

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMAKOLOGIJOS KATEDRA

RAMINTA MIMAITĖ

**PLAČIALAPIŲ GYSLOČIŲ (*PLANTAGO MAJOR* L.) LAPŲ
FENOLINIŲ JUNGINIŲ KIEKINĖS SUDĖTIES TYRIMAS**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas
Dr. Kristina Gaivelytė

Kaunas, 2017

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMAKOLOGIJOS KATEDRA

TVIRTINU:
Farmacijos fakulteto dekanas prof. dr. Vitalis Briedis

**PLAČIALAPIŲ GYSLOČIŲ (*PLANTAGO MAJOR L.*) LAPŲ
FENOLINIŲ JUNGINIŲ KIEKINĖS SUDĖTIES TYRIMAS**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas
Dr. Kristina Gaivelytė

Recenzentas

Darbą atliko
Magistrantė
Raminta Mimaitytė

Kaunas, 2017

TURINYS

SANTRAUKA	4
SUMMARY	5
SANTRUMPOS	6
ĮVADAS.....	7
DARBO TIKSLAS IR DARBO UŽDAVINIAI.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. Plačialapių gysločių morfologija ir paplitimas	10
1.2. Plačialapių gysločių lapų cheminė sudėtis ir biologiškai aktyvių junginių poveikis	11
1.3. Plačialapių gysločių lapų ekstraktų biologinis poveikis.....	13
1.4. Fenoliniai junginiai ir jų kiekybinis nustatymas augalinėje žaliavoje.....	19
1.5. Metodai antioksidantiniam aktyvumui nustatyti	21
2. TYRIMO METODIKA.....	23
2.1. Tyrimo objektas.....	23
2.2. Naudoti reagentai.....	23
2.3. Naudota aparatūra.....	23
2.4. Tyrimo metodai	24
2.4.1. Plačialapių gysločių lapų ekstraktų paruošimas	24
2.4.2. Fenolinių junginių bendro kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu	24
2.4.3. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu.....	25
2.4.4. Bendro o-dihidroksicynamono rūgšties darinių kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu.....	25
2.4.5. Antioksidantinio aktyvumo tyrimas FRAP metodu.....	26
2.4.6. Antioksidantinio aktyvumo tyrimas ABTS metodu	27
2.4.7. Antioksidantinio aktyvumo tyrimas DPPH metodu	27
2.5. Duomenų analizės metodai.....	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	29
3.1. Plačialapių gysločių lapų fenolinių junginių ekstrakcijos sąlygų parinkimas	29
3.2. Plačialapių gysločių lapų fenolinių junginių kiekinės sudėties tyrimai	30
3.3. Plačialapių gysločių lapų ekstraktų antioksidantinio aktyvumo įvertinimas spektrofotometrinio metodu	34
4. IŠVADOS.....	38
5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	39
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	40

SANTRAUKA

R. Mimaitės magistro baigiamasis darbas „Plačialapių gysločių (*Plantago major* L.) lapų fenolinių junginių kiekinės sudėties tyrimas“/ mokslinė vadovė dr. Kristina Gaivelytė; Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Farmacijos fakultetas, Farmakognozijos katedra.- Kaunas, 2017 (44 psl.).

Raktiniai žodžiai: *Plantago*, gyslotis, fenoliniai junginiai, flavonoidai, spektrofotometrija, antioksidantinis aktyvumas.

Tyrimo tikslas. Ištirti skirtinguose Lietuvos rajonuose, natūraliomis sąlygomis augančių, plačialapių gysločių lapų ekstraktuose esančių fenolinių junginių kiekius ir įvertinti antioksidantinį plačialapių gysločių lapų ekstraktų aktyvumą.

Darbo uždaviniai. Parinkti optimalias sąlygas plačialapių gysločių lapų ekstraktų gamybai. Nustatyti fenolinių junginių kiekinę sudėtį plačialapių gysločių lapų, rinktų skirtinguose Lietuvos rajonuose, ekstraktuose. Nustatyti bendrą flavonoidų ir o-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekį plačialapių gysločių lapų ekstraktuose. Nustatyti plačialapių gysločių, augančių skirtinguose Lietuvos rajonuose, lapų ekstraktų antioksidantinį aktyvumą. Įvertinti koreliacinį ryšį, tarp plačialapių gysločių lapų ekstraktuose nustatytų fenolinių junginių kiekių ir antioksidantinių aktyvumų.

Tyrimo objektas. Skirtinguose Lietuvos rajonuose augančių plačialapių gysločių lapai.

Tyrimo metodai. Bendras fenolinių junginių kiekis, bendras flavonoidų kiekis, bendras o-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekis nustatyti atliekant spektrofotometrinę analizės metodą. Spektrofotometrinu metodu su DPPH, ABTS, FRAP reagentais, nustatytas antioksidantinis aktyvumas.

Rezultatai ir išvados. Didžiausi fenolinių junginių kiekiai nustatyti ekstraktuose, gamintuose su 50 proc. (v/v) etanolio, vykdant ekstrakciją ultragarso vonelėje 20 min. Nustatyta, kad fenolinių junginių, plačialapių gysločių lapuose, kiekiai įvairavo 36,95±0,27 - 65,14±0,47 mg/g, flavonoidų 2,17 - 2,29 mg/g, o-dihidroksicinamono rūgšties darinių 18,94 - 23,40 mg/g ribose. Daugiausiai fenolinių junginių nustatyta Kauno rajone, Mastaičių apylinkėse rinktų 65,14±0,47 mg/g plačialapių gysločių lapuose, flavonoidų (2,29±0,03 mg/g) ir o-dihidroksicinamono rūgšties darinių (23,40±0,27 mg/g) - Kupiškio rajone, Naivių apylinkėse rinktų plačialapių gysločių lapuose. Didžiausias antioksidantinis aktyvumas, naudojant spektrofotometrinį ABTS (271,49±3,76 μmol TE/g) ir FRAP (307,78±3,55 μmol TE/g) metodus, nustatytas Mastaičių apylinkėse rinktiems plačialapių gysločių lapams, naudojant spektrofotometrinį DPPH metodą - Anykščių rajone, Svėdasų apylinkėse rinktiems plačialapių gysločių lapams 262,96±1,72 μmol TE/g. Atlikus koreliacinę analizę nustatyta, kad statistiškai reikšminga labai stipri teigiama koreliacija yra tarp bendro fenolinių junginių kiekio ir redukcinio aktyvumo.

SUMMARY

R. Mimaitė. Analysis of Quantitative Composition of Phenolic Compounds in Leaves of Broadleaf Plantain (*Plantago major* L.): Master's thesis / supervisor dr. Kristina Gaivelytė; Department of Pharmacognosy of the Faculty of Pharmacy in Lithuanian University of Health Sciences. Kaunas, 2017. 44 p.

Key words: *Plantago*, plantain, phenolic compounds, flavonoids, spectrophotometry, antioxidant activity.

The aim of the research: to analyse the amount of phenolic compounds in the extracts from the leaves of the naturally growing broadleaf plantains from different regions of Lithuania and to evaluate the antioxidant activity of the broadleaf plantain extracts.

Tasks of the research: to select the optimal conditions for the production of broadleaf plantain extract. To determine the quantitative composition of phenolic compounds in the extracts of broadleaf plantains picked in different regions of Lithuania. To determine the total amount of flavonoids and *o*-dihydroxycinnamic acid derivatives in the extracts of broadleaf plantain. To identify the antioxidant activity of the extract of broadleaf plantains picked in different regions of Lithuania. To evaluate the correlative connection between the amount of phenolic compounds and the antioxidant activity determined in the broadleaf plantain extracts.

The object. Leaves of the broadleaf plantain picked in different regions of Lithuania.

Research methods. The total amount of phenolic compounds, flavonoids and the amount of *o*-dihydroxycinnamic acid derivatives were determined by applying a spectrophotometric method of analysis. For determining the antioxidant activity the spectrophotometric method with DPPH, ABTS, FRAP reagents were applied.

Results and conclusions. The largest amounts of phenolic compounds were determined in the extracts produced with 50% (v/v) of ethanol in ultrasonic bath for 20 minutes. The amounts of phenolic compounds in the broadleaf plantain leaves varied from 36.95 ± 0.27 to 65.14 ± 0.47 mg/g, whereas the amount of flavonoids varied from 2.17 to 2.29 mg/g, and the amount of *o*-dihydroxycinnamic acid derivatives ranged from 18.94 to 23.40 mg/g. The largest amount of phenolic compounds was identified in the leaves of broadleaf plantains picked in the Kaunas region, i.e. 65.14 ± 0.47 mg/g; the largest amount of flavonoids (2.29 ± 0.03 mg/g) and *o*-dihydroxycinnamic acid derivatives (23.40 ± 0.27 mg/g) was determined in the leaves of broadleaf plantains picked in the Kupiškis region. The largest antioxidant activity (by applying spectrophotometric ABTS ($271,49 \pm 3,76$ $\mu\text{mol TE/g}$) and FRAP (307.78 ± 3.55 $\mu\text{mol TE/g}$) methods) was identified in the leaves of broadleaf plantains picked in the Kaunas region and by applying spectrophotometric DPPH method – in the leaves picked in Anykščiai region (262.96 ± 1.72 $\mu\text{mol TE/g}$). The correlative analysis showed a statistically significant strong positive correlation between the total amount of phenolic compounds and reduction activity.

SANTRUMPOS

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

cAMP- ciklinis adenozino monofosfatas

DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas

ESC- efektyvioji skysčių chromatografija

FRAP- geležies redukcijos antioksidantinė galia (angl. Ferric reducing antioxidant power)

ORAC- deguonies radikalų absorbcijos galia (angl. oxygen radical absorbance capacity)

ROS- reaktyviosios deguonies formos (angl. reactive oxygen species)

RP- ESC- atvirkščių fazių efektyvioji skysčių chromatografija

TPTZ- 2,4,6-tripiridil-s-triazinas

UV- ultravioletinė spinduliuotė

UV/VIS- ultravioletinių spindulių- matoma spektroskopija (angl. ultraviolet- visible spectroscopy)

ŽIV- žmogaus imunodeficito virusas

TE- Trolokso ekvivalentai

IVADAS

Augalai sintetina cheminius junginius, kurie reikalingi biologinėms funkcijoms, tokioms kaip augimas, reprodukcija, palaikyti, prisitaikyti prie nepalankių aplinkos sąlygų. Dauguma vaistiniuose augaluose kaupiamų biologiškai aktyvių junginių gali būti naudojami sveikatai gerinti, padėti įvairių ligų gydymui ar profilaktikai [33].

Vis daugiau žmonių ieško šiuolaikinei medicinai alternatyvių gydymo metodų. Įvairiose šalyse odos ligos, ypač žaizdos, yra viena iš dažniausių priežasčių, dėl ko žmonės kreipiasi į gydytojus [44]. Alternatyva šiuolaikinei medicinai, sintetiniams preparatams, gali būti preparatai, kurie pagaminti iš augalinės kilmės žaliavų. Plačialapių gysločių (*Plantago major* L.) lapai - viena iš augalinių žaliavų, kurios ekstraktai gali padėti žaizdų, odos ligų gydymui. Plačialapių gysločių lapų ekstraktai turi ir daugiau panaudojimo galimybių - virškinamojo trakto sutrikimų, kvėpavimo takų ligų lengvinimui, infekcijų slopinimui, pasižymi priešuždegiminiu, priešnavikiniu aktyvumu ir daug kitų poveikių, kurie yra žinomi dėl naudojimo liaudies medicinoje [3, 66]. Platus panaudojimas maistui ir tradicinėje medicinoje, sukėlė mokslininkų susidomėjimą, siekiant išsiaiškinti plačialapių gysločių ekstraktų veikimo mechanizmus ir pritaikyti juos terapiniam panaudojimui. Dauguma poveikių dar nėra mokslškai patvirtinti, tačiau atliekama vis daugiau tyrimų, kuriais siekiama moksliniais įrodymais pagrįsti plačialapių gysločių ekstraktų panaudojimą medicinos praktikoje, išsiaiškinti veikimo mechanizmus. Kai kurie gysločių žaliavų tradiciniai panaudojimai patvirtinti mokslinių tyrimų duomenimis, nustatyti poveikį lemiantys biologiškai aktyvūs junginiai, tačiau veikimo mechanizmai nežinomi [44].

Norint naudoti vaistinių augalų žaliavas ir jų preparatus ligų gydymui ar profilaktikai, reikia nustatyti, kokie biologiškai aktyvūs junginiai ir kokie jų kiekiai kaupiami vaistinėse augalinėse žaliavose. *Plantago* genties augalų augalinės žaliavos yra perspektyvus biologiškai aktyvių junginių šaltinis. Plačialapių gysločių augalinių žaliavų, pagrindiniai kaupiami biologiškai aktyvūs junginiai yra fenoliniai junginiai, o-dihidroksicinamono rūgšties dariniai, flavonoidai ir jų glikozidai, lipidai, polisacharidai, iridoidiniai glikozidai, vitaminai. Norint mokslškai pagrįsti plačialapių gysločių panaudojimą medicinos praktikoje, svarbu atlikti ne tik biologinio poveikio mokslinius tyrimus, aktualu atlikti plačialapių gysločių augalinių žaliavų biologiškai aktyvių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimus.

Fenoliniai junginiai - vieni plačiausiai paplitusių junginių augaluose. Fenolinių junginių nustatyta ir plačialapių gysločių augalinėse žaliavose [38]. Plačialapių gysločių augalinių žaliavų fenolinių junginių kiekinė analizė svarbi norint įvertinti žaliavos cheminę sudėtį, kokybę, prognozuojant augalinių žaliavų antioksidantinį aktyvumą. Fenolinių junginių kiekiai plačialapių gysločių žaliavose gali skirtis, priklausomai nuo augavietės, klimatinės sąlygų. Nerasta mokslinių

duomenų apie kiekinę fenolinių junginių *Plantago* rūšies lapų augalinių žaliavų, rinktų Lietuvoje, analizę. Norint įvertinti Lietuvoje augančių plačialapių gysločių lapų cheminę sudėtį, kokybę, svarbu nustatyti fenolinių junginių kiekių plačialapių gysločių lapuose įvairavimą. Gauti tyrimų rezultatai papildys jau turimas žinias, leis detaliau įvertinti gamtinius augalų resursus, galės būti panaudoti planuojant augalinių žaliavų rinkimą.

Darbo tikslas - nustatyti Lietuvoje augančių plačialapių gysločių lapų fenolinių junginių kiekinę sudėtį ir įvertinti lapų ėminių ekstraktų antioksidantinį aktyvumą.

DARBO TIKSLAS IR DARBO UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

Nustatyti Lietuvoje augančių plačialapių gysločių lapų fenolinių junginių kiekinę sudėtį ir įvertinti lapų ėminių ekstraktų antioksidantinį aktyvumą.

Darbo uždaviniai:

1. Parinkti plačialapių gysločių lapų ekstrakcijos sąlygas.
2. Nustatyti natūraliose augavietėse surinktų plačialapių gysločių lapų fenolinių junginių kiekinę sudėtį.
3. Ištirti natūraliose augavietėse surinktų plačialapių gysločių lapų flavonoidų kiekinę sudėtį.
4. Nustatyti natūraliose augavietėse surinktų plačialapių gysločių lapų *o*-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekinę sudėtį.
5. Įvertinti natūraliose augavietėse surinktų plačialapių gysločių lapų ėminių ekstraktų antioksidantinį aktyvumą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Plačialapių gysločių morfologija ir paplitimas

Plačialapis gyslotis (*Plantago major* L.) priklauso gyslotinių (*Plantaginaceae* Juss.) šeimai, gysločių (*Plantago* L.) genčiai. *Plantago* genčiai priskiriami dažniausiai daugiamečiai, rečiau vienmečiai žoliniai augalai, turintys belapius žiedynkočius arba šakotus stiebus. Lapai išsidėstę skrotele, rečiau - ant stiebo. Žiedai taisyklingi, dvilyčiai, su dvigubais apyžiedžiais, su pažiedėmis, susitelkę į varpas. Taurelė triskiltė arba keturskiltė. *Plantago* genties augalų vainikėlis - plėnelinis, nenukrintantis, su cilindrišku vamzdeliu. Turi keturis kuokelius ilgais koteliais, vieną piestelę, siūlišką liemenėlį, dvilizdę ar ne visiškai keturlizdę mezginę. Vaisius - dėžutė [1].

