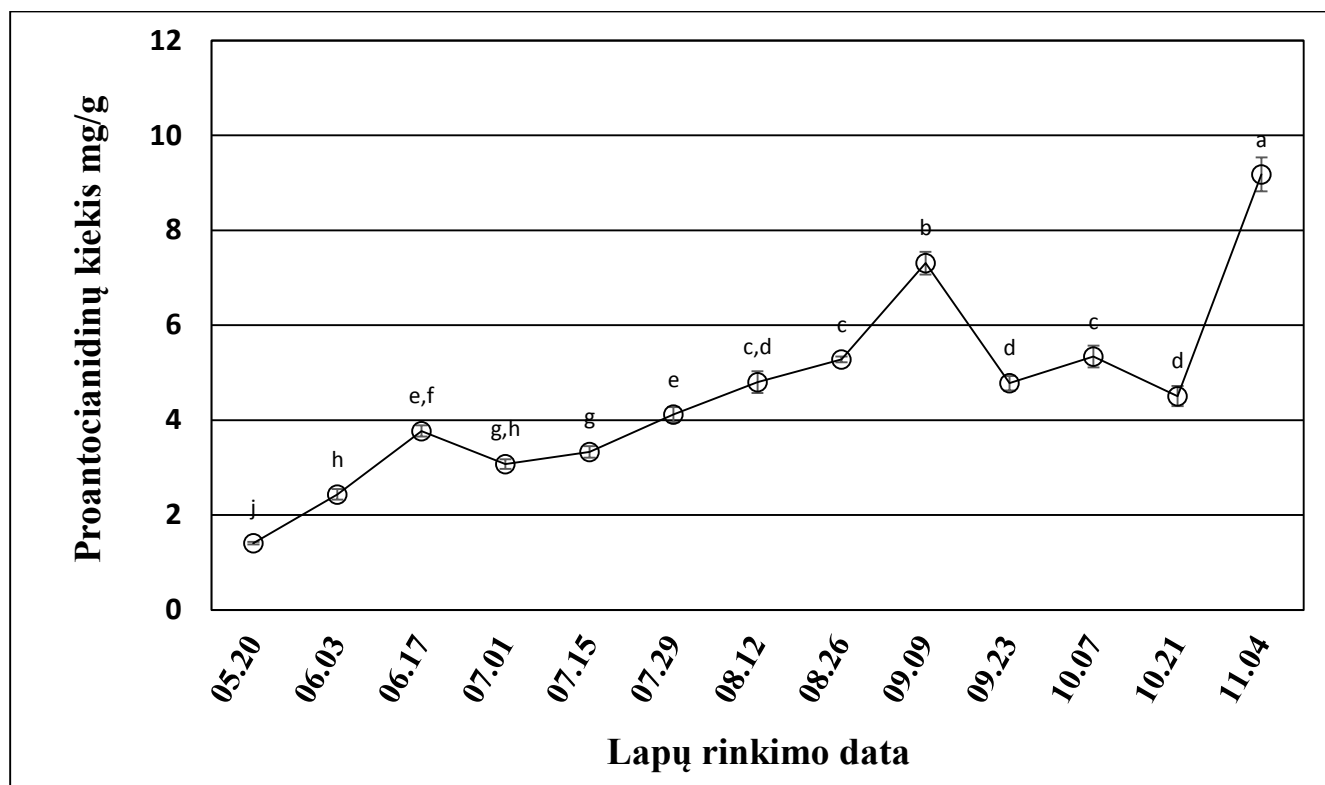


4 pav. Flavonoidų kiekinės sudėties įvairavimas obelų lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu
*Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių

Vegetacijos periodo metu obelų lapų ėminiuose bendras flavonoidų kiekis buvo įvairus. Mažiausias bendras flavonoidų kiekis ($4,4 \pm 0,12$ mg/g) nustatytas lapų skleidimosi fenologinės fazės pabaigoje (birželio 3 dieną) surinktų obelų lapų ėminių etanoliniuose ekstraktuose. Birželio 17 dieną flavonoidų kiekis padidėjo iki $13,69 \pm 0,45$ mg/g (4 pav.). Nuo birželio 17 iki spalio 21 dienos flavonoidų kiekis kito neženkliai ir svyravo nuo $10,28 \pm 0,45$ mg/g (liepos 15d.) iki $13,70 \pm 0,65$ mg/g (spalio 7d.) (4 pav.). Vegetacijos periodo pabaigoje bendras flavonoidų kiekis padidėjo iki $27,37 \pm 0,86$ mg/g ir buvo statistiškai patikimai didžiausias iš visų tirtųjų ėminių (4 pav.). Tokį ryškų bendro

flavonoidų kiekio padidėjimą galėjo lemti augalo pasiruošimas žiemai, dėl šalnų pakitę metaboliniai procesai, kai vanduo ar kitos medžiagos pernešamos iš lapų į kitus augalo organus [4].

Obelių lapų senėjimo stadijoje minėtųjų junginių kiekis stipriai padidėjo. Didžiausias flavonoidų kiekis buvo nustatytas lapkričio 4 dieną ($27,37 \pm 0,86$ mg/g) (4 pav.). Šio bandinio rezultatai statistiškai patikimai skyrėsi nuo visų kitų bandinių rezultatų.

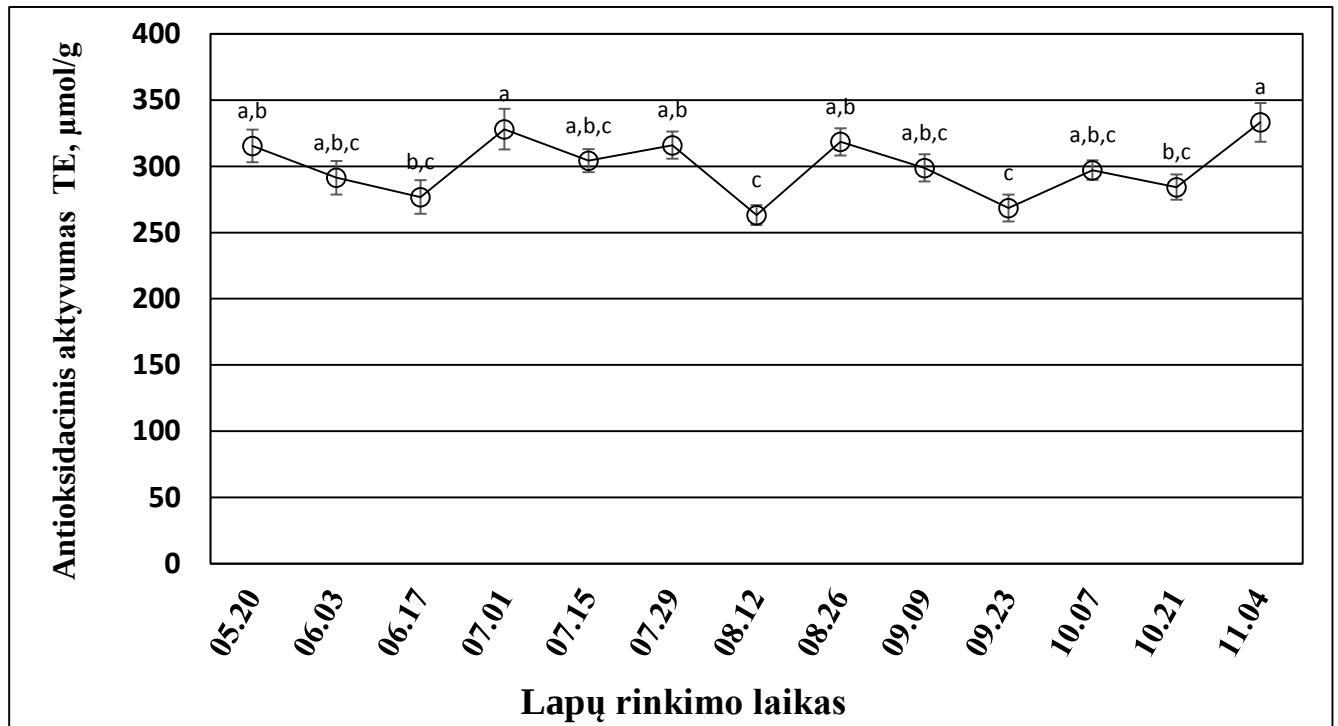


5 pav. Proantocianidinų kiekinės sudėties įvairavimas obelių lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu
*Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių

