LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
ANALIZINĖS IR TOKSIKOLOGINĖS CHEMIJOS KATEDRA

JUSTAS NEVERAUSKAS

FLAVONOIDŲ SUDĖTIES ĮVAIRAVIMO TYRIMAI PLONASLUOKSNĖS CHROMATOGRAFIJOS METODU *GINKGO BILOBA* L. LAPUOSE, RINKTUOSE SKIRTINGU VEGETACIJOS PERIODU

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas:
Doc., dr. Rūta Marksienė

KAUNAS, 2017

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
ANALIZINĖS IR TOKSIKOLOGINĖS CHEMIJOS KATEDRA

TVIRTINU:
Farmacijos fakulteto dekanas prof. dr. Vitalis Briedis
Data

FLAVONOIDŲ SUDĖTIES ĮVAIRAVIMO TYRIMAI PLONASLUOKSNĖS CHROMATOGRAFIJOS METODU *GINKGO BILOBA* L. LAPUOSE, RINKTUOSE SKIRTINGU VEGETACIJOS PERIODU

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas:
Doc., dr. Rūta Marksienė
Data

Recenzentas:

Data

Darbą atliko:
Magistrantas Justas Neverauskas
Data

KAUNAS, 2017

TURINYS

SANTRAUKA 4
SUMMARY 5
SANTRUMPOS 6
ĮVADAS 7
DARBO TIKSLAS IR DARBO UŽDAVINIAI 8
1. LITERATŪROS APŽVALGA 9
1.1 Dviskiaučio ginkmedžio (*Ginkgo biloba* L.) apibūdinimas 9
1.1.1. Augalo kilmė ir istorinės žinios 9
1.1.2. Augalo morfologinis aprašymas 9
1.2. Vaistinės augalinės žaliavos ruošimo metodika 9
1.2.1. Dviskiaučių ginkmedžių (*Ginkgo biloba* L.) lapų cheminė sudėtis 10
1.3. Flavonoidų klasifikacija ir struktūros ypatybės 10
1.3.1. Flavonoidų fiziko-cheminės savybės 12
1.4. Terpenoidų klasifikacija ir struktūros ypatybės 13
1.5. Dviskiaučių ginkmedžių ekstraktų biologinis poveikis 14
1.6. Dviskiaučių ginkmedžių lapuose esančių fenolinių junginių analizė 15
1.6.1. Ekstrakto paruošimas 15
1.6.2. Fenolinių junginių kiekybinis ir kokybinis nustatymas 16
2. TYRIMO METODIKA 19
2.1. Tyrimo objektas 19
2.2. Naudoti reagentai 19
2.3. Naudota aparatūra ir priemonės 20
2.4. Tyrimų metodai 20
2.4.1. Tiriamojo mėginio paruošimas 20
2.4.2. Etaloninių tirpalų paruošimas ir kalibracinių kreivių sudarymas 21
2.4.3. Flavonoidų kokybinis ir kiekybinis įvertinimas efektyviąja plonasluoksne chromatografija 21
2.5. Duomenų statistinis įvertinimas 22
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 23
3.1. Flavonoidų identifikavimas efektyviosios plonasluyoksnės chromatografijos metodu 23
3.2 Flavonoidų kiekybinis ivertinimas efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodu 25
3.3. Rutino kiekio kitimas dviskiaučių ginkmedžių lapuose augalų vegetacijos metu 26
3.4. Izokvercitrino kiekio kitimas dviskiaučių ginkmedžių lapuose augalų vegetacijos metu 29
3.5. Kvercitrino kiekio kitimas dviskiaučių ginkmedžių lapuose augalų vegetacijos metu 32
3.6. Suminio flavonoidų kiekio kitimas dviskiaučių ginkmedžių lapuose augalų vegetacijos metu 35
3.7. Flavonoidų kiekinės sudėties dviskiaučių ginkmedžių lapuose tyrimo apibendrinimas 37
4. Išvados 38
5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS 39
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS 40

SANTRAUKA

J.Neverausko magistro baigiamasis darbas/ mokslinė vadovė Dr., doc. Rūta Marksienė; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Farmacijos fakulteto, Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra – Kaunas.