Plantago gentyje yra virš 250 rūšių augalų, paplitusių vidutinio ar vėsaus klimato srityse. Lietuvoje daugiausiai auga keturios rūšys: smiltyninis gyslotis, plačialapis gyslotis, siauralapis gyslotis, trumpakotis gyslotis. Visoje Lietuvoje labai dažnas yra plačialapis gyslotis. Liaudiškai plačialapis gyslotis dar vadinamas gyslalapiu, gyslažole, gyslūnalapiu, gyslote, kelio letena, kelretiniu, rauktžole, traukažole, trauklapiu, trūkžole [1, 18].

Plačialapis gyslotis yra daugiametis žolinis augalas, galintis užaugti 10 - 30 cm aukščio [18, 66]. Lapai ilgakočiai, platūs, pailgai kiaušiniški, gali būti nuo ovalo iki elipsės formos, išsidėstę prie pat žemės, skrotele, lygiakraščiai, apatinė lapo dalis gali būti dantyta [1, 14, 18]. Lapai gali būti 5 - 30 cm ilgio, turi 3 - 9 gyslas, gyslotumas lankiškas [1, 3, 14, 66].

Žiedynkočiai kylantys arba statūs, pliki arba truputį plaukuoti. Žiedstiebiai belapiai, 10 - 40 cm aukščio, bet dydis gali svyruoti, priklausomai nuo augimo vietos. Žiedstiebiai užsibaigia cilindrišku, varpos formos, 2 - 15 cm ilgio žiedynu, kurio apatinė dalis praretėjusi [1, 3]. Žiedai 2 - 4 mm skersmens, gelsvai baltos spalvos [14]. Žydi gegužės - rugsėjo mėnesiais. Pažiedės trikampišškai kiaušiniškos, nugarinė dalis skiauterėta. Taurelapiai kiaušiniški arba elipsiški, plėveliniu kraštu. Kuokelių koteliai 2 - 2,5 karto ilgesni už vainikėlį, balti, o jų dulkinės - violetinės. Dėžutė 2 kartus ilgesnė už taurelę, turi 8 ar daugiau sėklų [1]. Sėklos drėgnu oru tampa lipnios, dėl luobelėse esančių polisacharidų ir jų dėka gali prilipti prie gyvūnų, žmonių ir taip plisti [3].

Plačialapis gyslotis turi siūliškas, kuokštines, balkšvas šaknis, kurios užauga iki 1 metro ilgio, taip pat turi trumpą, storą šakniastiebį [3].

Plačialapis gyslotis kilęs iš Šiaurės Europos ir Centrinės Azijos [18, 66]. Dabar daugiausiai randamas karšto ir vidutinio klimato zonose [18, 19].

1.2. Plačialapių gysločių lapų cheminė sudėtis ir biologiškai aktyvių junginių poveikis

Plačialapių gysločių lapų cheminės sudėties analizės metu nustatyti individualūs fenoliniai junginiai [49]. Pagrindiniai plačialapių gysločių augalinėse žaliavose kaupiami biologiškai aktyvūs junginiai yra iridoidiniai glikozidai (aukubinas, katapolis, gardozidas, majorozidas), fenolinės rūgštys (kavos, chlorogeno, ferulo, p-kumarino rūgštys), kavos rūgšties dariniai (plantamajozidas, akteozidas), flavonoidai ir jų glikozidai (baikaleinas, liuteolinas), polisacharidai, lipidai, terpenoidai (loliolidas, ursolo rūgštis, oleanolo rūgštis) [3, 10, 18]. Plačialapių gysločių lapuose nustatyta alkaloidų (indikainas, plantagoninas), karčiųjų ir rauginių medžiagų ir kai kurių organinių rūgščių [1, 3, 10], retinolio, askorbo rūgšties [37].

Iridoidiniai glikozidai. *Plantago* rūšys sintetina iridoidinius glikozidus, kurie yra genties chemotaksonominis žymuo [59]. Iš plačialapių gysločių lapų išskirti ir identifikuoti iridoidiniai glikozidai: aukubinas, katapolis, gardozidas, genipozido rūgštis, majorozidas, 10-acetoksimajorozidas, 10-hidroksimajorozidas, melitozidas [3]. Iridoidiniai glikozidai padeda augalams apsisaugoti nuo patogenų ir žolėdžių [59]. Atlikus tyrimus su žiurkėmis, nustatytas aukubino priešuždegiminis, spazmolitinis poveikiai, taip pat nustatyta, kad aukubinas apsaugo kepenis nuo nuodingo žalsvosios musmirės poveikio [3].

Jankovi'c ir kt. (2010) sukūrė ir patvirtino patikimą atvirkščių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (RP-ESC) metodą, tirti aukubino kiekiui siauralapių gysločių augalinių žaliavų ekstraktuose, vėliau šis metodas pritaikytas kiekiniam aukubino nustatymui kitų *Plantago* rūšių, tarp jų ir plačialapių gysločių, augalinių žaliavų ekstraktuose. RP-ESC metodas pritaikytas ir flavonoidų bei fenolinių rūgščių atskyrimui ir kiekiniam įvertinimui [59].

Aukubino kiekiai plačialapių gysločių augalinėse žaliavose gali skirtis, priklausomai nuo vegetacijos periodo tarpsnio, kurio metu surinkta augalinė žaliava. Didžiausias aukubino kiekis nustatytas birželio mėnesį rinktuose, džiovintuose plačialapių gysločių lapuose [35].

Tyrimais nustatyta, kad plačialapių gysločių augalinėse žaliavose aukubino ir kitų iridoidinių glikozidų koncentracija žymiai didėja didėjant augalo amžiui. Atlikta regresinė analizė, siekiant ištirti augimo greitį ir iridoidinių glikozidų kiekio didėjimą. Tyrimas atliktas su 2, 4, 6 savaičių amžiaus augalais. Nustatytas reikšmingas teigiamas ryšys tarp iridoidinių glikozidų ir augimo greičio. Iridoidinių glikozidų kiekis augalinėse žaliavose ypač didėja nuo 4 iki 6 savaičių amžiaus [31].

Atlikus mokslinius tyrimus plačialapių gysločių, augančių drėgnesnėje augavietėje, augalinėse žaliavose nustatyta didesnė aukubino koncentracija nei sausesnėje augavietėje augančių gysločių. Žymiai didesnę aukubino kiekį sukaupia plačialapiai gysločiai, auginami šiltnamiuose [3].

Long ir kt. (1995) tyrimų metu, didžiausias aukubino kiekis (1,3 proc.) nustatytas sausuose plačialapių gysločių lapuose [35].

Kavos rūgšties dariniai. Feniletanoidų glikozidai yra pagrindiniai *Plantago* rūšių metabolitai. Feniletanoidų glikozidai yra benzoinės rūgšties dariniai, kurių sudėtyje yra feniletilo žiedas, sujungtas su gliukopiranoze esterine arba glikozidine jungtimi. Feniletanoidų glikozidai padeda augalams apsisaugoti nuo patogenų ir žolėdžių [59]. Etanoliniuose plačialapių gysločių lapų ekstraktuose nustatytas didelis kiekis plantamajozido [44]. Mokslinių tyrimų metu nustatyta, kad plantamajozidas pasižymi priešuždegiminiu, 5-lipoksigenazę, 15-lipoksigenazę, cAMP fosfodiasterazę slopinančiu ir antioksidantiniu aktyvumu [3]. Skari ir kt. (1999) nustatė, kad plantamajozidas suriša DPPH radikalus [62]. Moksliniais tyrimais įrodytas plantamajozido antibakterinis poveikis [55].

Akteozidas pasižymi antioksidantiniu aktyvumu, slopina lipidų peroksidaciją. Nustatyta, kad akteozidas slopina 15-lipoksigenazę, tačiau silpniau nei plantamajozidas. Įrodyta, kad akteozidas slopina baltymų kinazę C, tiesiogiai sąveikaudamas su kataliziniu fermento domenu. Akteozidas slopina aldazės reduktazę ir 5-hidroksieikozatetranoinės rūgšties (5-HETE) formavimąsi [62]. Akteozidas pasižymi antibakteriniu, imunosupresiniu, analgetiniu poveikiais [3].

Remiantis Noro ir kt. (1991) tyrimais, plantamajozidas yra pagrindinis kavos rūgšties darinys plačialapių gysločių lapuose. Plačialapių gysločių lapuose nustatyta ir nedideli kiekiai akteozido (kitais - verbaskozido) [48]. Anot Molgaard (1986), plantamajozido ir akteozido kartu, tame pačiame augale neaptinkama [42]. Zubair ir kt (2012) nustatė, kad verbaskozido dideli kiekiai yra plačialapių gysločių sėklose [44].

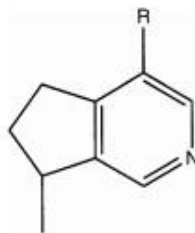
Fenolinės rūgštys. Iš plačialapių gysločių metanolio ekstrakto išskirtos ir identifikuotos fenolinės rūgštys: fumaro, siringo, vanilino, *p*-hidroksibenzoinė, ferulo, *p*-kumaro, gentizo, salicilo, benzoinė, cinamono rūgštys.

Flavonoidai. Plačialapių gysločių ekstraktuose nustatyti flavonoidai: apigenin-7-gliukozidas, liuteolin-7-gliukozidas, liuteolin-7-digliukozidas, hispidulin-7-gliukuronidas, apigeninas, baikaleinas, skutelarinas, homoplantagininas, plantagininas, skutelareinas [32]. Dauguma flavonoidų yra antioksidantai, surišantys laisvuosius radikalus. Baikaleinas turi kepenis apsaugantį poveikį [3].

Lipidai. Didžioji dalis riebalų rūgščių nustatyta augalo sėklose. Šviežiuose plačialapių gysločių lapuose nustatyta palmitino, stearino, miristino, arachidino, behenino rūgščių. Didžiausias kiekis, dažniausiai, nustatomas palmitino rūgšties (apie 16 proc.). Pagrindiniai lapų vaško komponentai - oleanolo ir ursolo rūgštys, linijinės struktūros alkanai ($C_{27}H_{56}$ - $C_{33}H_{58}$).

Bakker ir kt. (1998) atliktų tyrimų metu chloroformo ekstrakto nustatyta apie 63 proc. triterpeninių rūgščių, apie 17 proc. linijinės struktūros angliavandenilių, apie 1 proc. linijinės struktūros alkoholių ir apie 19 proc. nenustatytų junginių, nepriklausomai nuo augalų amžiaus [3].

Alkaloidai. Rojas (1968); Smolenski ir kt. (1974); Schneider (1990) tyrė plačialapių gysločių augalinės žaliavos alkaloidų kokybinę sudėtį ir identifiko indikainą ir plantagoniną, kurių struktūra skiriasi vienu radikalu. Indikainas: $R=CHO$; plantagoninas: $R=COOH$ (1 pav.) [57, 61, 63].



1 pav. Alkaloidų struktūra plačialapiame gyslotyje (Schneider, 1990)

Terpenoidai. Lapuose nustatytas loliolidas. Iš lapų vaško buvo išskirti triterpenoidai - oleanolo rūgštis, ursolo rūgštis, sitosterolis, 18b-gliciretino rūgštis. Ursolo rūgštis ir oleanolo rūgštis turi kepenis apsaugantį poveikį, slopina navikų vystymąsi, turi antihiperlipideminį poveikį [3].

Kartini Piyaviriyakul ir kt. (2014) sukūrė ir patvirtino plonasluoksnės chromatografijos metodiką, kurią pritaikius galima tirti ursolo ir oleanolo rūgščių kiekius, analizuojant ir standartizuojant plačialapių gysločių žaliavų ekstraktų ir preparatų kokybę, naudojant šiuos junginius kaip analitinius žymenis [59].

Vitaminai. Anksti pavasarį surinktuose senų plačialapių gysločių lapuose nustatyta, apie 6 mg/100 g. - β -karotino, 19 mg/100 g. - askorbo rūgšties. Jaunų augalų lapuose nustatyta apie 25 mg/100 g. - askorbo rūgšties, 31 mg/100 g. - dehidroaskorbo rūgšties, 8,5 mg/100 g. - karotenoidų. Birželio mėnesį surinktuose ir išdžiovintuose gysločių ūgliuose nustatyta filochinono (vitamino K) [3].

Polisacharidai. Lapuose nustatyta plantagliucido, kurį sudaro galakturono rūgštis, galaktozė, arabinozė, ramnozė, gliukozė, ksilozė, galaktanas ir galaktoarabinanas. Plačialapių gysločių lapuose nustatyta gliukomanano, PM II (pektinas, sudarytas iš galakturono rūgšties, ramnozės, arabinozės ir galaktozės), PM Ia (arabinogalaktanas, sudarytas iš arabinozės, galaktozės, ramnozės ir galakturono rūgšties). Plačialapių gysločių sėklose nustatyta krakmolo, heteroksilanų [3].

Fitocheminiai tyrimai rodo, kad *Plantago* rūšys sintetina svarbius biologiškai aktyvius junginius, tokius kaip fenilpropanoidiniai glikozidai, iridoidai, triterpenai, flavonoidai, fenolinės rūgštys. Plačialapių gysločių lapų ekstraktai ir izoliuoti junginiai gali būti naudojami kuriant vaistinius preparatus [59].

1.3. Plačialapių gysločių lapų ekstraktų biologinis poveikis

Tradicinėje medicinoje, visame pasaulyje, plačialapių gysločių augalinė žaliava turi įvairių panaudojimo galimybių. Indijoje, Kinijoje, Gvatemaloje, plačialapių gysločių ekstraktai

dažniausiai naudojami kaip diuretikas, Turkijoje, Norvegijoje – skausmams mažinti, abscesams, žaizdoms gydyti [3, 44], Meksikoje, Argentinoje – kaip priešvėžinis preparatas, Čilėje, Venesueloje – auglių gydymui [15].

Plačialapių gysločių lapai šimtmečius naudojami žaizdų gydymui, taip pat seniai žinomi ir kiti poveikiai, odos priežiūrai, žaizdų plovimui, esant infekcijoms, kvėpavimo takų, virškinimo trakto ligų gydymui, siekiant pagerinti kraujotaką, reprodukciją, kaip priešvėžiniai, bendrą navikinių ląstelių augimą slopinantys, skausmą, karščiavimą mažinantys preparatai [3, 15, 59, 66]. Plačialapis gyslotis vartojamas gerklės skausmui, kosuliui, viduriavimui, hemorojui, tiesiosios žarnos įtrūkimams, vabzdžių įkandimams, gyvačių įkandimams, abscesams, sumušimams mažinti [10]. Plačialapių gysločių ekstraktai naudojami esant astmai, šlapimo takų infekcijoms, akmenligėms, menstruaciniams sutrikimams [37]. Plačialapių gysločių lapų sultys naudojamos kaip gaivinantis gėrimas, stimuliuojantis tulžies išsiskyrimą, kaip diuretikas [66]. Plačialapiai gysločiai ir šiais laikais vis dar yra naudojami tradicinėje medicinoje, kaip turintys sutraukiantį, anestetinį, antihelminantinį, antivirusinį, antihistamininį, priešuždegiminį, priešreumatinį, priešnavikinį, priešopinį, diuretinį, hipotenzinį, kosulį lengvinantį, apetitą gerinantį poveikius [1, 13, 21, 40]. Plačialapis gyslotis dar žinomas kaip augalas neutralizuojantis nuodus, tiek vartojant į vidų, tiek išoriškai [30]. Pastaruoju metu, vis didėjant paklausai, plačialapiai gysločiai auginami dideliais mastais, kaip vaistinis augalas, Brazilijoje, Indijoje ir kitose Azijos dalyse [3, 19, 45].