Atlikus proantocianidinų kiekio tyrimus nustatyta, kad obuolių lapų ėminių ekstraktuose bendras proantocianidinų kiekis varijuoja nuo $1,41 \pm 0,03$ mg/g iki $9,18 \pm 0,36$ mg/g (5 pav.). Didžiausias proantocianidinų kiekis ($9,18 \pm 0,36$ mg/g) nustatytas obelių lapų ekstraktuose lapų senėjimo fenologinio tarpsnio pabaigoje (5 pav.). Lapkričio 4 dienos mėginyje proantocianidinų kiekis statistiškai patikimai skyrėsi nuo visų kitų mėginių kiekių, atliktų kitu metu. Mažiausias proantocianidinų kiekis $1,41 \pm 0,03$ mg/g nustatytas lapų vystymosi stadijoje gegužės 20 ėminyje (5 pav.). Šiuo metu gauti rezultatai statistiškai patikimai skyrėsi nuo visų kitų rezultatų gautų kitu metu. Lapų skleidimosi stadijoje proantocianidų kiekis didėja ir birželio 17 pasiekia $3,77 \pm 0,12$ mg/g. Skleidžiantis lapams, proantocianidinų kiekis didėja ir pasiekus brandą (rugsėjo 9 diena $7,31 \pm 0,24$ mg/g) proantocianidinų kiekis šiek tiek sumažėja. Lapų senėjimo stadijoje jų ženkliai padidėja ir pasiekia $9,18 \pm 0,36$ mg/g lapkričio 4 dieną (5 pav.).

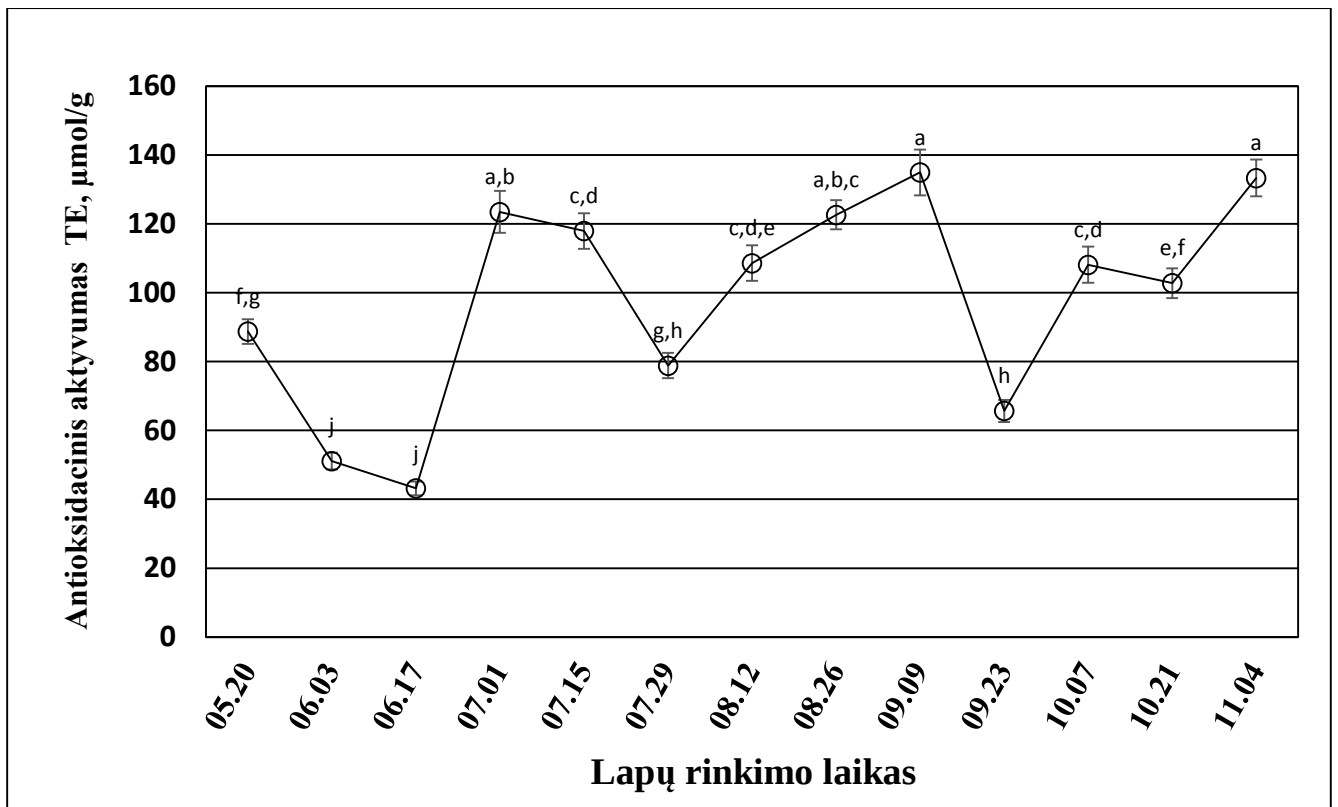
3.2. Obelių lapų etanolinių ekstraktų antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo nustatymas vegetacijos metu

Norint apsaugoti organizmą nuo laisvųjų radikalų, yra svarbu su maistu gauti pakankamai antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių medžiagų. Obelių lapų ekstraktai gali praturtinti maistą antioksidacinėmis medžiagomis. Svarbu išsiaiškinti, kada obelių lapai pasižymi didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu. Tyrimai leistų nustatyti, kada geriausia ruošti paruošas ekstraktų gamybai ar individualių junginių išskyrimui.