Pavadinimas: Lietuvoje augančio dviskiaučio ginkmedžio (*Ginkgo biloba* L.) lapuose esančių flavonoidų įvertinimas efektyviąją plonasluoksne chromatografija.

Raktiniai žodžiai: *Ginkgo biloba* L., dviskiautis ginkmedis, vegetacija, flavonoidai, efektyvioji plonasluoksnė chromatografija.

Tyrimo tikslas: Pritaikyti efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodą dviskiaučių ginkmedžių (*Ginkgo biloba* L.) lapuose kaupiamų flavonoidų kokybiniame ir kiekybiniame tyrime bei įvertinti identifikuotų junginių dinamiką lapuose skirtingais vegetacijos periodais.

Darbo uždaviniai: 1. Pritaikyti efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos dviskiaučių ginkmedžių (*Ginkgo biloba* L.) lapuose kaupiamų flavonoidų kokybiniam įvertinimui.

2. Įvertinti identifikuotų flavonoidų kiekinės sudėties dinamiką ginkmedžio lapų ėminiuose surinktuose skirtingais vegetacijos periodais (mėnesiais).

3. Įvertinti ar lapų mėginių surinkimo laikas turi įtakos flavonoidų kokybinės ir kiekybinės sudėties kitimui.

Tyrimo metodika: *Ginkgo biloba* L. lapuose kaupiamų fenolinių junginių ekstrakcijai ir identifikavimui pritaikyta efektyviosios plonasluoksnės chromatografinės analizės metodika pagal Europos farmakopėjos 01/2008:1828 straipsnį. Tiriamųjų junginių identifikavimas atliktas naudojant rutino, izokvercitrino, astragalinio, kvercitrino etaloninių junginių metanolinius tirpalus. Kiekybinis flavanoidų nustatymas atliktas remiantis kalibracinės kreivės metodu.

Rezultatai ir išvados: *Ginkgo biloba* L. lapų ėminiuose skirtingose lapų vegetacijos perioduose identifikuoti šie junginiai: rutinas, izokvercitrinas astragalinas, kvercitrinas. Europos farmakopėjos 01/2008:1828 straipsnis pritaikytas efektyviajai plonasluoksnei chromatografijai atlikti. Nustatyta, kad dviskiaučų ginkmedžių lapų suminis kvercetino glikozidų kiekis įvairuoja nuo 4,351 mg/g iki 10,986 mg/g, rutino kiekis – nuo 3,114 mg/g iki 7,661 mg/g , izokvercitrino kiekis – nuo 0,437 mg/g iki 2,548 mg/g, kvercitrino kiekis – nuo 0,742 mg/g iki 0,973 mg/g. Remdamiesi gautais tyrimų rezultatais vaistinę augalinę žaliavą patartina rinkti rugsėjo – spalio mėnesiais.

SUMMARY

J. Neverauskas Master's thesis/ academic coordinator Dr., doc. Ruta Marksiene; University of health science in Lithuania, medicine faculty, department of analytical and toxicological chemistry, Kaunas.

Keyword: *Ginkgo biloba*, vegetation, flavonoids, high-performance thin -layer chromatography.

Research purpose: To apply the method of high-performance thin-layer chromatography of Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) in order to assess the levels of flavonoids in the leaves during quantitative and qualitative research to assess the dynamics of the identified compounds in the leaves at different vegetation periods.

Work tasks: 1. To apply high-performance thin-layer chromatography of Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) in order to assess the levels of flavonoids collected in the leaves.

2. To evaluate the dynamics of the composition of the flavonoids in the samples of the Ginkgo leaves collected during different vegetation periods (months).

3. To rate whether the time of the collection of the leaves has an affect on the flavonoids qualitative and quantitative change of flavonoids.

Research methodology: High-performance thin-layer chromatography analysis methodology (in accordance with the European Pharmacopoeia 01/2008: 1828 Article) was adapted to identify and extract phenolic compounds stored in *Ginkgo biloba* leaves.Identification of test compounds was carried out using methanolic solutions of reference compounds such asrutin, izoquercitrin, astragalin and quercitrin.Quantitative determination of flavonoids was carried out on the basis of the calibration curve method.

Summary and conclusions: In the samples of *Ginkgo biloba* leaves from different leaf vegetation phases the following components were identified: rutin, izokvercitrin, astragalin and kvercitrin.