Atliekama vis daugiau mokslinių tyrimų, siekiant pagrįsti tradicinį naudojimą. Kai kurie poveikiai dar tiriami, kiti jau yra įrodyti. Dalis gysločių preparatų poveikių, dėl kurių jie vartojami liaudies medicinoje, yra patvirtinti farmakologinių tyrimų duomenimis, nustatytos biologinių poveikį lemiančios biologiškai aktyvios medžiagos, nors veikimo mechanizmai lieka neaiškūs [59].

Antioksidantinis aktyvumas. Daugelio lėtinių ligų, įskaitant su amžiumi susijusių širdies ir kraujagyslių bei neurologinių sutrikimų sunkumą, įtakoja ROS (reaktyviųjų deguonies formų) ir kitų laisvųjų radikalų gausa organizme [65]. Tokių ligų progresavimas galėtų būti sulėtintas, sumažinus oksidacijos – redukcijos disbalansą ir neutralizavus ROS poveikį. Antioksidantai gali sumažinti oksidacinę ląstelių pažeidimą, nutraukdami, dėl ROS ir laisvųjų radikalų, organizme vykstančias reakcijas. Daugelis augalų yra antioksidantų šaltiniai, kurie galėtų sumažinti su senėjimu susijusių lėtinių ligų progresavimą [59].

Daugybės tyrimų įrodyta, kad *Plantago* rūšių augalinėse žaliavose yra daug fenolinių junginių, o gysločių ekstraktai pasižymi stipriu antioksidantiniu aktyvumu [10]. Pandey ir Rizvi (2009) atlikę tyrimus įrodė, kad fenoliai junginiai yra stiprūs antioksidantai [49]. Nustatyta, kad flavonoidai (baikaleinas, hispidulinas, skutelareinas, plantagininas) šalina laisvuosius radikalus ir stabdo lipidų peroksidaciją [3].

Ištirta daugiau kaip 20 *Plantago* rūšių antioksidantinis aktyvumas *in vitro*. Antioksidantinis aktyvumas buvo įvertinamas naudojant DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo) analizę, taip pat naudojant FRAP metodą, matuojant lipidų peroksidacijos ir deguonies radikalų absorbuojamą galią (ORAC) [59].

Atlikę tyrimus taikydami DPPH metodą, Beara ir kt. (2009), nustatė, kad plačialapių gysločių ekstraktų IC₅₀ reikšmė svyruoja nuo 5,35 iki 7,38 g/ml. Stanisavljevič ir kt. (2008) skelbia, kad IC₅₀ vertė plačialapių gysločių lapų ekstrakto yra 0,85 g/ml [59]. Šie tyrimai rodo, kad *Plantago major* augalinėse žaliavose yra gausu natūralių antioksidantų.

Campos ir Lissi (1995) nustatyta, kad plačialapių gysločių žalių lapų vandeninio užpilo antioksidantinis aktyvumas yra stipresnis nei džiovintų lapų. Tai rodo, kad perdirbimas gali susilpninti biologinį poveikį [7].

Priešuždegiminis aktyvumas. Flavonoidai, esantys plačialapių gysločių augalinėje žaliavoje (baikaleinas, hispidulinas), taip pat iridoidinis glikozidas aukubinas, pasižymi priešuždegiminiu poveikiu [3]. Beara ir kt. (2010) nustatė, kad plačialapių gysločių ekstraktas slopina ciklooksigenazę-1 (IC₅₀=0,65 mg/ml.) ir 12-lipoksigenazę (IC₅₀=1,73 mg/ml) [59]. Tyrimais nustatyta, kad ursolo rūgštis, slopina ciklooksigenazę-2 ir ciklooksigenazę-1, katalizuoja prostaglandinų biosintezę *in vitro*. Struktūrinis ursolo rūgšties izomeras – oleanolio rūgštis yra mažiau aktyvi, o 18b-gliciretino rūgštis neturi stipraus uždegimą slopinančio poveikio [3]. Atliktas tyrimas su žiurkėmis rodo, kad plačialapių gysločių ekstraktas gali sušvelninti kepenų uždegiminę reakciją, sukeltą acetaminofeno [26].

Recio ir kt. (1994) nustatyta, kad aukubinas pasižymi priešuždegiminiu poveikiu. Tirtas vietinis poveikis pelių ausies edemai ir nustatyta, kad maksimalus, edemą mažinantis efektas, pasireiškia esant 1 mg į ausį dozei. Šis poveikis panašus į indometacino poveikį, į ausį injekavus 0,5 mg [56].

Žaizdų gijimą skatinantis poveikis. Vienas iš dažniausių plačialapių gysločių lapų panaudojimų yra žaizdų gijimo skatinimui, tačiau šio poveikio veikimo mechanizmas vis dar nėra visiškai aiškus. Žinduolių odos žaizdų gijimą inicijuoja daug sudėtingų procesų: uždegimo mažinimas, naujų audinių formavimasis bei jų prisitaikymas ir kt. [44]. Vienas iš metodų, naudojamų įvertinti žaizdų gijimo procesą – įbrėžimų tyrimas. Naudojant šį metodą, atliktas tyrimas, kokį poveikį, skirtingi plačialapių gysločių ekstraktai turi žaizdų gijimui. Daugiausiai veikliųjų medžiagų nustatyta etanoliniuose sausų ir šviežių lapų ekstraktuose, mažiau veikliųjų medžiagų nustatyta vandeniniuose šviežių ir sausų lapų ekstraktuose. Tyrimo rezultatai parodė, kad ekstraktai, gauti plačialapių gysločių lapus ekstrahuojant etanolio tirpalais, slopina ląstelių proliferacijai. Plačialapių gysločių lapų etanoliniai ekstraktai pasižymi priešuždegiminiu, antioksidantiniu, antibakteriniu poveikiais [44].

Plačialapių gysločių lapų savybė skatinti žaizdų gijimą įvertinta naudojant *ex vivo* kiaulių žaizdų gijimo modelį. Etanoliniai plačialapių gysločių lapų ekstraktai turėjo stipresnį gydomąjį poveikį nei vandeniniai ekstraktai. stipresniu poveikiu pasižymėjo ekstraktai, kurių koncentracija 1,0 mg/ml, o ne 10 mg/ml [70].

Zubair ir kt. (2012) tyrė vandeninius ir etanolinius šviežių ir džiovintų plačialapių gysločių lapų ekstraktų biologinius poveikius. Nustatyta, kad visi tirti ekstraktai stimuliuoja ląstelių proliferaciją ir migraciją, bet daugiau fenolinių junginių turintys etanoliniai ekstraktai turi stipresnį poveikį [59]. Šviežių plačialapių gysločių lapų ekstraktai turi mažesnę fenolinių junginių kiekį nei džiovintų lapų ekstraktai [44]. Tyrimais nustatyta, kad tiek etanoliniai, tiek vandeniniai šviežių ir džiovintų plačialapių gysločių lapų ekstraktai, pasižymi žaizdų gijimą skatinančiu poveikiu [44, 59].

Amini ir kt. (2010) nustatė, kad plačialapių gysločių ekstraktai turi panašų poveikį nudegimo žaizdų gijimui žiurkėms, kaip ir sidabro sulfadiazino tepalas [59].

Krasnov ir kt. (2011) nustatė, kad plačialapių gysločių lapuose yra specifinių audinių bioreguliatorių, rastų gyvūnų audiniuose, ir jie gali skatinti žaizdų gijimą [36, 59]. Mažamolekuliniai bioregulatoriai gyvūnų organizmuose yra atsakingi už ląstelių migraciją, sukibimą, proliferaciją, skatina atstatomuosius procesus. Iš atliktų tyrimų rezultatų matyti, kad apsauginis poveikis lemia gebėjimą papildomai stimuliuoti ląstelių regeneraciją. Plačialapių gysločių gleivės padengia žaizdos paviršių ir taip jį apsaugo [36].

Thome ir kt. (2012) palygino plačialapių gysločių ekstrakto ir komercinio tepalo, kurio sudėtyje yra kolagenazės ir chloramfenikolio, žaizdų gydomuosius poveikius. Pastebėta, kad plačialapių gysločių ekstraktas padėjo sugyti žaizdoms jau po 15 dienų gydymo, o vartojant tepalą žaizdos negijo ir po 21 gydymo dienos.

Žaizdų gydymas plačialapių gysločių lapų ekstraktu skatina poodinio riebalinio audinio augimą ir liaukų latakų atkūrimą. Net maži plačialapių gysločių ekstrakto kiekiai leidžia susidaryti normaliai odos morfologijai, nesudarant randinio audinio [36].

Manoma, kad fenolinių junginių vaidmuo žaizdų gijimui yra labai svarbus, tačiau turėtų būti plačiau ištirti ir kiti junginiai, pavyzdžiui, polisacharidai [44]. Prie žaizdų gydomojo poveikio gali prisidėti plačialapių gysločių lapuose esantis pektinas, kuris susideda iš homogalakturnono ir ramnogalakturnono [58, 64]. Klinikiniais ir histologiniais tyrimais nustatyta, kad sotieji (C_{26} - C_{30}) pirminiai alkoholiai turi stiprų paviršinių traumų gydomąjį poveikį triušiams [3].

Atsižvelgiant į mokslininkų atliktus tyrimus, galima manyti, kad žaizdų gijimą skatina ne viena plačialapių gysločių lapuose esanti veiklioji medžiaga, poveikis gali pasireikšti dėl kelių sinergistiškai veikiančių biologiškai aktyvių junginių [3]. Plantamajozidas ir akteozidas pasižymi antibakteriniu poveikiu, kai kurie flavonoidai, kavos rūgšties dariniai, plantamajozidas ir akteozidas – antioksidantiniu ir laisvuosius radikalus surišančiu poveikiais, polisacharidai – imunostimuliaciniu

aktyvumu. Ilgų grandinių, prisotinti pirminiai alkoholiai, esantys lapų vaške, greitina paviršinių žaizdų gijimą. Plantamajozidas, baikaleinas, hispidulinas, aukubinas, ursolo ir oleanolo rūgštys pasižymi priešūždegiminiu poveikiu. Taigi plačialapių gysločių veikimo mechanizmas žaizdų gijimui gali būti gana sudėtingas [3, 39].

Antimikrobinis aktyvumas. Kai kurios *Plantago* rūšys pasižymi antimikrobinio poveikiu [59]. Iridoidinio glikozido aukubino aglikonas aukubigeninas, turi antimikrobinį aktyvumą prieš bakterijas ir pelėsius [9].

Atlikti tyrimai rodo, kad plačialapių gysločių lapų ekstraktai pasižymi antimikrobinio aktyvumu tiek prieš gramneigiamas, tiek prieš gramteigiamas bakterijas, bet jų priešgrybelinis aktyvumas yra silpnas. Tyrimai atlikti su 50 proc. (v/v) ir 70 proc. (v/v) etanolio ekstraktais ir su metanolio ekstraktu. Rezultatai rodo, kad metanolio ekstraktas efektyviausiai slopina *Salmonella typhimurium*, silpniau veikė *S. aureus* ir *M. phlei* augimą. Metanolio ekstraktas slopina grybelių *F. tricinctum* ir *M. gypseum* augimą, silpniau veikia *C. albicans*, *S. cerevisiae*. Priešgrybelinis poveikis silpnesnis nei nistatino. Tyrimais nustatyta, kad 50 proc. (v/v) etanolio ekstraktas aktyvus prieš *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. dysenteriae*, *E. coli*. 70 proc. (v/v) etanolio ekstraktas, remiantis tyrimų rezultatais, veiksmingas prieš *S. flexneri*, bet silpniau veikia *S. aureus*, *S. sonnei*, *E. coli*, *M. smegmatis* [3].

Atliktais tyrimais su pelėmis nustatyta, kad vandeninis plačialapių gysločių lapų ekstraktas slopina *B. subtilis* augimą, heksano ekstraktas slopina *E. coli* augimą, metanolio ir chloroformo ekstraktai silpnai slopina *B. subtilis* ir *E. coli* augimą [66].

Plačialapių gysločių antibakterinį aktyvumą gali lemti lapuose besikaupiantys kavos rūgšties dariniai – plantamajozidas, akteozidas [3].

Priešvėžinis veikimas. Tyrimai rodo, kad kai kurių *Plantago* rūšių, tarp jų ir plačialapių gysločių, augalinių žaliavų ekstraktai gali būti naudojami vėžio prevencijai [59]. Flavonoidai - baikaleinas, liuteolin-7-gliukozidas, apigeninas, hispidulinas, esantys plačialapiame gysloteje, gali sukelti karcinomos ląstelių žūtį, slopinti hepatomos ląstelių augimą [3, 66]. Flavonoidai gali slopinti žmogaus vėžinių ląstelių linijų proliferaciją [15]. Atlikti tyrimai su pelėmis, naudojant plačialapių gysločių lapų ekstraktą, paruoštą su 95 proc. (v/v) etanolio, rodė priešvėžinį aktyvumą [66]. Remiantis atliktų tyrimų rezultatais, liuteolin-7-O-gliukozidas aktyviausiai veikė krūties adenokarcinomos ląsteles, o liuteolinas – aktyviausias prieš melanomos ląsteles [15].

Tikslus flavonoidų antinavikinio poveikio mechanizmas dar nėra išaiškintas, tačiau žinoma, kad jie veikia įvairius medžiagų apykaitos kelius, pavyzdžiui, aktyvuoja glikolizinių fermentų ar baltymų sintezę, citotoksinis poveikis gali būti susijęs su DNR padalijimu. Nustatyta, kad kai kurie flavonoidai indukuoja topoizomerazės I ir II medijuotą DNR skilimo kompleksą [15].

Tyrimais nustatyta, kad plačialapis gyslotis gali būti kaip papildomas aktyvatorius, galintis padidinti antikūnų atsaką ir turėti papildomą poveikį navikams ir bakterinėms infekcijoms [64]. Imunitetą stiprinantys junginiai plačialapių gysločių lapuose, gali paaiškinti priešnavikinį poveikį pelėms [34].

Kiti farmakologiniai poveikiai. Tyrimais nustatyta, kad *Plantago* genties augalų augalinių žaliavų ekstraktai gali padėti sumažinti nutukimą ar užkirsti jam kelią. Dalar ir Konczak (2013) nustatė, kad luteolin-7-O-gliukozidas yra pagrindinis komponentas, esantis ir plačialapių gysločių lapuose, lemiantis šį poveikį [59].