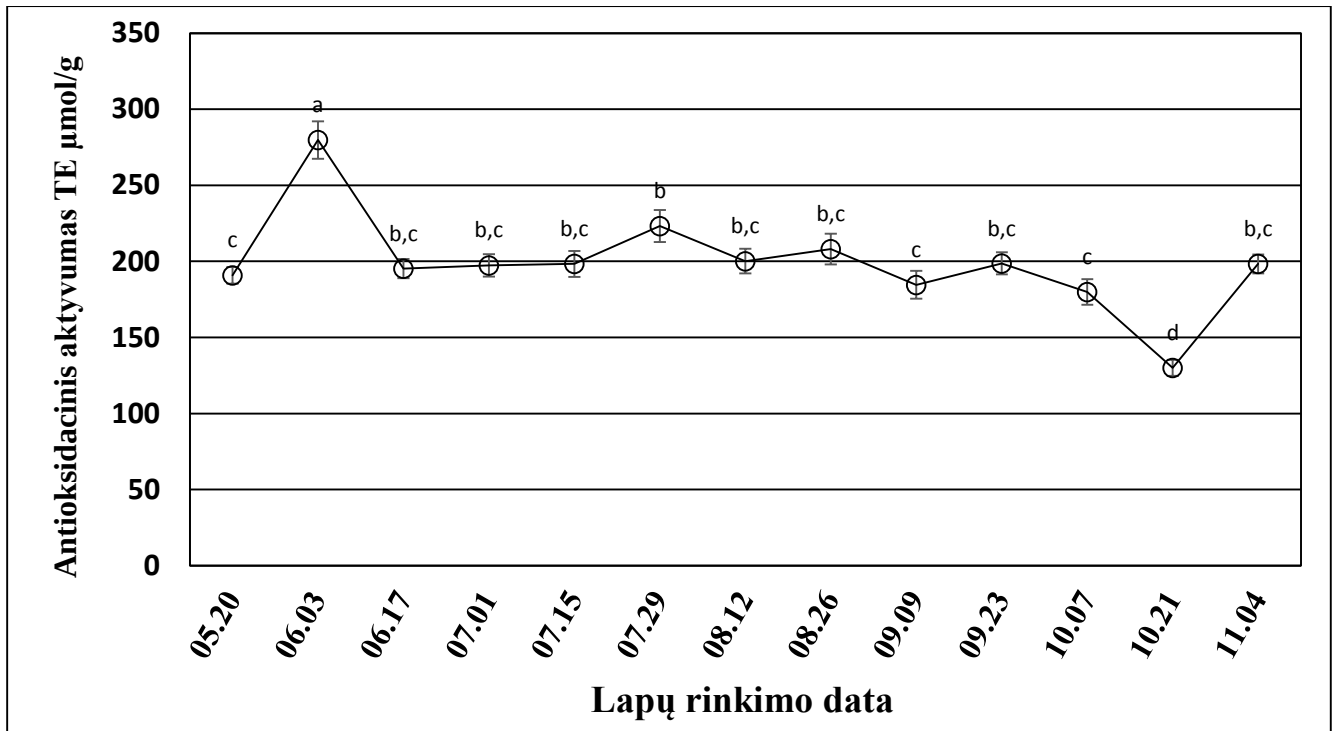
6 pav. ABTS antiradikalinio aktyvumo įvairavimas obelių lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu
*Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių

Lyginant su FRAP, DPPH, TFPH antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodais, ABTS metodu nustatytas obelių lapų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas vegetacijos periodo metu svyruoja neženkiai. Vegetacijos periodo pradžioje, lapams skleidžiantis gegužės 20 dieną, nustatytas antioksidacinis aktyvumas $315,38 \pm 12,32$ TE $\mu\text{mol/g}$. Lapų vystymosi stadijoje antioksidacinis aktyvumas mažėja ir birželio 17 pasiekia ($276,80 \pm 12,65$ TE $\mu\text{mol/g}$) (6 pav.). Išsiskleidus lapams ir augant naujiems, antioksidacinis aktyvumas svyruoja neženkiai. Mažiausias ABTS metodu ištirtas antiradikalinis aktyvumas ($263,23 \pm 7,58$ TE $\mu\text{mol/g}$) nustatytas rugpjūčio 12 dieną surinktų obelių lapų ėminiuose (6 pav.). Lapų senėjimo fenologinio tarpsnio pabaigoje (lapkričio 4d.) obelių lapų antiradikalinis aktyvumas padidėja iki $333,29 \pm 14,64$ TE $\mu\text{mol/g}$.



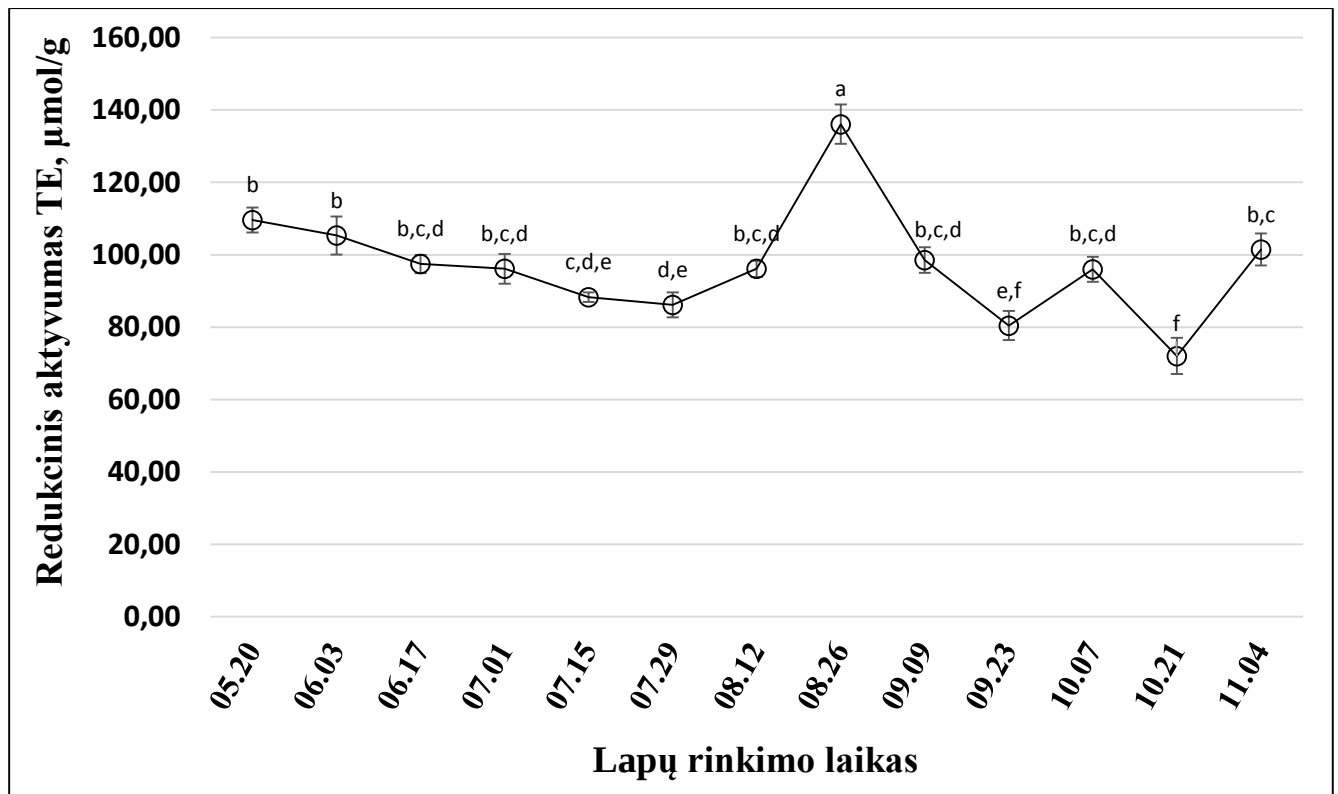
7 pav. DPPH* antioksidacinio aktyvumo įvairavimas obelių lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu
*Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių

DPPH* antioksidacinis aktyvumas lapų ėminiuose priklausomai nuo lapų ėminių rinkimo laiko varijavo nuo $43,16 \pm 2,03$ TE $\mu\text{mol/g}$ iki $134,93 \pm 6,65$ TE $\mu\text{mol/g}$ (6 pav.) Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo rugpjūčio 9 surinktų lapų etanoliniai ekstraktai ($134,93 \pm 6,65$ TE $\mu\text{mol/g}$) (7 pav). Šiek tiek mažesniu aktyvumu pasižymėjo lapkričio 4 dieną ($133,32 \pm 5,36$ TE $\mu\text{mol/g}$) ir liepos 1 dieną ($123,46 \pm 6,10$ TE $\mu\text{mol/g}$) surinkti lapai (7 pav.). Tarp šių mėginių statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo. Lapų vystymosi stadijoje lapų antioksidais aktyvumas mažėjo ir pasiekus pirmųjų pilnai išsiskleidusių lapų stadiją birželio 17 dieną buvo mažiausias ($43,16 \pm 2,03$ TE $\mu\text{mol/g}$) ir statistiškai patikimai skyrėsi nuo visų kitų bandinių, išskyrus birželio 3 bandinyje ($51,10 \pm 2,45$ TE $\mu\text{mol/g}$) (7 pav.). Rugsėjo 23 dienos mėginyje antioksidacinis aktyvumas buvo sumažėjęs iki $65,65 \pm 6,65$ TE $\mu\text{mol/g}$. Brandos metu jis pamažu didėjo ir lapų senėjimo stadijoje padidėjo iki $133,32 \pm 5,36$ TE $\mu\text{mol/g}$ (lapkričio 3 diena) (7 pav.).