European Pharmacopoeia 01/2008: 1828 Article was adapted for high-performance thin-layer chromatography.

It was found that the total quercetin glycosides content in *Ginkgo biloba* leaf is ranging from 4.351 mg /g to 10.986 mg /g,rutin- from 3,114mg / g to 7,661mg /g, izokvercitrin- from 0,437mg /g to 2,548mg /g, kvercitrin- from 0,742mg /g to 0,973mg /g.

Based on the obtained results, it is advisable to collect the pharmacy plant raw material in September - October.

SANTRUMPOS

DC – dujų chromatografija

ESC – efektyvioji skysčių chromatografija

PC – plonasluoksnė chromatografija

EPC – efektyvioji plonasluoksnė skysčių chromatografija

MS – masių spektrometrija

ĮVADAS

Plečiantis farmacijos pramonei vis didesnis dėmesys yra skiriamas augalinės kilmės preparatams. Remiantis literatūros duomenimis apie 70% žmonių iš sparčiai besivystančių tautų renkasi natūralius vaistinius preparatus ar maisto papildus. Prekyba šiais preparatais sparčiai išaugo per pastaruosius 15 metų [4].

Ginkgo biloba L. lapų augalinė žaliava yra viena iš dažniausiai naudojamų maisto papildų gamyboje [14]. Remiantis valstybinės vaistų kontrolės tarnybos duomenis Lietuvoje yra registruoti 9 vaistiniai preparatai. Šis augalas pasižymi daugiafunkciniu veikimu žmogaus organizmui, laisvuosius radikalus surišančiomis, antiapoptotinėmis savybėmis, geba sumažinti daugelio patologinių būklių ir sutrikimų riziką, todėl dažnai naudojamas ne tik liaudies bet ir šiuolaikinėje medicinoje. *Ginkgo biloba* L. augalinė žaliava praturtinta ginkolidais, bilobalidais ir fenoliniais junginiais [49].

Darbo teorinė ir praktinė reikšmė: Buvo analizuoti Šiaulių ir Klaipėdos universiteto botanikos soduose surinkti dviskiaučių ginkmedžių lapai. Mokslinių tyrimų metu siekta įvertinti dviskiaučių ginkmedžių augalinėje žaliavoje esančių flavonoidų kokybinę ir kiekybinę sudėtį. Tyrimai atlikti su efektyviąja plonasluoksne chromatografija, nes šis metodas yra greitas ir efektyvus.

Tyrimo problema: Mokslinės literatūros duomenimis dviskiaučių ginkmedžių žaliava plačiai išanalizuota, tačiau Lietuvoje augančio *Ginkgo biloba* L. lapų tyrimų atlikta labai mažai. Todėl yra aktualu įvairiems *Ginkgo biloba* L. lapų tyrimams taikant šiuolaikinius instrumentinius analizės tyrimus.

Tyrimo tikslas: Pritaikyti efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodą dviskiaučių ginkmedžių (*Ginkgo biloba* L.) lapuose kaupiamų flavonoidų kokybiniame ir kiekybiniame tyrime bei įvertinti identifikuotų junginių dinamiką lapuose skirtingais vegetacijos periodais.

DARBO TIKSLAS IR DARBO UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: Pritaikyti efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodą dviskiaučių ginkmedžių (*Ginkgo biloba* L.) lapuose kaupiamų flavonoidų kokybiniame ir kiekybiniame tyrime bei įvertinti identifikuotų junginių dinamiką lapuose skirtingais vegetacijos periodais.

Darbo uždaviniai:

1. Pritaikyti efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos dviskiaučių ginkmedžių (*Ginkgo biloba* L.) lapuose kaupiamų flavonoidų kokybiniam įvertinimui.
2. Įvertinti identifikuotų flavonoidų kiekinės sudėties dinamiką ginkmedžio lapų ėminiuose surinktuose skirtingais vegetacijos periodais (mėnesiais).
3. Įvertinti ar lapų mėginių surinkimo laikas turi įtakos flavonoidų kokybinės ir kiekybinės sudėties kitimui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Dviskiaučio ginkmedžio (*Ginkgo biloba* L.) apibūdinimas