Yoshida ir kt. (2013) nustatė, kad *Plantago* genties augalų augalinių žaliavų ekstraktai turi poveikį vidaus organų riebalų sancaupai, gliukozės kiekiui kraujyje. Gysločių lapų ekstraktai stimuliuoja metabolizmą riebaliniame audinyje ir aktyvuoja lipolizę [59]. Atlikus tyrimus su žiurkėmis, nustatyta, kad plačialapių gysločių lapų ekstraktai pasižymi antidiabetiniu poveikiu [37]. Vadovaujantis mokslininkų atliktais tyrimais, antidiabetinį poveikį gali lemti plačialapių gysločių ekstraktuose esantys taninai (heksano ekstrakto), steroliai ir cukrai (dichlormetano ekstrakto). Antioksidantinis ir gliukozės kiekį mažinantis poveikiai gali būti nulemti biologiškai aktyvių junginių struktūroje esančio aromatinio žiedo su hidroksilo grupėmis, fenolinių grupių, organinių rūgščių grupių, flavonoidų ir terpenoidų [37].

Iš plačialapių gysločių lapų išskirti aštuoni junginiai, tirtas jų gebėjimas slopinti angiotenziną I konvertuojantį fermentą. Nustatyta, kad 10-hidroksimajorozido poveikis stipriausias esant 100 M koncentracijai (sumažina fermentų aktyvumą $28,06 \pm 0,21$ proc.) [59].

Ahmed ir kt. (1995) tyrimai rodo, kad akteozidas (kavos rūgšties darinys) turi antihipertenzinį poveikį. 10 mg/kg žiurkėms reikšmingai sumažino sistolinį, diastolinį ir vidutinį arterinį kraujo spaudimą [3].

Nustatyta, kad plačialapių gysločių lapuose esantys flavonoidai skutelareinas ir baikaleinas turi antialerginį poveikį [36]. Skutelareinas ir baikaleinas yra žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV) - atvirkštinės transkriptazės inhibitoriai *in vitro* ($IC_{50}=2,5$ mM ir 5,6 mM atitinkamai). Glikozidai plantagininas, liuteolin-7-gliukozidas, homoplantagininas taip pat stiprūs inhibitoriai ($IC_{50}=9,8; 40,2; 43,3$ mM atitinkamai), o apigeninas 7-gliukozidas slopinančiu poveikiu ŽIV - atvirkštinei transkriptazei nepasižymi [46].

Dažnai plačialapių gysločių augalinių žaliavų ekstraktai naudojami anemijos gydymui. Tyrimais išanalizuotas lapų ir sėklų poveikis kraujodarai ir nustatyta, kad vandeniniai ir metanolio ekstraktai stimuliuoja ląstelių proliferaciją kaulų čiulpuose ir blužnies ląstelių kultūras, visose išbandytose koncentracijose. Vandeniniai ir metanolio ekstraktai gali skatinti ląstelių proliferaciją dėl molekulių, veikiančių kaip mitogenai [66].

Atlikti tyrimai *in vitro*, siekiant įvertinti bakterijų augimą plačialapių gysločių ekstrakto turinčioje terpėje, atsižvelgiant į antioksidantinį poveikį, redukuojantį ir geležį surišantį poveikius. Nustatyta, kad vandeniniai plačialapių gysločių lapų ekstraktai turi stiprų prebiotinį veikimą, priklausomai nuo augalo lapų fitocheminės sudėties. Šio tyrimo rezultatai rodo, kad gysločių ekstraktai pasižymi antioksidantiniu ir geležį surišančiu poveikiu. Visos tirtos gysločių rūšys, taip pat ir plačialapis gyslotis, parodė didelį prebiotinį veikimą, susijusį su *E. coli* [49].

Tyrimais nustatyta, kad plačialapių gysločių lapų ekstraktai aktyvuoja azoto oksido makrofagų navikų nekrozės faktorių (TNF- α) produktų gamybą ir stiprina konkalino A veikimą, skatina limfocitų proliferaciją [43]. Skatinant nespecifinių ląstelių imuninį atsaką, dauguma patogenų gali būti pašalinti, kol dar nėra sukėlę negalavimų. Imuninių parametrų reguliavimas augaliniais ekstraktais gali būti kliniškai reikšmingas daugeliui ligų, įskaitant lėtines virusines infekcijas, tuberkuliozę, AIDS, vėžį [19, 34].

1.4. Fenoliniai junginiai ir jų kiekybinis nustatymas augalinėje žaliavoje

Fenoliniai junginiai - viena gausiausių bei labai plačiai paplitusių junginių grupių augaluose. Žinoma virš 8000 skirtingų fenolinių junginių struktūrų [38]. Fenoliniai junginiai yra antriniai metabolitai, susidarantys augaluose, vykstant biocheminiams procesams [28, 33]. Jų sintezė itin sustiprėja atsiradus veiksniams, kurie sukelia stresą augalui, tai gali būti infekcija, nepalankus klimato poveikis, mechaninis pažeidimas ar kt. [16, 28, 33]. Fenoliniai junginiai svarbūs augalo augimui, dauginimuisi, prisitaikymui prie žalingų ar nepalankių aplinkos sąlygų [17, 33].

Fenolinių junginių gausu vaisiuose, daržovėse, grūduose, ankštiniuose augaluose, arbatoje, kavoje [17, 38, 51]. Vieni pagrindinių fenolinių junginių veikimų - stiprus antioksidantinis aktyvumas, oksidacinio streso sukeltų audinių pažeidimų mažinimas, taip pat antivirusinis, priešūždegiminis, antimikrobinis, hipotenzinis, priešvėžinis poveikiai [38, 60]. Didelis fenolinių junginių kiekis, etanoliniuose ekstraktuose, stimuliuoja ląstelių proliferaciją [44].

Fenolinių junginių kiekinę sudėtį augalinėje žaliavoje svarbu nustatyti, norint įvertinti cheminę žaliavos sudėtį ir kokybę. Tai galima nustatyti įvairiais metodais: taikant ultravioletinio bei regimojo spektro sugerties spektrofotometriją, efektyviąją skysčių chromatografiją, plonasluoksnę chromatografiją, kapiliarinę elektroforezę, ciklinę voltamperometriją, dujų chromatografiją [2].

Spektrofotometriniu metodu gali būti tiriami flavonoidų, fenolinių junginių kiekiai bei antioksidantinis aktyvumas augalinėse žaliavose. Spektrofotometriniai metodai yra santykinai nebrangūs, nereikalaujantys sudėtingos aparatūros, gana paprasti ir greitai atliekami, suteikiantys naudingos informacijos apie fenolinių junginių kiekinę sudėtį, kuri yra svarbi augalinės žaliavos

kokybės įvertinimui [6, 22, 27]. Šis metodas pagrįstas ultravioletinės (UV) arba regimosios šviesos (UV/VIS) spinduliuotės sugerties principu. UV/VIS spektrofotometrijai naudojamos kolorimetrinės reakcijos [22].

Vienas iš fenolinių junginių nustatymui naudojamų spektrofotometrinių metodų yra naudojant Folin - Ciocalteu reagentą, kuriam reaguojant su fenoliniais junginiais, susidaro mėlynas fosfotungstikfosfomolibdeno kompleksas, kurio kiekinė sudėtis nustatoma UV/VIS spektrofotometru [22]. Folin - Ciocalteu reagentą sudaro: natrio volframas (100 ml), natrio molibdato dihidratas (25 ml), fosforo rūgšties tirpalas (85 proc., 50ml), vandenilio chlorido rūgšties tirpalas (36 proc., 100 ml) [64].

Metodo principas - nespecifinė fenolinių junginių oksidacija bazinėje terpėje, stipriais, neorganinės kilmės oksidatoriais (fosfomolibdato rūgštimi ir fosfovolframato rūgštimi). Reakcija vyksta 30 minučių [20, 30, 50] arba 5 minutes mišinys pašildomas 50°C temperatūros vandens vonioje [39]. Šviesos absorbcija matuojama prie 760- 765 nm bangos ilgio [20, 30, 64].

Metodas plačiai taikomas įvertinti kiekinę fenolinių junginių sudėčiai, tačiau nėra labai specifiškas, nes reaguoja ne tik fenoliniai junginiai [20, 30, 50, 64].

Kitas spektrofotometrinės analizės metodas, fenolinių junginių kiekinę sudėčiai nustatyti - naudojant Berlyno mėlį. Metodo principas - fenolinių junginių reagavimas su kalio (II) heksacianoferato ($K_4[Fe(CN)_6]$) bei geležies (III) chlorido ($FeCl_3$) rūgštiniu tirpalu. Šviesos absorbcija matuojama praėjus 7 min, prie 700 nm bangos ilgio [20, 23].

Yra aprašyta galima metodo modifikacija, kai vietoj geležies (III) chlorido reikia naudoti $FeNH_4(SO)_4$ rūgštinį tirpalą, siekiant išvengti geležies (III) chlorido tirpumo problemos. Šviesos absorbcija matuojama 1 min intervalais, prie 720 nm bangos ilgio [24].

Flavonoidų kiekinę analizę naudojamą spektrofotometrinis metodas, naudojant aliuminio (III) chloridą. $AlCl_3$, rūgščioje terpėje, geba sudaryti stabilus kompleksus, besijungdamas su C_4 keto grupe ir su C_3 ar C_5 hidroksi grupėmis, kurios yra flavonų ir flavonolių struktūrose [8]. Dažniausiai šis metodas taikomas bendram flavonoidų kiekio nustatymui [50].

Pirmą kartą šį metodą pasiūlė Christ ir Müller, 1960 m. šiuo metu yra įvairių metodo modifikacijų. Viena iš jų, kai naudojamas 2 - 10 proc. aliuminio (III) chlorido tirpalas ir reakcija vyksta acto rūgšties ar natrio acetato terpėje. Po 2 - 60 min., matuojama šviesos absorbcija, prie 404 - 430 nm šviesos bangos ilgio.

Kita naudojama modifikacija, kai reakcija vyksta bazinėje aplinkoje, pridėjus natrio nitrito ($NaNO_2$). Šios reakcijos metu vyksta aromatinio žiedo, kuriame yra katecholio grupė su trimis arba keturiomis laisvomis pozicijomis, nitrinimas, matuojama šviesos absorbcija prie 510 nm bangos ilgio. Abiem atvejais rezultatai yra išreiškiami katechino ekvivalentais, o pirmuoju atveju gali būti išreiškiami flavonolių (rutino, galangino, kvercetino, kvercitrino) ekvivalentais. Tiriant tos pačios

kilmės mėginius skirtingomis modifikacijomis, rezultatai gaunami taip pat skirtingi. Pirmasis modifikuotas metodas jautrus flavonoliams bei flavonui - liuteolinui, antrasis - liuteolinui, rutinui, fenolinėms rūgštims, katechinams [50].

Dar vienas naudojamas flavonoidų kiekio nustatymui spektrofotometrinės analizės metodas, naudojant 2,4-dinitrofenilhidraziną. Metodo principas- 2,4-dinitrofenilhidrazino sugebėjimas sudaryti 2,4-dinitrofenilhidrazonus, jungiantis su ketonais, aldehidais. Reakcija turi vykti metanolio terpėje, šviesos absorbcija matuojama prie 495 nm bangos ilgio [8]. Metodas naudojamas norint nustatyti flavonolius (kvercetiną, rutiną, moriną) bei flavonus (diosminą, dafloną), dihidroflavonus [41]. Kaip standartas naudojamas pinocembrinas [29].

1.5. Metodai antioksidantiniam aktyvumui nustatyti

Organizme trūkstant antioksidantinių medžiagų, dėl padidėjusio žalingų reaktyvių deguonies ir azoto formų radikalų kiekių, galimas oksidacinis stresas, kuris gali sukelti įvairias būkles ar ligas, tokias kaip aterosklerozė, miokardo infarktas, insultas, diabetas, vėžys, reumatoidinis artritas [53, 65]. Pasižymintys antioksidantiniu aktyvumu vaistiniai augalai, kuriuose kaupiami biologiškai aktyvūs junginiai, gali būti naudojami su laisvųjų radikalų kiekio organizme padidėjimu susijusių ligų gydymui ir profilaktikai. Dėl tokių priežasčių svarbu ištirti vaistinės augalinės žaliavos antioksidantinį aktyvumą ir jo priklausomybę nuo žaliavoje esančio fenolinių junginių kiekio.

Antioksidantiniam aktyvumui nustatyti dažniausiai naudojami ABTS radikalų - katijonų surišimo ir DPPH radikalų surišimo įvertinimai bei trivalentės geležies ir vario jonų redukcinio aktyvumo tyrimai. Tai yra antioksidantinės analizės metodai, pagrįsti elektronų pernaša [64].

Spektrofotometrinis ABTS (3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties) radikalų - katijonų surišimo metodas. Tai metodas, pagrindžiamas antioksidantų gebėjimu surišti ABTS radikalus - katijonus. ABTS druską paveikus stipriai oksiduojančiomis medžiagomis (kalio permanganatu, mangano oksidu), sužadinami $ABTS^{•+}$ [5]. Reakcijos metu, ABTS reagentas atiduoda elektroną, oksiduojasi, tampa stabiliu, mėlynai žaliu $ABTS^{•+}$, kuris absorbuoja 415 nm, 645 nm, 734 nm, 815 nm bangos ilgio šviesą [4, 52, 69]. Po sąveikos su antiradikalinių savybių turinčiu junginiu, radikalai - katijonai redukuojasi į pradinę ABTS būseną. Su spektrofotometru išmatuojama tirpalo absorbcija, kuri proporcinga likusiam $ABTS^{•+}$ kiekiui [5]. ABTS metodas gali būti naudojamas tiek lipofilinėms, tiek hidrofilinėms sistemoms [4, 52].

Kitas spektrofotometrinis antioksidantinio aktyvumo nustatymui naudojamas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo) radikalų surišimo metodas. Tai metodas, pagrindžiamas antioksidantų gebėjimu surišti DPPH radikalus. DPPH - tamsiai violetiniai kristaliniai milteliai, kuriuos sudaro

stabilios radikalinės molekulės, absorbuojančios šviesą prie 515 nm ilgio bangos [47, 52]. DPPH radikalų (kitaip nei metode su ABTS) aktyvinti nereikia [4, 52]. Vykstant reakcijai susidaro ne radikalinė, šviesiai geltona DPPH forma. Reakcija vyksta 1 - 6 valandas. Antiradikalinį aktyvumą galima vertinti spektrofotometriškai, nustatant absorbcijos sumažėjimą ar vertinant elektronų sukimo rezonansą [4, 5, 52].

Spektrofotometrinis FRAP redukcinio aktyvumo metodas. Metodas pagrindžiamas antioksidanto geba trivalentės geležies jonus pakeisti į divalentės geležies jonus. Reakcija vykdoma rūgštinėje aplinkoje, $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ virsta $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ - mėlynos spalvos kompleksiniu junginiu, atliekama spektrofotometrija, prie 593 nm ilgio bangos. Gautus rezultatus palyginant su standarto (askorbo rūgšties, trolokso) ekvivalentu, nustatomas redukcinis aktyvumas [4]. Šis metodas nebrangus, paprastas, tačiau netinka -SH grupę turintiems antioksidantams [5, 52]

Spektrofotometriniai ABTS, DPPH, FRAP antioksidantinio aktyvumo analizės metodai paremti elektronų pernaša, bet yra skirtingi. Naudojant FRAP metodą, nustatoma elektronų redukavimo galia. ABTS ir DPPH metodais galima įvertinti molekulių galią antioksiduoti laisvuosius ABTS, DPPH radikalus. ABTS metodu galima nustatyti lipofilinių ir hidrofilinių junginių antiradikalinį aktyvumą, dėl ABTS radikalo katijono tirpumo vandenyje bei organiniuose tirpikliuose, DPPH radikalas yra tirpus organiniuose tirpikliuose, bet netirpus vandenyje, dėl to netinkamas antioksidantinio aktyvumo nustatymui hidrofilinėse medžiagose [67].

2. TYRIMO METODIKA

2.1. Tyrimo objektas

Tyrimo objektas - plačialapių gysločių (*Plantago major* L.) lapai, rinkti 2015 metais, keturiose skirtingose, natūraliose augavietėse.