8 pav. TFPH+ antiradikalinio aktyvumo įvairavimas obelų lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu
 *Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių

Statistiškai patikimai stipriausias ($p < 0,05$) antiradikalinis obelų lapų ekstraktų aktyvumas ($279,80 \pm 12,24 \mu\text{mol TE/g}$) nustatytas obelų lapų ėminių, surinktų birželio 3 dieną, etanoliniuose ekstraktuose (8 pav.). Pasibaigus lapų skleidimosi tarpsniui, TFPH+ metodu nustatytas antiradikalinis aktyvumas išlieka stabilus, kaip ir lapų brandos fenologinio tarpsnio metu. Jis svyruoja nuo $184,62 \pm 9,2 \text{ TE } \mu\text{mol/g}$ (rugsėjo 9d.) iki $223,21 \pm 10,5 \text{ TE } \mu\text{mol/g}$ (liepos 29d.) (8 pav.). Antioksidacinis aktyvumas sumažėja ir pasiekia minimumą lapų senėjimo stadijoje spalio 21 dieną ($130,01 \pm 5,34 \text{ TE } \mu\text{mol/g}$) (8 pav.). Šis bandinys statistiškai patikimai skyrėsi nuo visų kitų ėminių. Lapkričio 4 dieną nustatytas antiradikalinis aktyvumas šiek tiek padidėja iki $198,32 \pm 6,23 \text{ TE } \mu\text{mol/g}$ (8 pav.).



9 pav. FRAP redukcinio aktyvumo įvairavimas obelų lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu
 *Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių

Redukcinis aktyvumas obelų lapų ėminiuose, rinktuose skirtingų fenologinių tarpsnių metu, svyravo nuo $72,03 \pm 5,02$ TE $\mu\text{mol/g}$ iki $136,05 \pm 5,43$ TE $\mu\text{mol/g}$ (9 pav.). Didžiausias redukcinis aktyvumas nustatytas rugpjūčio 26 dieną ($136,05 \pm 5,43$ TE $\mu\text{mol/g}$) obelų lapų brandos pradžioje tirtuose ėminiuose (9 pav.). Šis mėginys statistiškai patikimai skyrėsi nuo visų kitų mėginių. Silpniausias redukcinis aktyvumas nustatytas lapų senėjimo pradžioje spalio 21 d. ($70,03 \pm 5,02$ TE $\mu\text{mol/g}$) (9 pav.). Jis statistiškai patikimai skyrėsi nuo visų kitų bandinių, išskyrus rugsėjo 23 dienos bandinio ($80,44 \pm 4,01$ TE $\mu\text{mol/g}$). Tyrimo metu nustatyta, jog redukcinis aktyvumas nuo obelų lapų vystymosi pradžios (gegužės 20 d.) iki lapų skleidimosi pabaigos (liepos 29 d.) mažėja – nuo $109,62 \pm 3,45$ TE $\mu\text{mol/g}$ iki $86,16 \pm 3,47$ TE $\mu\text{mol/g}$ (9 pav.). Didžiausias FRAP metodu įvertintas antiradikalinis aktyvumas ($136,05 \pm 5,43$ TE $\mu\text{mol/g}$) nustatytas rugpjūčio 26 dieną rinktų obelų lapų ekstraktų ėminiuose (9 pav.). Mažiausias FRAP metodu įvertintas redukcinis obelų lapų ekstraktų aktyvumas ($70,03 \pm 5,02$ TE $\mu\text{mol/g}$) nustatytas lapų senėjimo tarpsnio pradžioje, spalio 21 dieną, rinktų obelų lapų ėminių etanoliniuose ekstraktuose. Vegetacijos periodo pabaigoje (lapkričio 4 dieną) redukcinis obelų lapų ekstraktų aktyvumas padidėjo iki $101,47 \pm 4,45$ TE $\mu\text{mol/g}$ (9 pav.). Tai atspindi kitais antioksidaciniais metodais nustatytą tendenciją – vegetacijos periodo pabaigoje obelų lapų ėminių ekstraktų antiradikalinis aktyvumas statistiškai patikimai padidėja.

3.3. Obelų lapų etanolinių ekstraktų kiekinės sudėties ir antioksidacinio aktyvumo koreliacinių ryšių vertinimas

Koreliacinis ryšio stiprumas buvo įvertintas pagal Pirsono koreliacijos koeficientą ($p < 0,05$), kurio reikšmė įvertina tiesinio ryšio tarp dviejų tiriamųjų dydžių stiprumą.

4 lentelė. Obelų lapų ekstraktų fenolinių junginių, flavonoidų kiekio (mg/g), proantocianidinų kiekio ir antioksidantinio aktyvumo (TE, $\mu\text{mol/g}$) koreliacijos koeficientai

TE , $\mu\text{mol/g}$	Bendras fenolinių junginių kiekis (mg/g)	Bendras flavonoidų kiekis (mg/g)	Bendras proantocianidinų kiekis (mg/g)
ABTS	0,415*	0,415*	0,21
DPPH	-0,151	-0,151	0,545*
TFPH	0,440*	0,440*	-0,214
FRAP	0,619*	0,619*	-0,005

**Statistiškai patikimos koreliacijos ($p < 0,05$) pažymėtos žvaigždutėmis*

Atlikus statistinę koreliacinę analizę, nustatyta, kad stipriausiai koreliuoja bendras fenolinių junginių bei bendras flavonoidų kiekis ir FRAP metodu įvertintas obelų lapų etanolinių ekstraktų redukcinis aktyvumas (0,619, $p < 0,05$). Vidutinio stiprumo teigiamos koreliacijos nustatytos tarp bendro fenolinių junginių bei bendro flavonoidų kiekio bei ABTS ir TFPH metodais įvertinto tiriamųjų ekstraktų antiradikalinio aktyvumo (atitinkamai 0,440 ir 0,415, , $p < 0,05$; 4 lentelė). Vidutiniškai stipri teigiama koreliacija nustatyta tarp bendro procianidinų kiekio ir DPPH metodu įvertinto antriradikalinio

3.4 Tyrimo rezultatų apibendrinimas

Apibendrinant atliktų tyrumų rezultatų duomenis galima teigti, kad fenolinių junginių, flavonoidų, proantocianidinų kiekis vegetacijos periodo metu didėja. Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatyti lapų skeidimosi stadijoje. Didžiausias flavonoidų ir proantocianidinų kiekis nustatytas brandos ir lapų senėjimo fenologiniuose tarpsniuose. Gauti rezultatai patvirtina literatūroje rastus duomenis, kad obelų lapuose, jų vegetacijos periodo pabaigoje flavonoidų ir proantocianidinų kiekiai yra didžiausi. Galima teigti, kad fenologiniai tarpsniai yra vienas iš veiksnių įtakančių kiekinės fenolinių junginių, flavonoidų, proantocianidinų sudėtį. Nustatyta, kad obelų lapai brandos metu pasižymėjo stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu. Įvertinus koreliacinio ryšio stiprumą tarp obelų lapų ekstraktų sudėtyje esančių fenolių junginių, flavonoidų, proantocianidinų kiekio ir antioksidacinio aktyvumo, nustatyti

vidutinio stiprumo koreliacija. ($p < 0,05$). Gauti tyrimo rezultatai patvirtina, kad antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo fenolinių junginių kiekio.