1.1.1. Augalo kilmė ir istorinės žinios

Dviskiautis ginkmedis (lot. *Ginkgo biloba* L.) priklauso ginkmedainių (*Ginkgoopsida* L.) klasei, ginkmedainiai (*Ginkgoaceae*) vienas seniausių planetos augalų, egziztavęs prieš 250 milijonų metų yra vienintelis išlikęs savo genties atstovas. Darvinas dar kitaip vadino „gyvąja iškasena''. Jo gimtine laikoma Kinija; natūraliai augantis aptinkamas tik Kinijoje, Korėjoje ir Japonijoje [33, 38]. Pirmasis dviskiaučio ginkmedžio vardas buvo kiniškas „YaChio'', kuris reiškė anties pėda ir naudojamas šiandien. 1712 m. Englbert Kaemfer pasiūlytas *Ginkgo* pavadinimas buvo priimtinas binarinės nomenklatūros kūrėjui Karlui Linėjui, kuris 1771 m. prie *Ginkgo* prijungė rūšies pavadinimą *biloba,* nurodantį, kad augalo lapalakščiui būdinga pleišto forma [38]. Šešioliktame amžiuje Kinijos farmakopėjoje minimi vaistinio ginkmedžio lapai ir vaisiai. 1730 m. europiečiai sužinojo apie ginkmedį [38].

1.1.2. Augalo morfologinis aprašymas

Dviskiautis ginkmedis – dvinamis, 40 metrų aukščio lapuotis medis, turintis šviesiai pilką arba pilkai rudos spalvos žievę. Vyriškosios lyties medžiai nuo moteriškosios skiriasi siauromis medžių lajomis. Medis turi dviejų rūšių ūglius: ilgų ūglių lapai yra pavieniai, prisitvirtinę padrikai, o trumpų ūglių –viršūnėse išaugę kuokštais po 5-7 lapus [36]. Viršutinė lapo pusė yra truputį tamsesnė; lapalakštis –vėduoklės formos (4 – 10 cm ilgio), dažniausiai padalytas. Viršutinis ir apatinis paviršiai glotnūs, būdingas dichotominis gyslotumas, distaliniai kraštai netaisyklingai įpjauti. Lapo šoniniai kraštai yra ištisi, siaurėjantys pagrindo link. Vyriškosios lyties medžių lapai yra padalinti į dvi dalis, o moteriškosios – vientisiniai [15].

1.2. Vaistinės augalinės žaliavos ruošimo metodika

Dviskiaučių ginkmedžių lapai skinami arba renkami nukritę dažniausia rudenį. Vaistinė augalinė žaliava ruošiama pagal Europos Farmakopėjos keliamus reikalavimus. Lapai džiovinami paskleidus pavėsyje gerai vėdinamoje patalpoje arba džiovykloje ne aukštesnėje nei 40 – 50 °C

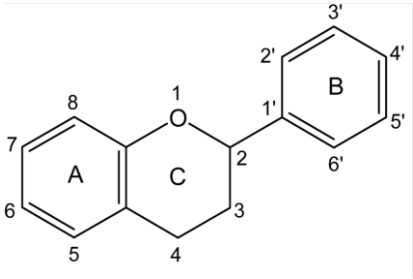
temperatūroje. Išdžiūvusi žaliava – šviesiai geltonos spalvos, lapai nepažeisti, pakuojama į maišus ar dėžes. Tinkamumo laikas – vieneri metai [38].

1.2.1. Dviskiaučių ginkmedžių (*Ginkgo biloba* L.) lapų cheminė sudėtis

Dviskiaučių ginkmedžių lapų sudėtyje yra dvi pagrindinės junginių klasės, kurios lemia farmakologinį aktyvumą: flavonoidai ir terpenai. Taip pat randami organiniai (glicerolio derivatai, 1-hidroksipireno konjugatai, citokinai, 6-hidroksinureninė rūgštis, glikozidai, vaškai ir peptidai) bei neorganiniai (kalcio oksalatas, varis, cinkas, geležis, manganas) junginiai [12].