Augalinė žaliava rinkta augalo žydėjimo laikotarpiu, liepos - rugpjūčio mėnesiais, Kauno rajone - Mastaičių apylinkėse (490219, 6075279 (LKS)), Kupiškio rajone - Naivių apylinkėse (571929, 6190261 (LKS)), Anykščių rajone - Svėdasų apylinkėse (587682, 6173709 (LKS)), Panevėžio rajone - Tiltagalių apylinkėse (542401, 6184561 (LKS)). Augalinė žaliava džiovinta gerai vėdinamoje patalpoje, apsaugota nuo tiesioginių saulės spindulių. Išdžiuvusi žaliava laikyta popieriniuose maišeliuose, sausoje, vėsioje vietoje.

2.2. Naudoti reagentai

Naudoti tirpikliai, reagentai bei standartai- analitinio švarumo. Etanolis 96 proc., v/v (AB „Stumbras“ Lietuva), ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis)), galo rūgšties monohidratas, Folin - Ciocalteu reagentas, aliuminio chlorido heksahidratas ($\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), natrio nitritas, natrio molibdatas, heksametiltetraminas („Sigma- Aldrich“, Vokietija), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalas), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas), rutino trihidratas, natrio karbonatas, acto rūgštis, Trolox® (± 6 -hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilinė rūgštis) („Carl Roth“, Vokietija), geležies trichloridas heksahidratas („Vaseline - Fabric Rhenania“, Vokietija).

2.3. Naudota aparatūra

Naudotos analitinės svarstyklės „Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.“ CPA225D (Vokietija), žaliava smulkinta elektriniu smulkintuvu „IKA® A11 basic“ (Vokietija), naudota centrifuga - ThermoFisher scientific „Biofuge stratos“ (Vokietija), naudota ultragarso vonelė „Elmasonic P 120 H“ (Vokietija), naudotas spektrofotometras „Spectronic Camspec M550“ (Jungtinė Karalystė).

2.4. Tyrimo metodai

2.4.1. Plačialapių gysločių lapų ekstraktų paruošimas

Plačialapių gysločių lapai susmulkinti elektriniu smulkintuvu, iki pro 355 µm sietą praeinančių dalelių. Nuodžiūvis nustatytas pagal Europos farmakopėjoje nurodytą metodą [12]. Rezultatai, gauti kiekinės analizės metu, perskaičiuoti, absoliučiai sausai plačialapių gysločių žaliavai - lapams. Pasveriami 0,1 g (tikslus svėrinys) susmulkintos žaliavos. Suberiama į buteliukus (tamsaus stiklo). Užpilama 10 ml 50 proc. (v/v) etanolio. Uždarytas buteliukas dedamas į ultragarso vonelę, kurioje, esant kambario temperatūros vandeniui, vykdoma ekstrakcija maceracijos metodu, 37000 Hz ultragarso poveikyje, 20 minučių. Ekstrakcijai pasibaigus, ekstraktas centrifuguojamas dvi minutes, 19°C temperatūroje, esant 3000 apsisukimų per minutę. Supernatantas perkeliamas į 10 ml matavimo kolbą ir skiedžiamas ekstrahentu iki 10 ml. Gautas ekstraktas naudojamas fenolinių junginių kiekinės sudėties tyrimams ir antioksidantinio aktyvumo nustatymui.

2.4.2. Fenolinių junginių bendro kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu

Bendras fenolinių junginių kiekis plačialapių gysločių lapų ekstraktuose nustatytas naudojant Folin - Ciocalteu reagentą.

Paruošiamas Folin-Ciocalteu darbinis reagentas, 5 ml motininio tirpalo sumaišant su 45 ml distiliuoto vandens.

Paruošiamas tiriamasis mėginys. Atmatuojama 0,5 ml tiriamojo ekstrakto, pridedama 2,5 ml paruošto Folin - Ciocalteu reagento, suplakama, įpilama 2 ml 7,5 proc. natrio karbonato, suplakama. Gautas mėginys 1 valandą laikomas kambario temperatūroje, tamsoje.

Paruošiamas palyginamasis tirpalas. Į 0,5 ml atitinkamos koncentracijos etanolio, pilama 2,5 ml darbinio Folin - Ciocalteu reagento, suplakama, įpilama 2 ml natrio karbonato, suplakama.

Atliekama analizė matuojant tiriamojo mėginio šviesos absorbciją prie 765 nm bangos ilgio ir lyginama su palyginamojo tirpalo šviesos absorbcija. Fenolinių junginių bendras kiekis plačialapio gysločio lapuose apskaičiuojamas pagal kalibracinę regresijos lygtį ($y = 2,967x + 0,0135$; $R^2 = 0,9998$; $p < 0,001$), išreiškiant galo rūgšties ekvivalentais (mg/g). Fenolinių junginių kiekis (mg/g) apskaičiuojamas pritaikant formulę:

$$X = \frac{c \times V}{m}$$

c- bendras kiekis fenolinių junginių (mg/g)

V- naudoto tiriamojo ekstrakto tūris (ml)

m- tikslus atsvertas sausos žaliavos kiekis (g)

2.4.3. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu

Flavonoidų bendras kiekis plačialapių gysločių lapų ekstraktuose nustatytas su aliuminio chlorido reagentu, spektrofotometrinio metodu.

Atmatuojama 0,2 ml tiriamojo ekstrakto, įpilama 2 ml etanolio 96 proc. (v/v), sumaišoma. Pridedama 0,1 ml acto rūgšties 30 proc. tirpalo. Įpilama 2 ml distiliuoto vandens, sumaišoma. Pridedama 0,3 ml aliuminio chlorido 10 proc. tirpalo, sumaišoma. Gautas mišinys paliekamas kambario temperatūroje, tamsoje, po 30 min sumaišomas su 0,4 ml heksametilentetramino 5 proc. tirpalu.

Paruošiamas palyginamasis mėginys. 2 ml ekstrakto sumaišoma su 2 ml etanolio 96 proc. (v/v), įpilama 0,1 ml acto rūgšties 30 proc. tirpalo, pridedama 2,7 ml distiliuoto vandens.

Šviesos absorbcija, prie 407 nm bangos ilgio, matuojama sumaišius mėginį su heksametilentetramino 5 proc. tirpalu.

Flavonoidų bendras kiekis plačialapių gysločių lapuose išreiškiamas pagal kalibracinę regresijos lygtį ($y = 1,0054x + 0,0024$; $R^2 = 0,9984$; $p < 0,001$), išreiškiant rutino ekvivalentais (mg/g).

Flavonoidų kiekis (mg/g) žaliavoje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{c \times V}{m}$$

c- flavonoidų bendras kiekis (mg/g)

V- naudoto tiriamojo ekstrakto tūris (ml)

m- tikslus atsvertas sausos žaliavos kiekis (g)

2.4.4. Bendro o-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu

O-dihidroksicinamono rūgšties darinių nustatymui naudotas Europos farmakopėjos straipsnis siauralapiam gysločiui. Metodas buvo pritaikytas plačialapių gysločių lapų ekstraktų analizei [11].

Gaminamas pradinis tirpalas. Į kolbą atsveriamas 1 gramas sausos žaliavos, pridedama 90 ml etanolio 50 proc. (v/v), kaitinama vandens vonelėje su grįžtamuoju kondensatoriumi 30 minučių. Tirpalui atvėsus, perfiltruojama į 100 ml matavimo kolbą, praskiedžiama 50 proc. (v/v) etanolio iki 100 ml.

Gaminamas tiriamasis tirpalas. Į 10 ml matavimo kolbą įpilama 1 ml pradinio tirpalo, pridedama 2 ml 0,5 M druskos rūgšties, sumaišoma. Pridedama 2 ml Arnou reagento, paruošto iš 10 gramų praskiesto natrio nitrito, 10 gramų natrio molibdato ir 100 ml distiliuoto vandens, sumaišoma.

Išmatuojama gauto tirpalo šviesos absorbcija prie 525 nm bangos ilgio. O-dihidroksicinamono rūgšties dariniai išreiškiami akteozido ekvivalentais. O-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekis (mg/g) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{c \times 10000}{185 \times m}$$

c- tiriamojo tirpalo šviesos absorbcija

m- tikslus atsvertas sausos žaliavos kiekis (g)

2.4.5. Antioksidantinio aktyvumo tyrimas FRAP metodu

Spektrofotometrinis FRAP metodas naudojamas nustatyti plačialapių gysločių lapų ekstraktų antioksidantinį aktyvumą. FRAP reagentas ruošiamas santykiu 10: 1: 1, iš 300 mM natrio acetato (CH₃COONa) buferinio tirpalo, 10 mM TPTZ tirpalo 40 mM druskos rūgštyje ir 20 mM geležies (III) chlorido heksahidrato tirpalo.

Atmatuojama 10 µl tiriamojo ekstrakto, pridedama 3 ml FRAP reagento, sumaišoma. Paruošiamas palyginamasis mėginys. Atmatuojama 3 ml FRAP reagento, pridedama 10 µl distiliuoto vandens, sumaišoma. Paruošti mėginiai 1 valandą laikomi kambario temperatūroje, tamsoje. Šviesos absorbcija matuojama prie 593 nm bangos ilgio.

Antioksidantinis aktyvumas plačialapių gysločių lapuose nustatomas pagal trolokso kalibracinę regresijos lygtį ($y = 10,4587x + 0,0860$; $R^2 = 0,9966$), išreiškiant µmol TE/g.

Antioksidantinis aktyvumas plačialapių gysločių lapuose apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{c \times V}{m}$$

c- antioksidantinis aktyvumas (µmol TE/g)

V- naudoto tiriamojo ekstrakto tūris (ml)

m- tikslus atsvertas sausos žaliavos kiekis (g)

2.4.6. Antioksidantinio aktyvumo tyrimas ABTS metodu

Spektrofotometrinis ABTS metodas naudojamas nustatyti plačialapių gysločių lapų ekstraktų antioksidantinį aktyvumą.

Motininio ABTS gamyba. 2mM ABTS ištirpinama 50 ml distiliuoto vandens. Pridedama 0,7 mM kalio persulfato. Tirpalą laikyti 16 - 17 valandų, kambario temperatūroje, tamsoje, kol ABTS suoksiduojamas kalio persulfato. Motininis ABTS tirpalas, laikant kambario temperatūroje, apsaugojus nuo šviesos, gali išlikti stabilus ilgiau nei dvi paras.

Darbinis ABTS tirpalas ruošiamas motininį tirpalą skiedžiant distiliuotu vandeniu, kol šviesos absorbcija, matuojant prie 734 nm bangos ilgio, tampa $0,8 \pm 0,005$ absorbcijos vienetų.

Tiriamasis tirpalas gaminamas atmatuojant 10 μ l tiriamojo ekstrakto, pridedant 3 ml darbinio ABTS tirpalo. Palyginamasis tirpalas - distiliuotas vanduo. Pagaminti tirpalai 1 valandą laikomi kambario temperatūroje, tamsoje. Šviesos absorbcija matuojama prie 734 nm bangos ilgio.

Antioksidantinis plačialapių gysločių lapų aktyvumas nustatomas pagal trolokso kalibracinę regresijos lygtį ($y = 1,2534x + 3,116$; $R^2 = 0,9972$), išreiškiamas μ mol TE/g.

Antioksidantinis aktyvumas plačialapių gysločių lapuose apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{c \times V}{m}$$

c- antioksidantinis aktyvumas (μ mol TE/g)

V- naudoto tiriamojo ekstrakto tūris (ml)

m- tikslus atsvertas sausos žaliavos kiekis (g)

2.4.7. Antioksidantinio aktyvumo tyrimas DPPH metodu

Darbinis DPPH tirpalas gaminamas 60 μ M DPPH tirpalo skiedžiant 96,3 proc. (v/v) etanolium, kol matuojant šviesos absorbciją prie 515 nm bangos ilgio, nustatomi $0,8 \pm 0,005$ absorbcijos vienetai. Tiriamajam tirpalui pagaminti atmatuojama 10 μ l tiriamojo ekstrakto, sumaišoma su 3 ml darbinio DPPH tirpalo. Kaip palyginamasis mėginys naudojamas etanolis 96,3 proc. (v/v). Tiriamojo tirpalo šviesos absorbcijos sumažėjimas matuojamas po 30 minučių, prie 515 nm bangos ilgio.

Antioksidantinis aktyvumas nustatomas pagal trolokso kalibracinę lygtį ($y = 0,9069x + 2,937$, $R^2 = 0,999$) ir išreiškiamas μ mol TE/ml.

Sausos tiriamosios žaliavos antioksidantinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę (μ mol TE/g):

$$X = \frac{c \times V}{m}$$

c- antioksidantinis aktyvumas ($\mu\text{mol TE/g}$);

V- ekstrahento, naudoto ekstrakto gamybai, tūris (ml)

m- tikslus atsvertas sausos žaliavos kiekis (g)

2.5. Duomenų analizės metodai

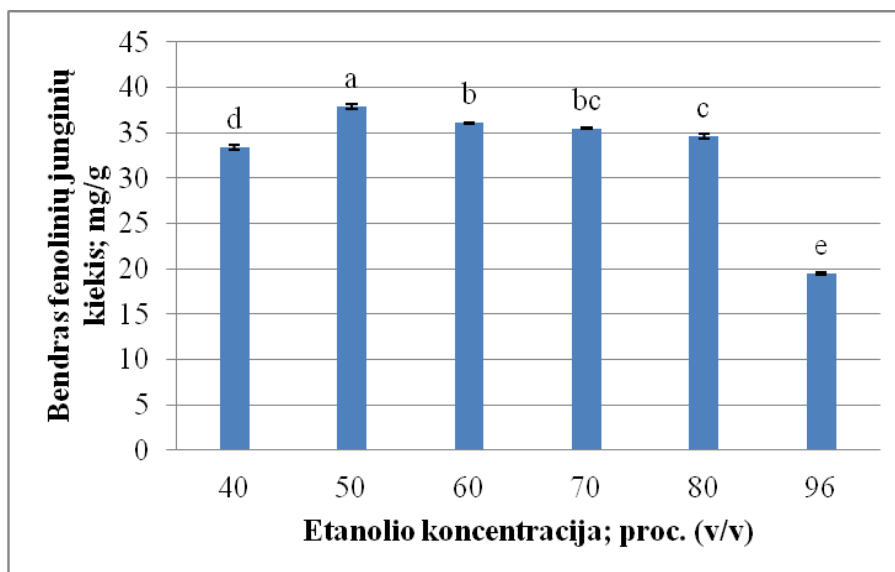
Gauti duomenys analizuoti ir vertinti naudojant „MS Excel 2007“ kompiuterinę programą. Duomenys vertinti apskaičiuojant matematinius vidurkius, standartines paklaidas. Plačialapių gysločių lapų fenolinių junginių kiekinės analizės duomenų vidurkiai palyginti naudojant SPSS Statistics 20.0 (IBM, JAV) kompiuterinę programą, taikant ANOVA analizę su aposterioriniu TurkeyHSD daugkartinio palyginimo kriterijumi. Plačialapių gysločių lapų ėminiai tarpusavyje palyginti pagal fenolinių junginių sudėtį klasterinės analizės metodu, naudojant kvadratinis Euklido atstumus. Koreliacija tarp ekstraktų antioksidantinio aktyvumo ir fenolinių junginių kiekio įvertinta taikant Spirmeno koeficientą.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Plačialapių gysločių lapų fenolinių junginių ekstrakcijos sąlygų parinkimas

Tiriant vaistines augalines žaliavas, svarbu nustatyti, kokiomis ekstrakcijos sąlygomis galima pasiekti maksimalius rezultatus, kokiomis sąlygomis geriausiai išekstrahuojami biologiškai aktyvūs junginiai. Norint nustatyti kokios yra optimalios ekstrakcijos sąlygos plačialapių gysločių lapams, buvo atliktas optimalios etanolio koncentracijos nustatymas bei žaliavos ekstrahavimo trukmės nustatymas. Remiantis mokslininkų tyrimais, daugiausiai fenolinių junginių randama plačialapių gysločių lapų etanoliniuose ekstraktuose [44, 66, 70]. Etanolio ekstraktuose randami žymiai didesni junginių kiekiai, lyginant su vandeniniais ekstraktais (dažniausiai 10 ar daugiau kartų) [44]. Svarbu nustatyti tinkamiausią etanolio koncentraciją plačialapių gysločių lapų ekstrahavimui, kad būtų išekstrahuojami didžiausi kiekiai fenolinių junginių.