IŠVADOS

1. Ištirtas bendras fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas obelų lapuose vegetacijos periodo metu. Didžiausias kiekis fenolinių junginių kiekis ($235,15 \pm 10,34$ mg/g, $p < 0,05$) nustatytas lapų vystymosi pradžioje (05-20), mažiausias ($145,81 \pm 7,29$ mg/g, $p < 0,05$) – lapų brandos fenologinio tarpsnio pabaigoje (10-07) skintų obelų lapų ėminiuose. Vegetacijos pabaigoje (11-04) fenolinių junginių kiekis padidėjo iki $167,91 \pm 6,23$ mg/g.
2. Įvertintas flavonoidų kiekinės sudėties įvairavimas obelų lapuose vegetacijos periodo metu. Didžiausias flavonoidų kiekis ($27,37 \pm 0,86$ mg/g, $p < 0,05$) nustatytas vegetacijos periodo pabaigoje (11-04) skintų obelų lapų ėminiuose, mažiausias ($4,4 \pm 0,12$ mg/g, $p < 0,05$) – lapų vystymosi fenologinio tarpsnio metu (06-03) surinktų obelų lapų ėminiuose.
3. Įvertintas proantocianidinų kiekinės sudėties įvairavimas obelų lapuose vegetacijos periodo metu. Didžiausias bendras proantocianidinų kiekis ($9,18 \pm 0,36$ mg/g, $p < 0,05$) nustatytas lapų senėjimo metu (11-04), mažiausias kiekis ($1,41 \pm 0,03$ mg/g, $p < 0,05$) – lapų vystymosi pradžioje (05-20) skintų obelų lapų ėminiuose.
4. Stipriausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas lapų brandos metu (08-09) ir lapų brandos periodo pabaigoje (11-04) rinktų obelų lapų ėminiuose (atitinkamai $134,93 \pm 5,62$ ir $133,93 \pm 8,5$ $\mu\text{mol TE/g}$, $p < 0,05$). Silpniausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas birželio 17 dieną skintų obelų lapų ėminiuose ($43,16 \pm 2,03$ $\mu\text{mol TE/g}$, $p < 0,05$). Aktyvumui nustatyti buvo naudojami ABTS, DPPH, FRAP ir TFPH UV-VIS spektrofotetriniai metodai.
5. Stipriausia teigiama koreliacija ($0,619$, $p < 0,05$) nustatyta tarp bendro fenolinių junginių bei bendro flavonoidų kiekio ir FRAP metodu įvertinto obelų lapų etanolinių ekstraktų redukcinio aktyvumo. Didžiausias koreliacijos koeficientas nustatytas tarp flavonoidų kiekio ir FRAP metodu nustatyto redukcinio aktyvumo. Jis siekė $0,619$. Tokia pati koreliacija buvo pasiekta tarp bendro flavonoidų kiekio ir FRAP metodu nustatyto redukcinio aktyvumo.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Ištirus Lietuvoje auginamos '*Ligol*' veislės obelų lapų ekstraktuose esančius fenolinius junginius, flavonoidus, proantocianidinus ir jų sudėties įvairavimą vegetacijos periodo metu, įvertinus obelų lapų ekstraktų antioksidantinį aktyvumą, rekomenduojame paruošas ekstraktų gamybai ar individualių junginių išskyrimui vykdyti jų vystymosi brandos pradžioje, nes šiuo tarpsniu obelų lapų ekstraktuose sukaupiami didžiausi antioksidantinių savybių turintys junginiai.

Obelų lapai yra perspektyvi, pigi ir labai mažai naudojama augalinė žaliava, pasižyminti specifiniu biologiniu poveikiu. Obelų lapuose dominuojantis junginys floridzinas pasižymi antidiabetiniu aktyvumu nedidindamas kūno svorio, todėl iš obelų lapų gauti augaliniai ekstraktai yra perspektyvi augalinė žaliava maisto papildų, skirtų II tipo cukrinio diabeto profilaktikai.

Atliktų tyrimų rezultatai papildys ir patikslins turimas žinias apie obelų lapų kiekinės sudėties ir antioksidacinio aktyvumo įvairavimą jų vegetacijos metu.

Norint išsiaiškinti atskirų veislių obelų lapuose esančių biologiškai aktyvių junginių kokybinę ir kiekinę sudėtį vegetacijos metu, tikslinga atlikti tolimesnius tyrimus pritaikant selektyvesnius nustatymo metodus (efektyviąją skysčių chromatografiją, kapiliarinę elektroforezę).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] Mehrdad Iranshahia, Ramin Rezaeeb, Hamideh Parhiz, Ali Roohbakhshc, Fatemeh Soltani, „Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin,“ *Life sciences*, t. 137, pp. 125-32, 2015.
- [2] FAOSTAT, „Food and agriculture organization of the united nations statistics division,“ FAOSTAT, [Tinkle]. Available: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. [Kreiptasi 26 01 2016].
- [3] Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH., „Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds,“ *Molecules*, t. 18(2), pp. 2328-75, 2013.
- [4] Ferreres F, Gomes D, Valentão P, Gonçalves R, Pio, R, Alves, E et al., „Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: variation of phenolics and antioxidative potential,“ *Food Chemistry*, pp. 114:1019-1027, 2009.
- [5] Marjan Ghasemkhani, „Resistance against fruit tree cancer in apple,“ *Swedish University of Agricultural Sciences*, 2015.
- [6] Petkovsek M, Slatnar A, Stampar F, Veberic R., „Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab,“ *Biologia Plantarum*, t. 55 (4), p. 725–30, 2011.
- [7] Dorota Bonarska-Kujawa, Sylwia Cyboran, Jan Oszmiański, and Halina Kleszczyńska, „Extracts from apple leaves and fruits as effective antioxidants,“ *Journal of Medicinal Plants Research*, t. 5(11), pp. 2339-2347, 2011.
- [8] Gosch, C., Halbwirth, H., & Stich, K., „Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants,“ *Phytochemistry*, t. 71(8), p. 838–843, 2010.
- [9] C. A. Uthurry , C. Gómez-Cordovés, „Phenolic compound content and Antioxidant activity of Infusion drugs,“ *Journal of Tea Science Research*, t. 5, pp. 1-10, 2015.
- [10] Sara Jelodarian, Abdolrasoul Ebrahimabadi, Ahmad Khalighi and Hossain Batooli , „Evaluation of antioxidant activity of *Malus domestica* fruit extract from Kashan area,“ *African Journal of Agricultural Research* , t. 10(20), pp. 2136-2140, 2015.
- [11] Roma Semaškienė, Virgilijus Mikšys, Virginijus Feiza, Žydrė Kadžiulienė, Sigitas Lazauskas, Vytautas Ruzgas, Giedrė Samuolienė, Naujausios rekomendacijos žemės ir miškų ūkiui, Akademija, Kėdainių r.: Spaudvita, 2015.
- [12] R. Milania, A. Marcellinia, G. Montagnera, A. Baldisserottob, S. Manfredinib, R. Gambaria, I. Lamprontia,, „Phloridzin derivatives inhibiting pro-inflammatory cytokine expression in human cystic fibrosis IB3-1 cells,“ *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, t. 78, p. 225–233, 2015.