Atliktas fenolinių junginių kiekinės sudėties plačialapių gysločių ekstraktuose nustatymas spektrofotometrinio analizės metodu, naudojant Folin - Ciocalteu reagentą. Nustatyta, kad daugiausiai ($p < 0,05$) fenolinių junginių iš plačialapių gysločių lapų išekstrahuota naudojant 50 proc. (v/v) etanolio tirpalą ($37,84 \pm 0,27$ mg/g). Su 40, 60, 70, 80 proc. (v/v) etanolio tirpalais bendras fenolinių junginių kiekis įvairuoja 33,39 - 36,06 mg/g ribose. Mažiausiai ($p < 0,05$) fenolinių junginių iš plačialapių gysločių lapų išekstrahuota naudojant 96 proc. (v/v) etanolį ($19,45 \pm 0,14$ mg/g) (2 pav.). Yra mokslininkų atliktų tyrimų, kuriuose kaip ekstrahentai naudoti 50 proc. (v/v) etanolio tirpalas ir distiliuotas vanduo. Su etanolio tirpalu išekstrahuojama žymiai didesni kiekiai junginių, pavyzdžiui plantamajozido [45].

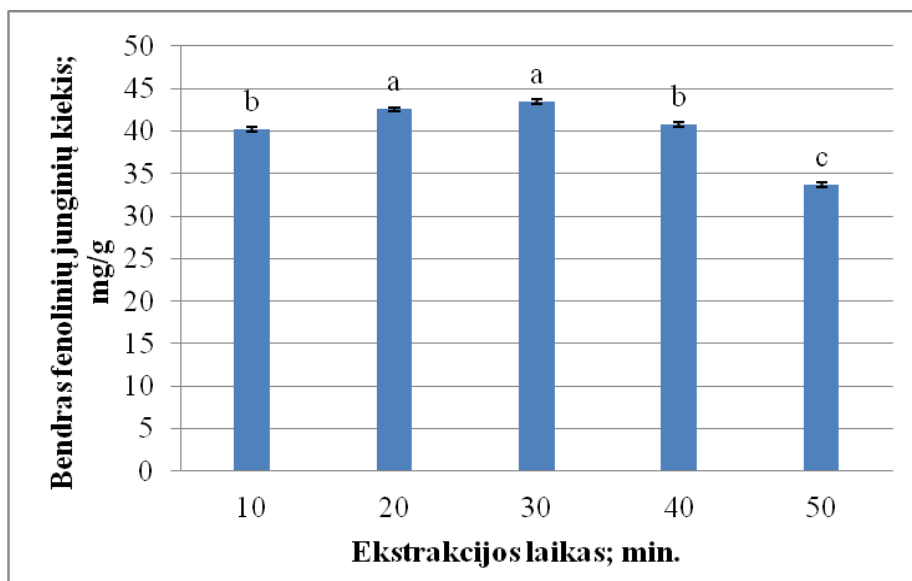


2 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis (mg/g) plačialapių gysločių lapų ėminiuose, ekstrahuojant skirtingos koncentracijos etanolium

*Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių

Atlikus šį bandymą nustatyta, kad plačialapių gysločių lapų ekstrahavimui tinkamiausias 50 proc. (v/v) etanolis. Atsižvelgiant į gautus tyrimų rezultatus, tolimesniems tyrimams plačialapių gysločių lapų ekstrakcijai pasirinktas 50 proc. (v/v) etanolis.

Ekstrakcijos efektyvumo palyginamiesiems tyrimams plačialapių gysločių lapų ėminių ekstrakcija vykdyta skirtingais laiko intervalais (nuo 10 min. iki 50 min.). Atlikus tyrimus nustatyta, kad bendras fenolinių junginių kiekis įvairuoja nuo 33,69 mg/g iki 43,48 mg/g (3 pav). Ilginant ekstrakcijos laiką iki 20 min. bendras fenolinių junginių kiekis didėja. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp fenolinių junginių kiekio ekstraktuose, gautuose ekstrakciją vykdant 20 min. ir 30 min., nenustatyta ($p < 0,05$). Ekstrahuojant ilgiau nei 30 min. bendras fenolinių junginių kiekis ekstraktuose mažėja.



3 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis (mg/g) plačialapių gysločių lapų ėminiuose, priklausomai nuo ekstrakcijos laiko

**Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių*

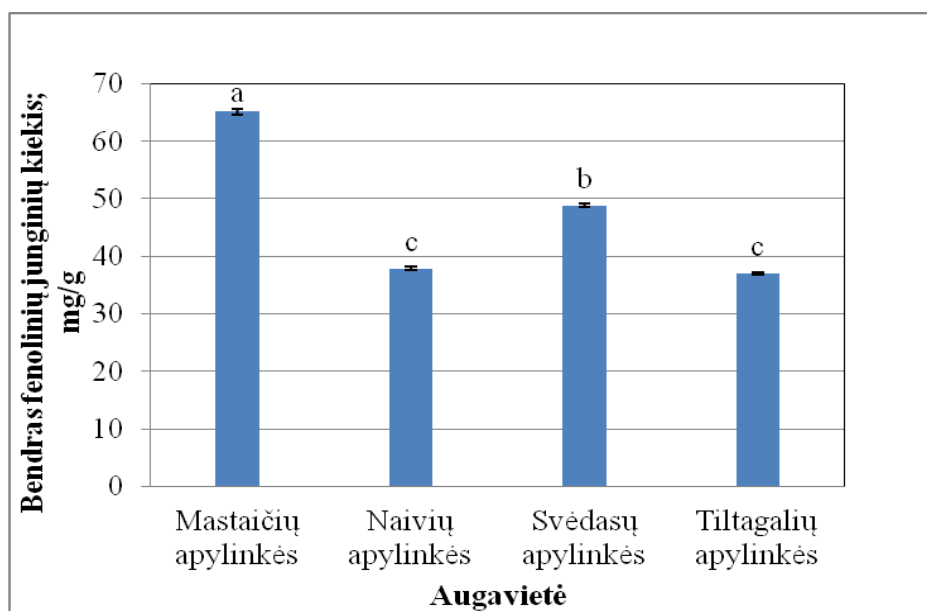
Nustatyta, kad didžiausi fenolinių junginių kiekiai yra ekstraktuose, kurie gauti plačialapių gysločių lapus ekstrahuojant 50 proc. (v/v) etanolio 20 ir 30 min (atitinkamai, $42,59 \pm 0,22$ mg/g ir $43,48 \pm 0,31$ mg/g). Tolimesniems tyrimams pasirinktas trumpesnis ekstrakcijos laikas ir ekstrakcija vykdyta 20 min.

3.2. Plačialapių gysločių lapų fenolinių junginių kiekinės sudėties tyrimai

Augalinės kilmės maisto produktai, daržovės, vaisiai, kaupia daug fenolinių junginių, kurie pasižymi antioksidantiniu, priešuždegiminiu, priešvirusiniu, antibakteriniu, priešvėžiniu poveikiais [25]. Mokslininkų tyrimų duomenimis, fenoliniai junginiai pasižymi stipresniu

antioksidantiniu poveikiu, lyginant su kitais junginiais (karotenoidais, askorbo rūgštimi, Troloksu) [54]. Tyrimais įrodyta, kad žmogaus mityboje esant dideliems fenolinių junginių kiekiams, mažėja lėtinių ligų atsiradimo rizika [25]. Vertinant plačialapių gysločių lapų kokybę, norint naudoti plačialapių gysločių lapus kaip fenolinių junginių šaltinį, labai svarbu nustatyti kiekinę fenolinių junginių sudėtį.

Plačialapių gysločių lapų bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas. Atlikti keturiose skirtingose augavietėse (Mastaičių apylinkėse, Naivių apylinkėse, Svėdasų apylinkėse, Tiltagalių apylinkėse) surinktų plačialapių gysločių lapų ėminių fenolinių junginių kiekinės sudėties tyrimai. Plačialapių gysločių lapų fenolinių junginių bendro kiekio nustatymui pasirinktas spektrofotometrinis tyrimo metodas, naudojant Folin - Ciocalteu reagentą. Gauti kiekinio tyrimo rezultatai pateikiami 4 pav.

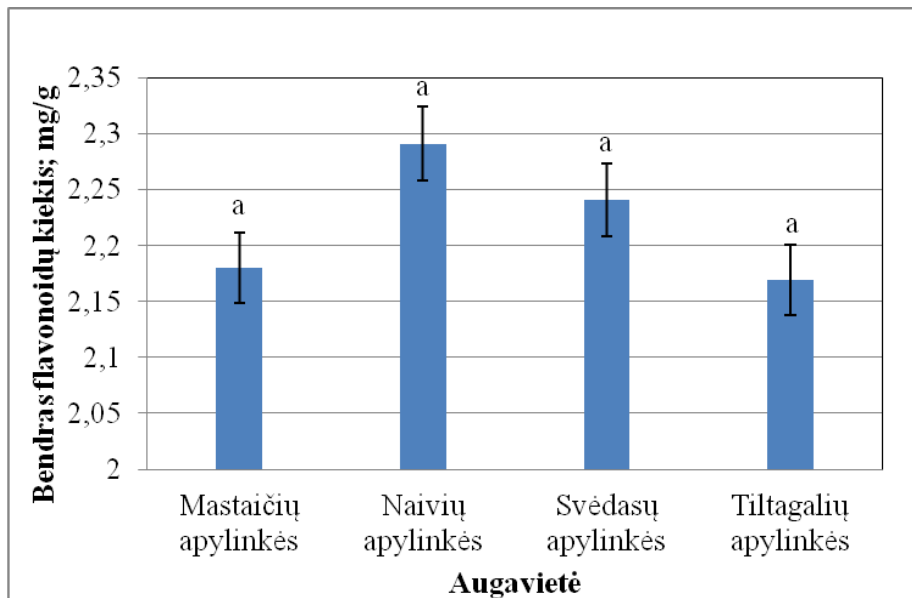


4 pav. Bendro fenolinių junginių kiekio (mg/g) įvairavimas plačialapių gysločių lapų ėminiuose, surinktuose skirtingose augavietėse

**Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių*

Fenolinių junginių kiekis plačialapių gysločių lapuose įvairuoja nuo 36,95 mg/g iki 65,14 mg/g. Daugiausiai fenolinių junginių ($p < 0,05$) nustatyta Kauno rajone, Mastaičių apylinkėse rinktų plačialapių gysločių lapuose ($65,14 \pm 0,47$ mg/g). Mažiau fenolinių junginių nustatyta Anykščių rajone, Svėdasų apylinkėse rinktų plačialapių gysločių lapuose ($48,82 \pm 0,35$ mg/g). Mažiausi fenolinių junginių kiekiai ($p < 0,05$) nustatyti Kupiškio rajone, Naivių apylinkėse rinktų plačialapių gysločių lapuose ($37,84 \pm 0,27$ mg/g) ir Panevėžio rajone, Tiltagalių apylinkėse rinktų plačialapių gysločių lapų ėminiuose ($36,95 \pm 0,27$ mg/g) (4 pav.). Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp bendro fenolinių junginių kiekio plačialapių gysločių lapų ėminiuose, surinktuose Naivių ir Tiltagalių apylinkėse, nenustatyta.

Plačialapių gysločių lapų bendro flavonoidų kiekio nustatymas. Bendras flavonoidų kiekis plačialapių gysločių lapuose nustatytas spektrofotometrinio metodu, naudojant aliuminio chloridą. Gauti kiekinio tyrimo rezultatai pateikiami 5 pav.

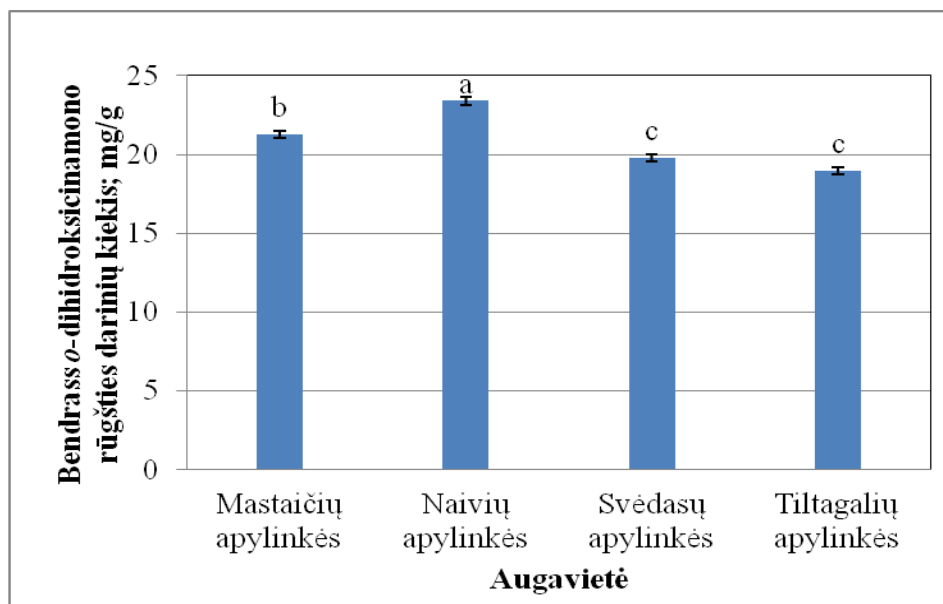


5 pav. Bendro flavonoidų kiekio (mg/g) įvairavimas plačialapių gysločių lapų ėminiuose, surinktuose skirtingose augavietėse

**Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių*

Flavonoidų kiekis tirtose augalinėse žaliavose įvairuoja nuo 2,17 mg/g iki 2,29 mg/g. (5 pav.). Atlikus gautų rezultatų vidurkių palyginimą taikant ANOVA, statistiškai reikšmingo skirtumo tarp bendro flavonoidų kiekio plačialapių gysločių lapuose, surinktuose skirtingose augavietėse nenustatyta.

Plačialapių gysločių lapų bendro o-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekio nustatymas, naudojant Arnou reagentą. O-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekis plačialapių gysločių lapų ėminiuose nustatytas pagal Europos farmakopėjos straipsnį siauralapiam gysločiui, kuris buvo pritaikytas tirti plačialapių gysločių lapų ekstraktams [11]. Gauti kiekinio tyrimo rezultatai pateikiami 6 pav.