- [13] Martina Danihelová, Jana Viskupičová, Ernest Šturdík, „Lipophilization of flavonoids for their food,“ *VERSITA*, t. 5, p. 59–69, 2012.
- [14] Timothy Colin Hardman, Simon William Dubrey, „Development and Potential Role of Type-2 Sodium-Glucose Transporter Inhibitors for Management of Type 2 Diabetes,“ *Diabetes Therapy*, t. 2 (3), pp. 133-145, 2011.
- [15] Shi-yang Zhang, Bao-ying Li, Xiao-li Li, Mei Cheng, Qian Cai, Fei Yu, Wei-dong Wang, Min Tan, Guang Yan, Shi-lian Hu, and Hai-qing, „Effects of phlorizin on diabetic retinopathy according to isobaric tags for relative and absolute quantification–based proteomics in db/db mice,“ *Molecular Vision*, p. 812–821, 2013.
- [16] Joanna Kolniak-Ostek, Jan Oszmianański, Aneta Wojdyło, „Effect of apple leaves addition on physicochemical properties of cloudy beverages,“ *Industrial Crops and Products*, t. 44, p. 413–420, 2013.
- [17] Jackson J.E., *Biology of Apples and Pears.*, United Kingdom: Cambridge University Press, 2003.
- [18] Phipps, J.B et al., „A checklist of the subfamily Maloideae (Rosaceae),“ *Canadian Journal of Botany Impact Factor*, t. 68(10), p. 2209, 1990.
- [19] S.M Kalausienė, *Maistiniai augalai gydymui, kosmetikai, kulinarijai*, Vilnius: Asveja, 2007.
- [20] Nour V, Trandafir I, Ionica M.E., „Compositional Characteristics of Fruits of several Apple (*Malus domestica* Borkh.) Cultivars,“ *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, t. 38 (3), p. 228–233, 2010.
- [21] Bonarska-Kujawa D., Cyboran S., Oszmianański J., Kleszczyńska H., „Extracts from apple leaves and fruits as effective antioxidants,“ *Journal of Medicinal Plants Research*, t. 5(11), pp. 2339–2347, 2011.
- [22] Gerhauser C., „Cancer Chemopreventive Potential of Apples, Apple Juice, and Apple Components,“ *Planta Medica*, t. 74(13), p. 1608–24, 2008.
- [23] Hilt, P., Schieber, A., Yildirim, C., Arnold, G., Klaiber, I., Conrad, J., Carle, R., „Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy,“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, t. 51(10), p. 2896–2899, 2003.
- [24] Mindaugas Liaudanskas, Pranas Viškelis, Raimondas Raudonis, Darius Kviklys, Norbertas Uselis and Valdimaras Janulis, „Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Malus domestica* Leaves,“ *The Scientific World Journal*, p. 10, 2014.
- [25] M. Mikulic Petkovsek, F. Stampar and R. Veberic, „Increased phenolic content in apple leaves infected with the apple scab pathogen,“ *Journal of Plant Pathology*, t. 90(1), pp. 49-55, 2008.
- [26] Marksienė R, *Optiniai analizės metodai*, Kaunas: Kauno medicinos universiteto leidykla, 2008.

- [27] Pelozo, M.I.G., Cardoso, M.L.C., Mello, J.C.P., „Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia. cupana* var. *sorbilis*,“ *Brazilian Archives Of Biology And Technology Impact Factor*, t. 51, pp. 447-451, 2008.
- [28] Gülçin, I.; Sat, I.G.; Beydemir, S.; Elmastas, M.; Küfrevioğlu, Ö.I., „Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.),“ *Food Chemistry*, pp. 393-400, 2004.
- [29] C. o. Europe, Determination of tannins in herbal drugs. In *European Pharmacopoeia*, Strasbourg, France, 2007.
- [30] Folin, O., Ciocalteu, V., „On tyrosine and tryptophane determinations in proteins,“ *Journal of Biological Chemistry*, pp. 627-650, 1927.
- [31] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, „Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity,“ *LWT—Food Science and Technology*, t. 28, pp. 25-30, 1995.
- [32] Briedis V, Kasparavičienė G, „ Kai kurie antioksidantų veikimo aspektai, mažinant neigiamą laisvųjų radikalų poveikį,“ *Biomedicina*, t. 2, pp. 187-9, 2002.
- [33] Qi, L.W.; Wen, X.D.; Cao, J.; Li, C.Y.; Li, P.; Yi, L.; Wang, Y.X.; Cheng, X.L.; Ge, X.X., „Rapid and sensitive screening and characterization of phenolic acids, phthalides, saponins and isoflavonoids in Danggui Buxue Tang by rapid resolution liquid chromatography-diode array detection coupled with time-of-flight mass spectrometry,“ *Rapid Communications*, t. 22, pp. 2493-2509, 2008.
- [34] Maruška A, Kornysova O, Machtejevas E, *Efektyviosios skysčių chromatografijos pagrindai*, Kaunas: Vytauto Didžiojo universiteto leidykla, 2005.
- [35] Rijke E, Out P, „Analytical separation and detection methods for flavonoids,“ *Journal of Chromatography*, t. 1112, pp. 31-63, 2006.
- [36] Chen, X.J, Ji, H., Zhang, Q.W., Tu, P.F., Wang, Y.T., Guo, B.L., Li, S.P., „A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography,“ *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, t. 46, pp. 226-235, 2008.
- [37] Constantine D. Stalikas, „Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids,“ *Journal of separation science*, t. 30, pp. 3268-3295, 2007.
- [38] Kindt M, Orsini MC, Costantini B., „Improved high-performance liquid chromatography-diode array detection method for the determination of phenolic compounds in leaves and peels from different apple varieties,“ *Chromatography Science*, t. 45(8), pp. 507-14, 2007.
- [39] Skerget, Pitchaon Maisuthisakul, „Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities,“ *Food Chemistry*, t. 89, p. 191–198, 2005.