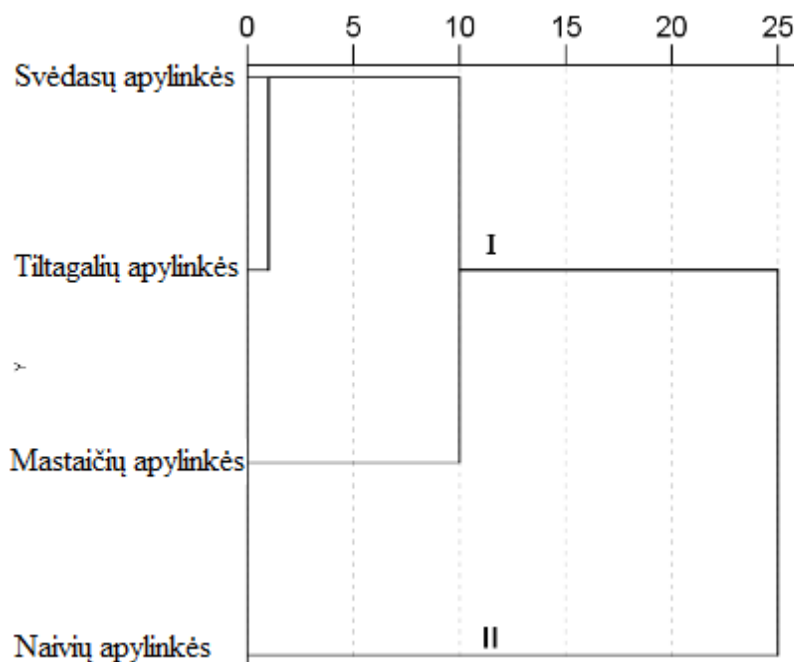
6 pav. Bendro o-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekio (mg/g) įvairavimas plačialapių gysločių lapų ėminiuose, surinktuose skirtingose augavietėse

**Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių*

Spektrofotometrinio metodu plačialapių gysločių lapų ekstraktuose tirtas o-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekis, kuris išreikštas akteozido ekvivalentais. Plačialapių gysločių lapų ekstraktuose o-dihidroksicinamono rūgšties darinių įvairuoja nuo 18,94 mg/g iki 23,40 mg/g. Didžiausias bendras o-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekis ($p < 0,05$) nustatytas plačialapių gysločių lapuose, rinktuose Naivių apylinkėse ($23,40 \pm 0,27$ mg/g). Mažiau o-dihidroksicinamono rūgšties darinių rasta plačialapių gysločių lapuose, rinktuose Mastaičių apylinkėse ($21,28 \pm 0,25$ mg/g). Mažiausiai o-dihidroksicinamono rūgšties darinių ($p < 0,05$) nustatyta plačialapių gysločių lapų ėminiuose, surinktuose Svėdasų apylinkėse ($19,79 \pm 0,23$ mg/g) ir Tiltagalių apylinkėse ($18,94 \pm 0,22$ mg/g) (6 pav.).

Mokslininkų atliktų tyrimų duomenimis, plantamajozido plačialapių gysločių lapuose randama nuo 14,18 mg/g iki 23,63 mg/g (sausos medžiagos) [45]. Panašus o-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekis randamas mūsų tirtuose plačialapių gysločių lapų ėminiuose.

Atlikus fenolinių junginių sudėties plačialapių gysločių lapų ėminiuose tyrimus nustatyta, kad skirtingose augavietėse rinktų lapų ėminių fenolinių junginių kiekinė sudėtis skiriasi. Siekiant įvertinti skirtingose augavietėse rinktų plačialapių gysločių lapų fenolinių junginių sudėties panašumus, atlikta hierarchinė klasterinė analizė. Atlikus hierarchinę klasterinę analizę, plačialapių gysločių lapų ėminiai pasiskirstė į 2 klasterius (7 pav.)



7 pav. Plačialapių gysločių lapų ėminių, surinktų skirtingose augavietėse, panašumo pagal fenolinių junginių sudėtį dendrograma

I klasteriui priskirti plačialapių gysločių lapų ėminiai, surinkti Svėdasų apylinkėse, Tiltagalių ir Mastaičių apylinkėse. II klasteriui priskirti gysločių lapų ėminiai, surinkti Naivių apylinkėse. Antram klasteriui priskirtuose plačialapių gysločių lapų ėminiuose yra statistiškai reikšmingai didesni ($p < 0,05$) *o*-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekiai. Pirmojo klasterio plačialapių gysločių lapų ėminiuose yra didesni fenolinių junginių kiekiai.

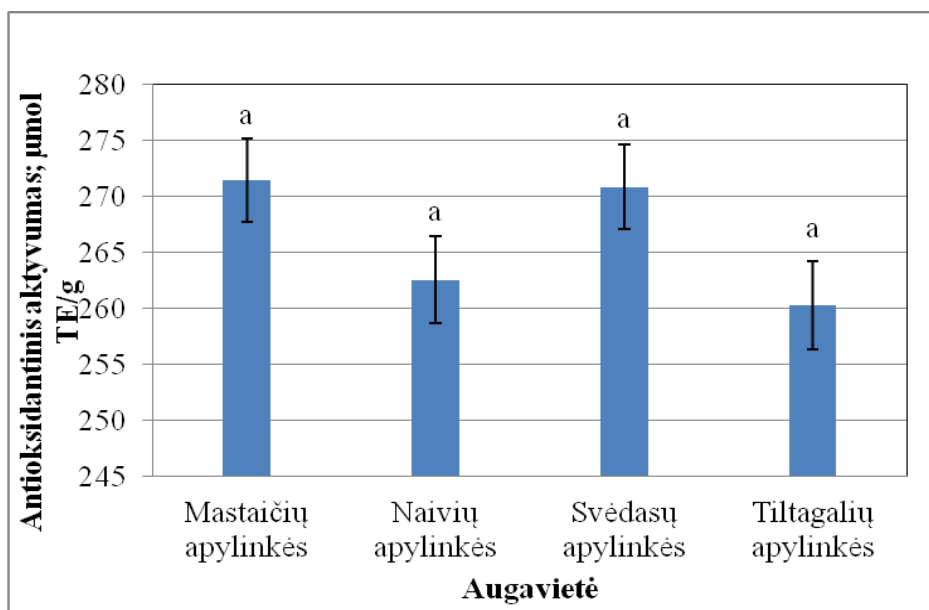
Kiekinės sudėties tyrimų metu nustatyta, kad plačialapių gysločių lapų ėminiuose, rinktuose skirtinguose Lietuvos rajonuose, yra gana gausiai kaupiami fenoliniai junginiai, flavonoidai, *o*-dihidroksicinamono rūgšties dariniai. Remiantis gautais rezultatais galima sakyti, kad norint surinkti daugiau fenolinių junginių turinčius plačialapių gysločių lapus, turėtų būti pasirinkta natūrali augavietė Kauno rajone, Mastaičių apylinkėse. Norint didesnio flavonoidų, *o*-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekio, tikslinga plačialapių gysločių lapus rinkti natūralioje augavietėje, Kupiškio rajone, Naivių apylinkėse.

3.3. Plačialapių gysločių lapų ekstraktų antioksidantinio aktyvumo įvertinimas spektrofotometrinio metodu

Fenoliniai junginiai yra antioksidantai, padedantys šalinti laisvuosius radikalus iš organizmo [3]. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad etanoliniai plačialapių gysločių lapų ekstraktai

pasižymi antioksidantiniu poveikiu [44]. Svarbu ištirti plačialapių gysločių lapų antioksidantinį aktyvumą, norint išsiaiškinti ar Lietuvoje augančių plačialapių gysločių lapų ekstraktus galima pritaikyti lėtinių ligų, sukiamų padidėjusio laisvųjų radikalų kiekio organizme, gydymui ir profilaktikai.

Plačialapių gysločių lapų ekstraktų antiradikalinio aktyvumo nustatymas, naudojant ABTS metodą. Taikant spektrofotometrinių ABTS metodą, nustatyta, kad plačialapių gysločių lapų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas įvairuoja nuo 260,34 $\mu\text{mol TE/g}$ iki 271,49 $\mu\text{mol TE/g}$ (8 pav.).

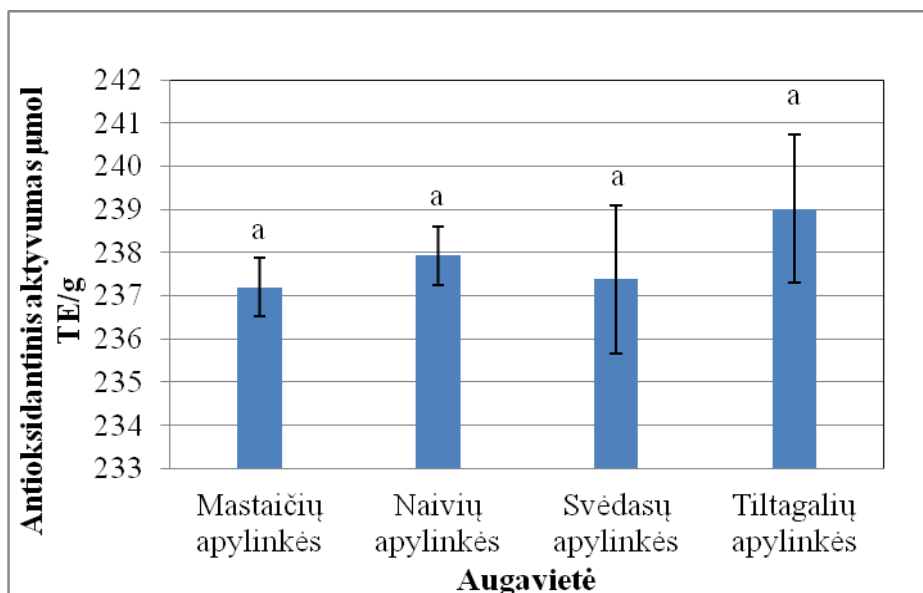


8 pav. Spektrofotometrinis ABTS metodu nustatytas plačialapių gysločių lapų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas

**Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių*

Atlikus gautų rezultatų vidurkių palyginimą taikant ANOVA, statistiškai reikšmingo skirtumo tarp plačialapių gysločių lapų ėminių, surinktuose skirtingose augavietėse, ekstraktų antioksidantinio aktyvumo nenustatyta.

Plačialapių gysločių lapų ekstraktų antiradikalinio aktyvumo nustatymas, naudojant DPPH metodą. Antiradikalinis aktyvumas tirtuose skirtingų Lietuvos rajonuose rinktų plačialapių gysločių lapų ekstraktuose, nustatytas naudojant spektrofotometrinių DPPH metodą, įvairuoja nuo 237,20 $\mu\text{mol TE/g}$ iki 239,01 $\mu\text{mol TE/g}$ (9 pav.).

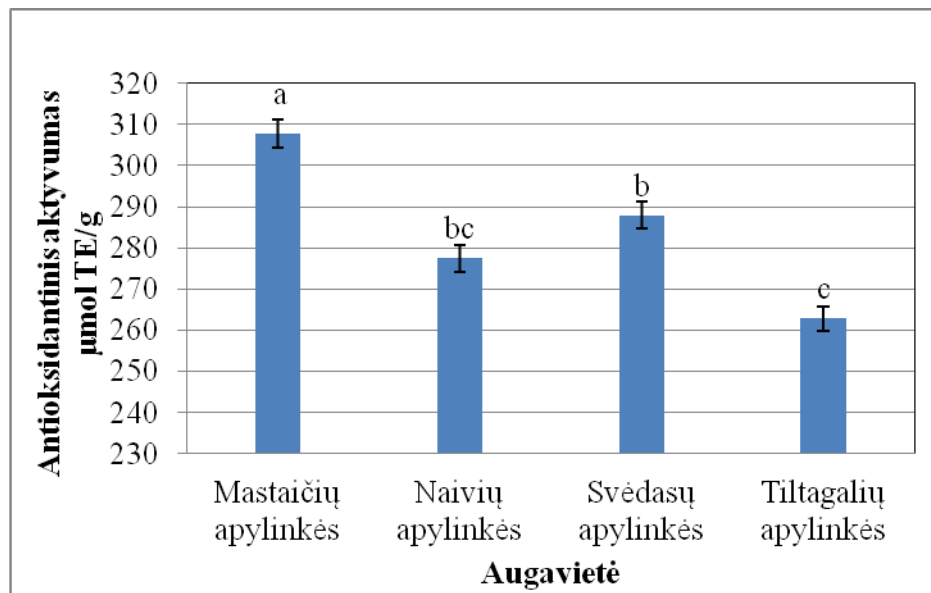


9 pav. Spektrofotometrinio DPPH metodu nustatytas plačialapių gysločių lapų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas

**Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių*

Atlikus gautų rezultatų vidurkių palyginimą, taikant ANOVA, statistiškai reikšmingo skirtumo tarp plačialapių gysločių lapų ėminių, surinktų skirtingose augavietėse, ekstraktų antioksidantinio aktyvumo nenustatyta.

Plačialapių gysločių lapų ekstraktų redukcinio aktyvumo nustatymas, naudojant FRAP metodą. Atliktas plačialapių gysločių lapų ėminių ekstraktų redukcinio aktyvumo tyrimas, taikant spektrofotometrinį FRAP metodą. Nustatyta, kad plačialapių gysločių lapų ėminių ekstraktų redukcinis aktyvumas įvairuoja nuo 262,80 $\mu\text{mol TE/g}$ iki 307,78 $\mu\text{mol TE/g}$ (10 pav.). Stipriausias antioksidantinis aktyvumas ($p < 0,05$) nustatytas Mastaičių apylinkėse rinktuose plačialapių gysločių lapuose ($307,78 \pm 3,55 \mu\text{mol TE/g}$). Silpnėsnis antioksidantinis aktyvumas nustatytas Svėdasų apylinkėse rinktuose plačialapių gysločių lapuose ($287,90 \pm 3,32 \mu\text{mol TE/g}$) ir Naivių apylinkėse rinktuose plačialapių gysločių lapuose ($277,45 \pm 3,20 \mu\text{mol TE/g}$). Silpniausias antioksidantinis aktyvumas ($p < 0,05$) nustatytas Tiltagalių apylinkėse rinktuose plačialapių gysločių lapuose ($262,80 \pm 3,03 \mu\text{mol TE/g}$) (10 pav.).



10 pav. Spektrofotometrinio FRAP metodu nustatytas plačialapių gysločių lapų ekstraktų redukcinis aktyvumas

**Skirtingos raidės parodo statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp ėminių*

Siekiant įvertinti koreliacinį ryšį, tarp plačialapių gysločių lapų ekstraktuose nustatytų fenolinių junginių kiekių ir antioksidantinių aktyvumų apskaičiuotas Spirmano koreliacijos koeficientas. Statistiškai reikšmingų koreliacijų tarp fenolinių junginių kiekio ir antioksidantinio aktyvumo nenustatyta. Galima manyti, kad antiradikalinį aktyvumą plačialapių gysločių lapų ekstraktuose lemia kiti, netirti biologiškai aktyvūs junginiai.

Apibendrinant gautus rezultatus, atlikus antioksidantinio aktyvumo tyrimus *in vitro* nustatyta, kad stipriausiu antioksidantiniu aktyvumu pasižymi plačialapių gysločių lapai rinkti Mastaičių ir Tiltagalių apylinkėse. Remiantis užsienio mokslininkų ir mūsų atliktų tyrimų duomenimis, galima teigti, kad plačialapių gysločių lapuose yra gausu natūralių antioksidantų. Įtraukus plačialapių gysločių lapus, jų ekstraktus į kasdienės mitybos racioną, galėtų būti sumažinta rizika oksidacinio streso sukeltamų lėtinių ligų atsiradimui.