- [40] E. Enaud, C. Humeau, B. Piffaut, M. Girardin, „Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin,“ *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, t. 27, pp. 1-6, 2004.
- [41] Aneta Wojdyło, Jan Oszmian'ski, Renata Czemerys, „Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs,“ *Food Chemistry*, p. 940–949, 2007.
- [42] Isabelle Pontaisa, Dieter Treutterb, Jean-Pierre Paulina, Marie-Noe, Ile Brisseta, „Erwinia amylovora modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system,“ *Physiologia Plantarum*, t. 132, p. 262–271, 2008.
- [43] M. Mikulic Petkovsšek, F. Štampar, R. Veberič, „Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, Venturia inaequalis,“ *Physiological and Molecular Plant Pathology*, t. 74, pp. 60-67, 2009.
- [44] Belén Suárez, Ángel L. Álvarez, Yolanda Diñeiro García, Gloria del Barrio, „Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace,“ *Food Chemistry*, t. 120, p. 339–342, 2010.
- [45] Anna Picinelli, Enrique Dapena, and Juan Jose Mangas, „Polyphenolic Pattern in Apple Tree Leaves in Relation to Scab,“ *Food Chemistry*, t. 43, pp. 2273-2278, 1995.
- [46] Chen, J., Song, Y., Li P, „Capillary high-performance liquid chromatography and mass spectrometry for simultaneous determination of major flavonoids, iridoid glucosides and saponins in Flos Lonicerae,“ *Journal of chromatography*, t. 1157, pp. 217-226, 2007.
- [47] Paulke, A., Schubert-Zsilavecz, M., Wurglics, M., „Determination of St. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection,“ *Chromatography*, t. 832, pp. 109-113, 2006.
- [48] Arora A, Nair MG, Strasburg GM., „Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system,“ *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, t. 24(9), pp. 1355-63, 1998.
- [49] Perron, Brumaghim JL., „A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding,“ *Cell Biochemistry and Biophysics*, t. 53(2), pp. 75-100, 2009.
- [50] Procházková, Boušová I, Wilhelmová N., „Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids,“ *Fitoterapia*, t. 82(4), pp. 513-23, 2011.
- [51] Heidi B. Graversen, Eleonora Miquel Becker, Leif H. Skibsted, Mogens L Andersen, „Antioxidant synergism between fruit juice and α -tocopherol. A comparison between high phenolic black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and high ascorbic blackcurrant (*Ribes nigrum*),“ *European Food Research and Technology*, t. 226(4), pp. 737-743, 2008.
- [52] Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA., „Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications,“ *The American Journal of Clinical Nutrition*, t. 74(4), pp. 418-25, 2001.

- [53] D. Procházková , I. Boušová b , N. Wilhelmová, „Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids,“ *Fitoterapia*, t. 82, p. 513–523, 2011.
- [54] Boots AW, Haenen GR, Bast A., „Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical,“ *European Journal of Pharmacology*, t. 585, pp. 325-37, 2008.
- [55] Sergent, T., Vanderstraeten, J., Winand, J., Beguin, P., Schneider, Y-J, „Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances,“ *Food chemistry*, t. 135(1), pp. 68-73, 2012.
- [56] Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W, „Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits,“ *Food Chemistry*, t. 66(4), pp. 401-36, 1999.
- [57] Abigail J. Larson, J. David Symons and Thunder Jalili, „Quercetin: A Treatment for Hypertension?,“ *A Review of Efficacy and Mechanisms*, 2010.
- [58] Cvetnić Z, Vladimir-Knezević S., „Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract,“ *Acta Pharmaceutica Sinica*, t. 54(3), pp. 243-50, 2004.
- [59] I. Mucsi, B.M. Pragai, „Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids,“ *Experientia*, p. 930–931, 1985.
- [60] V. Lakshmi, S.K. Joseph, S. Srivastava, S.K. Verma, et al, „Antifilarial activity in vitro and in vivo of some flavonoids tested against *Brugia malayi*,“ *Acta Tropica*, t. 116, p. 127–133, 2010.
- [61] M.P. Salas, G. Céliz, H. Geronazzo, M. Daz, et al, „Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species,“ *Food Chemistry*, t. 124, p. 1411–1415, 2011.
- [62] Ilaria Peluso, Cristiana Miglio, Giuseppa Morabito, Francesca Ioannone & Mauro Serafini, „Flavonoids and Immune Function in Human: A Systematic Review,“ *Food Science*, t. 55, pp. 383-395, 2015.
- [63] Sergio Granados, Norman Balcázar, Alis Guillén and Fernando Echeverri, „Evaluation of the Hypoglycemic Effects of Flavonoids and Extracts from *Jatropha gossypifolia* L,“ *Molecules*, t. 20, pp. 6181-6193, 2015.
- [64] Tatoń, J, Piatkiewicz, P, Czech, A., „Molecular physiology of cellular glucose transport - a potential area for clinical studies in diabetes mellitus,“ *Endokrynologia Polska*, t. 61 (3), p. 303–10, 2010.
- [65] Chao, Edward C.; Henry, Robert R., „SGLT2 inhibition — a novel strategy for diabetes treatment,“ *Nature Reviews Drug Discovery*, t. 9 (7), p. 551–9, 2010.
- [66] Agatia G., Azzarellob E., Pollastri S., Tattini M., „Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance,“ *Plant Science*, t. 196, pp. 67-76, 2012.

- [67] Lillo C., Lea U.S., Ruoff P, „Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway,“ *Plant Cell and Environment*, t. 31, p. 587 – 601, 2008.
- [68] Agati G., Biricolti S., Guidi L., Ferrini F., Fini A., Tattini M., „The biosynthesis of flavonoids is enhanced similarly by UV radiation and root zone salinity in *L. vulgare* leaves,“ *Journal of Plant Physiology*, t. 168, p. 204 – 212, 2011.
- [69] Noori M., Askari M., Beigi F, „Robinia Peseudoacacia L. Flavonoids in Defence of Plant against Soil Crude Oil Pollution,“ *International Journal of Ecosystem*, t. 2(1), pp. 1 - 5, 2012.
- [70] Nakabayashi R., Yonekura - Sakakibara K., Urano K., Suzuki M., Yamada Y., Nishizawa T., Matsuda F., Kojima M., Sakakibara H., Shinozaki K., Michael A. J., Tohge T., Yamazaki M., Saito K, „Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by over accumulation of antioxidant flavonoids,“ *The Plant Journal*, t. 77 (3), pp. 367 - 79, 2014.
- [71] Brunetti C., Di Ferdinando M., Fini A., Pollastri S., Tattini M, „Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans,“ *International Journal of Molecular Sciences*, t. 14, pp. 3540 - 3555, 2013.
- [72] Meier U., „Growth stages of mono and dicotyledonous plants,“ *BBCH Monograph*, p. 53, 2001.
- [73] Urbonavičiūtė A, Jakštas V, Kornysova O, Janulis V, Maruška, „Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts,“ *Chromatography* , t. 1112 (1–2), p. 339–44, 2006.
- [74] R.Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C.Rice-Evans, „Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,“ *Free Radical Biology & Medicine*, t. 26, p. 1231–1237, 1999.
- [75] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, „Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration,“ *Methods in Enzymology*, t. 299, pp. 15-27, 1998.
- [76] Raimundas Vaitkevičius, Aušra Saudargienė, Statistika su SPSS psichologiniuose tyrimuose, Kaunas: VDU leidykla, 2006.
- [77] Vydas Čekanavičius, Gediminas Murauskas, Statistika ir jos taikymas, Vilnius: TEV, 2002.

PRIEDAI

Dalyvavimas mokslinėse konferencijose:

1. Faustas Levulis, Mindaugas Liaudanskas, Jonas Viškelis, Pranas Viškelis, Darius Kviklys, Valdimaras Janulis. Fenolinių junginių kiekinės sudėties ir antioksidacinio aktyvumo įvairavimas obelių lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu. Dvidešimt antroji tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija „Žmogaus ir gamtos sauga 2016“. 2016 m. gegužės 4-6 d. Akademija. Stendinis pranešimas.
2. Faustas Levulis, Mindaugas Liaudanskas, Jonas Viškelis, Pranas Viškelis, Darius Kviklys, Valdimaras Janulis. Quantitative Composition of Phenolic Compounds in Apple Leaves during Vegetation Period. Dešimtoji tarptautinė mokslinė konferencija „The Vital Nature Sign 2016“. 2016 m. gegužės 19-20 d. Vilnius. Stendinis pranešimas. Geriausio stendinio pranešimo konkurse laimėta trečia vieta.



ALEKSANDRAS STULGINSKIS UNIVERSITY

Certificate

This is to certify that

Faustas Levulis

**attended the 22nd international
scientific-practical conference**

Human and Nature Safety 2016

(May 4-6, 2016, Kaunas, Lithuania)

and presented poster scientific report

**Variability of quantitative composition of phenolic compounds and
antioxidant activity in apple leaf samples during vegetation period**

Dr. R. Zemeckis
Vice-rector

Aleksandras Stulginskis University



Assoc. prof. dr. R. Butkus
Vice-chairman of Conference
Scientific Committee

Aleksandras Stulginskis University

6 May, 2016

No. 22-08



10th International Scientific Conference

The Vital Nature Sign

19-20 May, 2016

Vilnius, Lithuania

DIPLOMA

Awarded to

Faustas Levulis

For the 3rd place
in the competition for the best poster presentation in
10th International Scientific Conference „The Vital Nature Sign“

Chairman of the Conference:
Prof. Audrius Maruška

[Signature] A.V.



ThermoFisher
SCIENTIFIC

FESTO

LaboChema

APIPRODUKTAI

Linea libera

NoSSS

NORDIC SEPARATION SCIENCE SOCIETY

GRIDA





Quantitative Composition of Phenolic Compounds in Apple Leaves during Vegetation Period



Faustas Levulis^{1*}, Mindaugas Liaudanskas¹, Jonas Viškelis², Pranas Viškelis², Darius Kviklys², Valdimaras Janulis¹

¹Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, A. Sukilelių Str. 13, LT-50166, Kaunas, Lithuania

²Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Kauno Str. 30, Babtai, LT-54333 Kaunas, Lithuania

*Corresponding author e-mail address: faustas.levulis@gmail.com

Introduction

Phenolic compounds are one of the phytochemical groups which protective properties include antioxidant, antimicrobial, anticancer and cardiovascular protective activities.

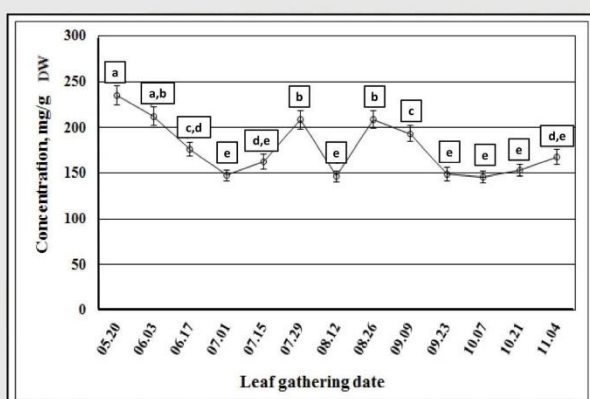
Quantitative composition of secondary metabolites varies throughout plant vegetation periods. Depending on phenological phase, climate conditions the biosynthesis processes of these compounds intensify in some plant organs and lessen in others. When evaluating phytochemical composition of apple leaves it is important to determine quantitative composition of phenolic compounds and their individual groups – flavonoid, proanthocyanidin and antiradical activity during vegetation period.

Study results provide new information on quantitative variation of phenolic compounds in apple leaves at different phases of phenology, ascertain when highest amounts of these substances accumulate and specify how to appropriately plan gathering of apple leaves as potentially beneficial herbal raw material.

The objective of this study was to investigate the quantitative composition variation of phenolic compounds during vegetation period in apple leaf samples of cultivar 'Ligol' grown in Lithuania and evaluate the antiradical activity of these extracts.

Materials and methods

'Ligol' apple leaves were harvested at different phenology phases between June and November 2013. The total phenolic compound, flavonoid and proanthocyanidin content in the apple leaf extracts was determined with UV-VIS spectrophotometry. Antioxidant activity in apple leaf extracts was determined *in vitro* with DPPH UV-VIS spectrophotometric method.



Results

Figure 1. Quantitative composition variation of phenolic compounds during vegetation period

The maximum total amount of phenolic compounds (235.15 ± 10.34 mg/g) in apple leaf samples was established at the beginning of leaf growth (May 20), the minimum (145.81 ± 7.29 mg/g) - at the end of phenology period of leaf maturation (October 7). Figure 1.

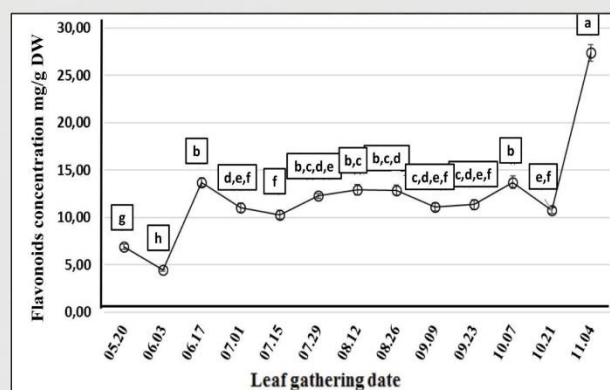


Figure 2. Quantitative composition variation of flavonoids during vegetation period

The maximum total amount of flavonoids (27.37 ± 0.86 mg/g) in apple leaf samples was established at the end of the vegetation period (November 4), the minimum (4.4 ± 0.12 mg/g) - at the phenology period of leaf development (June 17). Figure 2.

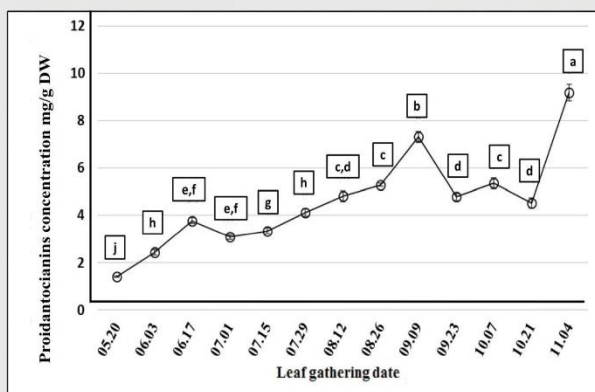


Figure 3. Quantitative composition variation of proanthocyanidins during vegetation period

The maximum total amount of proanthocyanidins (9.18 ± 0.36 mg/g) in apple leaf samples was established at the stage of leaf aging (November 4), the minimum (1.41 ± 0.03 mg/g) - at the beginning of leaf growth (May 20). Figure 3.

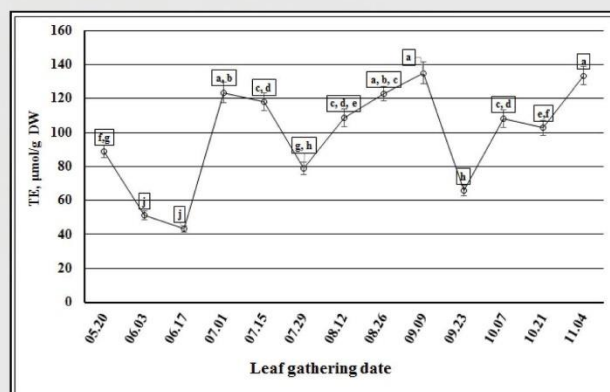


Figure 4. Antiradical activity of ethanol extracts during vegetation period

The strongest antiradical activity in apple leaf samples was established during leaf maturation phase (August 8) and at the end of maturation period (November 4) (134.93 ± 5.62 and 133.93 ± 8.5 μmol TE/g accordingly). The weakest antiradical activity in apple leaf samples was established on June 17 (43.16 ± 2.03 μmol TE/g). Figure 4.

Conclusion

Apple leaves contain large amounts of phenolic compounds therefore they are a promising material for food supplements enriched with apple leaf extracts and for production of individual compounds with specific biological activity.