4. IŠVADOS

1. Atlikti ekstrakcijos sąlygų (etanolio koncentracijos ir ekstrakcijos trukmės) parinkimo tyrimai. Nustatyta, kad daugiausiai fenolinių junginių iš plačialapių gysločių lapų ėminių išekstrahuojama naudojant 50 proc. v/v etanolį, ekstrakciją ultragarso poveikyje vykdant 20 min.
2. Atlikus fenolinių junginių kiekinės sudėties tyrimus, nustatyta, kad augavietė turi įtakos bendram fenolinių junginių kiekiui plačialapių gysločių lapuose. Nustatyta, kad fenolinių junginių kiekis, skirtinguose Lietuvos rajonuose rinktų, plačialapių gysločių lapuose įvairuoja nuo 36,95 mg/g iki 65,14 mg/g. Daugiausiai fenolinių junginių ($p < 0,05$) nustatyta Kauno rajone, Mastaičių apylinkėse rinktuose plačialapių gysločių lapuose ($65,14 \pm 0,47$ mg/g). Šiaurės Lietuvoje rinktuose plačialapių gysločių lapų ėminiuose fenolinių junginių kiekiai yra mažesni ($p < 0,05$).
3. Spektrofotometrinio metodu, kaip reagentą naudojant aliuminio chloridą, nustatyta, kad suminis flavonoidų kiekis plačialapių gysločių lapų ekstraktuose įvairuoja nuo 2,17 mg/g iki 2,29 mg/g. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp bendro flavonoidų kiekio plačialapių gysločių lapų ėminiuose, surinktuose skirtingose natūraliose augavietėse, nenustatyta.
4. Spektrofotometrinio metodu nustatyta, kad bendras o-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekis plačialapių gysločių lapuose įvairuoja nuo 18,94 mg/g iki 23,40 mg/g. Didžiausias o-dihidroksicinamono rūgšties darinių kiekis ($p < 0,05$) nustatytas Kupiškio rajone, Naivių apylinkėse rinktuose plačialapių gysločių lapuose ($23,40 \pm 0,27$ mg/g). Mažiausiai ($p < 0,05$) o-dihidroksicinamono rūgšties darinių nustatyta Anykščių rajone, Svėdasų apylinkėse ($19,79 \pm 0,23$ mg/g) ir Panevėžio rajone, Tiltagalių apylinkėse ($18,94 \pm 0,22$ mg/g) rinktuose plačialapių gysločių lapuose.
5. Atlikti plačialapių gysločių lapų ekstraktų antioksidantinio aktyvumo tyrimai. Nustatyta, kad plačialapių gysločių lapų ekstraktuose antiradikalinis aktyvumas įvairuoja nuo 260,34 $\mu\text{mol TE}_{\text{ABTS}}/\text{g}$ iki 271,49 $\mu\text{mol TE}_{\text{ABTS}}/\text{g}$, nuo 237,20 $\mu\text{mol TE}_{\text{DPPH}}/\text{g}$ iki 239,01 $\mu\text{mol TE}_{\text{DPPH}}/\text{g}$ ir nuo 262,80 $\mu\text{mol TE}_{\text{FRAP}}/\text{g}$ iki 307,78 $\mu\text{mol TE}_{\text{FRAP}}/\text{g}$. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp plačialapių gysločių lapų ėminių, surinktų skirtingose augavietėse ir tarp ekstraktų antiradikalinio aktyvumo, nenustatyta. Stipriausiu redukciniu aktyvumu ($p < 0,05$) pasižymi Mastaičių apylinkėse rinkti plačialapių gysločių lapai ($307,78 \pm 3,55$ $\mu\text{mol TE/g}$).

5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

- Atlikti plačialapių gysločių lapų antioksidantinio aktyvumo tyrimai rodo, kad žaliava yra gausi antioksidantiniu aktyvumu pasižyminčių medžiagų. Plačialapių gysločių lapų ekstraktai gali būti perspektyvi žaliava maisto papildams, pasižymintiems antioksidantiniu poveikiu.
- Siekiant detaliau įvertinti plačialapių gysločių lapų biologiškai aktyvių junginių kokybinės ir kiekinės sudėčių įvairavimus Lietuvoje, reikėtų ištirti plačialapių gysločių lapų ėminius iš daugiau skirtingų Lietuvoje esančių natūralių augaviečių.
- Siekiant išsiaiškinti biologiškai aktyvių junginių plačialapių gysločių lapuose, kokybinę ir kiekinę sudėtį, tikslinga plačialapių gysločių žaliavą ištirti pritaikant labiau selektyvius analizės metodus, tokius kaip efektyvioji skysčių chromatografija.

6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Butkienė S, Snarskis P. gyslotis - *Plantago* L. In: Lietuvos TSR flora, 4. Vilnius:Lietuvos TSR Mokslų Akademija, Botanikos Institutas; 1971. p. 503 - 506
2. Jakštas V, Janulis V, Trumbeckaitė S. Cheminis fitopreparatų tyrimas. Kaunas: KMU leidykla; 2009. p. 71-9.
3. Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. Journal of Ethnopharmacology. 2000;71(1):1–21.
4. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. Analyst. 2002;127(1):183–98.
5. Badarinath AV, Mallikarjuna Rao K, Madhu Sudhana Chetty C, Ramkanth S, Rajan TVS, Gnanaprakash K. A review on In-vitro antioxidant methods: Comparisons, correlations and considerations. International Journal of PharmTech Research. 2010;2(2):1276–85.
6. Blainski A, Lopes GC, Palazzo de Mello JC. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. Molecules. 2013;18:6852–6865.
7. Campos, AM, Lissi, EA. Evaluation of the antioxidant capacity of herbal teas by a procedure based on the bleaching of ABTS radical cations. Boletín de la Sociedad Chilena de Química. 1995;40(4):375-381.
8. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. Journal of Food and Drug Analysis. 2002;10(3):178-82.
9. Davini, E, Lavarone, C, Trogolo, C, Aureli, P, Pasolini, B. The quantitative isolation and antimicrobial activity of the aglycone of aucubin. Phytochemistry. 1986;25:2420–2422.
10. Ece Miser-Salihoglu, Galip Akaydin, Emel Caliskan-Can and Sevgi Yardim-Akaydin. Evalution of Antioxidant Activity of Various Herbal Folk Medicines. Journal of Nutrition & Food Sciences. 2013.
11. European pharmacopoeia 8.0. Strasbourg: Council of Europe, 01/2012:1884 p. 1367-1368, 2006.
12. European pharmacopoeia 8.5. Strasbourg: Council of Europe, 07/2015/20232 p. 4888, 2006.
13. Franca F, Lago EL, Marsden PD. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1996;29(3):229-232.
14. G. R. Sagar and J. L. Harper. *Plantago Major* L., *P. Media* L. and *P. Lanceolata* L. Journal of Ecology. 1964;52(1):189-221.

15. Gálvez M, Martín-Cordero C, López-Lázaro M, Cortés F, Ayuso MJ. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *Journal of ethnopharmacology*. 2003;88(2):125-130.
16. Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal plants research*. 2011;5(31):6697-6703.
17. Giada M. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. *Croatia in Tech*. 2013:87–112.
18. Gokhan Oto, Suat Ekin, Hulya Ozdemir, Abdulkadir Levent, Ismet Berber. The effect of *Plantago major* Linnaeus on serum total sialic acid, lipid-bound sialic acid, some trace elements and minerals after administration of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rats. *Toxicology and industrial health*. 2011;0748233711412422;
19. Gomez-Flores R, Calderon CL, Scheibel LW, Tamez-Guerra P, Rodriguez-Padilla C, Tamez-Guerra R, Weber RJ. Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract. *Phytotherapy Research*. 2000;14(8):617-622.
20. González M, Guzmán B, Rudyk R, Romano E, Molina MAA. Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds in Propolis. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 2003;22(3):243-248.
21. Grigorescu E, Stanescu U, Basceanu V, Aur MM. Phytochemical and microbiological control of some plant species used in folk medicine. II. *Plantago lanceolata* L., *Plantago media* L., *Plantago major* L. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*. 1972;77(4):835-841.
22. Gülçin I, Sat IG, Beydemir S, Elmastas M, Küfrevioğlu ÖI. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry*. 2004;3(87):393-400.
23. Hagerman AE. Modified Prussian Blue Assay For Total Phenols. *J Agric Foods Chem*. 2002.
24. Hagerman AE. Prussian Blue Assay For Total Phenols. *J Agric Foods Chem*. 2002.
25. Huang, W, Cai, Y, and Zhang, Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutrition and cancer*. 2009;62(1):1-20.
26. Hussan F, Mansor AS, Hassan SN, Tengku Nor Effendy Kamaruddin TN, Budin SB, Othman F. Anti-Inflammatory Property of *Plantago major* Leaf Extract Reduces the Inflammatory Reaction in Experimental Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015.
27. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for charactersation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011;126(4):1821-1835.

28. Yordi EG, Pérez EM, Matos MJ, Villares EU. Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. Nutrition, Well-Being and Health. Croatia: InTech. 2012;23-48.
29. Jun, X, Shouqin Z. Antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis by hydrostatic pressure extraction. International journal of food science & technology. 2007;42(11):1350-1356.
30. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. Journal of agricultural and food chemistry. 1999;47(10):3954-3962.
31. Kasey E. Barton. Early ontogenetic patterns in chemical defense in *Plantago* (*Plantaginaceae*): genetic variation and trade-offs. American Journal of Botany. 2007;94(1):56-66.
32. Kawashty, SA, Gamal-el-din, E, Abdalla, MF, Saleh, NAM. Flavonoids of *Plantago* species in Egypt. Biochemical Systematics and Ecology. 1994;22(7):729-733.
33. Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A, Amendola V. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Phytochemistry: Advances in research. 2006;661:23-67.
34. Lithander A. Intracellular fluid of waybread (*Plantago major*) as a prophylactic for mammary cancer in mice. Tumor Biology. 1992;13(3):138-141.
35. Long, C, Moulis, C., Stanislas, E, Fouraste', E. L'aucuboside et le catalpol dans les feuilles de *Plantago lanceolata* L., *Plantago major* L. et *Plantago media* L. Journal de pharmacie de Belgique. 1995;50(6):484-488.
36. M.S Krasnova, VP Yamskovaa, DV Margasyukb, OG Kulikovab, AP Il'inab, E Yu Rybakovaa, IA Yamskovb. Study of a New Group of Bioregulators Isolated from the Greater Plantain (*Plantago major* L.). Applied Biochemistry and Microbiology. 2011;47(2):128-135.
37. Mahfoudh A. Abdulghani, Ismat Hamid, Redhwan Ahmed Al-Naggar, and Muhamed T Osman. Potential Antidiabetic Activity of *Plantago Major* Leaves Extract in Streptozocin-Induced Diabetic Rats. RJPBCS. 2014;5(2).
38. Martin KR, Appel CL. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. Nutr Diet Suppl. 2010;2:1-12.
39. Martine Bakker, Wim J Baas, Dick THM Sijm, Chris Kollöffel. Leaf wax of *Lactuca sativa* and *Plantago major*. Phytochemistry. 1998;47(8):1489-1493.
40. Matev M, Angelova I, Koichev A, Leseva M, Stefanov G. Clinical trial of a *Plantago major* preparation in the treatment of chronic bronchitis. Vutreshni bolesti. 1982;21(2):133-137.
41. Mir SA, Bhat AS, Ahangar AA. A simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine assay for Flavonoids and its comparison with a standard flavonoid assay. Int J PharmTech Res. 2014;6(2):751-758.

42. Mølgaard, P. Population genetics and geographical distribution of caffeic acid esters in leaves of *Plantago major* in Denmark. *The Journal of Ecology*. 1986;74:1127–1137.
43. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*. 1991;43(2):109-142.
44. Muhammad Zubair, Anders Ekholm, Hilde Nyboma, Stefan Renvert b, Cecil. Effects of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012;141(3):825–830.
45. Muhammad Zubair, Hilde Nyboma, Maria Ahnlund, Kimmo Rumpunen. Detection of genetic and phytochemical differences between and within populations of *Plantago major* L. (plantain). *Scientia horticulturae*. 2012;136:9-16.
46. Nishibe, S, Ono, K, Nakane, H, Kawamura, T, Noro, Y, Tanaka, T. Studies on constituents of *Plantaginis herba* 9: Inhibitory effects of flavonoids from *Plantago* herb on HIV-reverse transcriptase activity. *生薬学雑誌*. 1997;51(6):547-549.
47. Norma PM, Virginia N-M, Ral R-H, Jos CE, Cristbal NA. A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging. *African Journal of Biochemistry Research*. 2014;8(1):14-18.
48. Noro, Y, Hisata, Y, Okuda, K, Kawamura, T, Kasahara, Y, Tanaka, T, Sasahara, M. Pharmacognostical studies of *Plantaginis herba* (VII). On the phenylethanoid contents of *Plantago* spp. *Shoyakugaku Zasshi*. 1991;45:24-28.
49. Olga N. Nemereshina, Alexey A. Tinkov, Viktor A. Gritsenko, and Alexandr A. Nikonorov. Influence of *Plantaginaceae* species on *E. coli* K12 growth in vitro: Possible relation to phytochemical properties. *Pharmaceutical biology*. 2014;53(5):715-724.
50. Pękal A, Pyrzyńska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014;7:1776–82.
51. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4(2):89–96.
52. Prior R, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 2005;18(53):4290–302.
53. Rahal, A., Kumar, A., Singh, V, Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S, Dhama, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*. 2014.
54. Raquel Pulido, Laura Bravo and Fulgencio Saura-Calixto. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem*. 2000;48 (8):3396–3402
55. Ravn, H., Brimer, L. Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subs *major*. *Phytochemistry*. 1988;27:3433–3437.

56. Recio, M.C, Giner, RM, Ríos, JL. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Medica*. 1994;60(03):232-234.
57. Rojas, I.R. Contribucion al estudio quimico del llanten (*Plantago major* L.). *Anales de la Facultad de Quimicay Farmacia*. 1968;20:146–150.
58. Samuelsen AB, Paulsen BS, Wold JK et al. Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L. *Carbohydr Polymers*. 1996;30(1):37-44.
59. Sandra Gonçalves, Anabela Romano. The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (*Plantaginaceae*). *Industrial Crops and Products*. 2016;83:213–226
60. Saxena M, Saxena J, Nema R, Singh D, Gupta A. Phytochemistry of medicinal plants. *J Pharmacogn Phytochem*. 2013;1(6):168–82.
61. Schneider, G. *Arzneidrogen, Ein Kompendium fur Pharmazeuten, Biologen und Chemiker*. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Germany. 1990:131.
62. Skari, K.P., Malterud, K.E., Haugli, T. Radical scavengers and inhibitors of enzymatic lipid peroxidation from *Plantago major*, a medicinal plant *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*. 1999;240:200–202.
63. Smolenski, S.J., Silinis, H, Farnsworth, N.R. Alkaloid Screening. IV. *Lloydia*. 1974;37:30–61.
64. T. E. Michaelsen, A. Gilje, A. B. Samuelsen, K. HégaË Sen & B. S. Paulsen. Interaction Between Human Complement and a Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the Leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian journal of immunology*. 2000;52(5):483-490.
65. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 2009;7(1):65–74.
66. Velasco-Lezama R, Tapia-Aguilar R, Román-Ramos R, Vega-Avila E, Pérez-Gutiérrez MS. Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;103(1): 36-42.
67. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT—Food Science and Technology*. 1995;28:25-30.
68. Wong C, Murray BG. Variable changes in genome size associated with different polyploid events in *Plantago* (*Plantaginaceae*). *Journal of Heredity*. 2012;103(5):711-719.
69. Zayachivska OS, Konturek SJ, Drozdowicz D, Brzozowski T, Ghogotsky MR. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2005;56(1):219–231.
70. Zubair M, Nybom H, Lindholm C, Brandner JM, Rumpunen K. Promotion of wound healing by *Plantago major* L. leaf extracts--ex-vivo experiments confirm experiences from traditional medicine. *Natural product research*. 2016;30(5):622-4.