1.3. Flavonoidų klasifikacija ir struktūros ypatybės

Flavonoidai yra polifenoliniai, mažos molekulinės masės, silpnomis rūgštinėmis savybėmis pasižymintys hidrofobiniai organiniai junginiai. Jų randama beveik visuose žaliuose augaluose didžiausias kiekis aptinkamas lapuose ir žieduose [44]. Jų struktūros pagrindą sudaro benzo – γ- žiedas (flavanas), kuriame yra du benzeno žiedai (A ir B), kurie sujungti heterocikliniu pirano žiedu [35, 44]. Ši struktūra gali būti vaizduojama kaip C6 – C3 – C6 sistema, kurią sujungia trijų C atomų linijinę grandinę [29].



1pav. Flavonoidų struktūra (žiedai: A, B – benzeno, C- pirano)

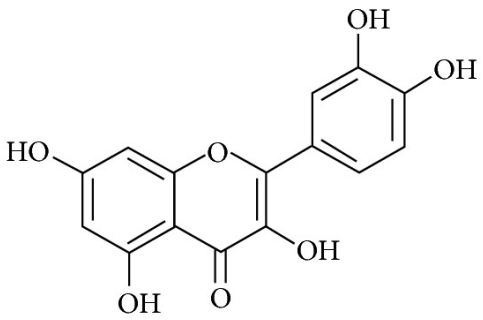
Flavonoidai gali būti klasifikuojami pagal:

1. cheminės struktūros pagrindą;
2. biosintezės kilmę;
3. heterociklo dydį;
4. šoninių radikalų padėtį;
5. cukrų molekulių kiekį [29].

Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad dviskiaučių ginkmedžių lapuose randami flavonoidai, priklausomai nuo centrinio pirano žiedo oksidacijos laipsnio skirstomi į :

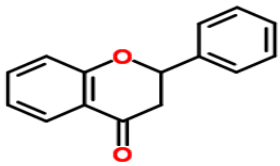
1. flavonolius;
2. flavanonus;
3. flavonus;
4. flavanolius;
5. izoflavonus [45].

Flavonoliai – tai flavano dariniai, tačiau tarp antros ir trečios padėties vienguba jungtis, ketvirtoje padėtyje neturi ketono grupės. Šiai grupei priklauso rutinas, kvercetinas, kemferolis, hiperozidas.



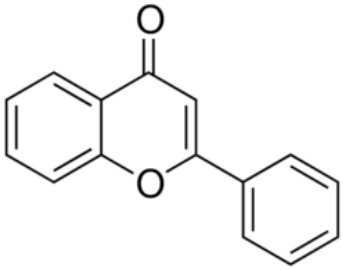
2 pav. Flavonolio struktūrinė formulė [45]

Flavanonai - kuriems priskiriami: hesperidinas, flavononas, likviritigeninas, eriodiktinas. Nuo flavonų skiriasi, kad prie antros ir trečios padėties vienguba jungtis [30].



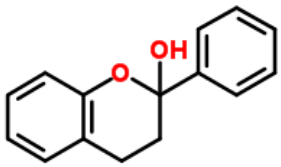
3pav. Flavanono sturktūrinė formulė [30]

Flavonai – benzopirano dariniai, dviskiaučių ginkmedžių lapuose egzistuojantys aglikonų ir glikozidų pavidaluose. Dažniausiai randami flavonai – apigeninas ir liuteolinas, taip pat sutinkamas gingetinas, kuris pirmą kartą buvo išskirtas iš ginkmedžių lapų [24].



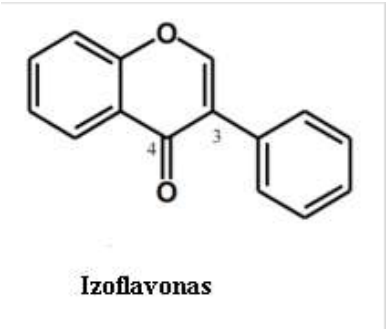
4 pav. Flavono struktūrinė formulė [24].

Flavonoliai arba flavon-3–oliai, kuriems priskiriamas katechinas. Savo struktūra panašūs į flavonus, tačiau tarp antros ir trečios padėties yra vienguba jungtis, taip pat ketvirtoje padėtyje nėra keto grupės.



5 pav. Flavanolio struktūrinė formulė [24]

Izoflavonai - pagrindiniai atstovai: ononinas, genistinas.



6 pav. Izoflavono struktūra [24]

1.3.1. Flavonoidų fiziko-cheminės savybės

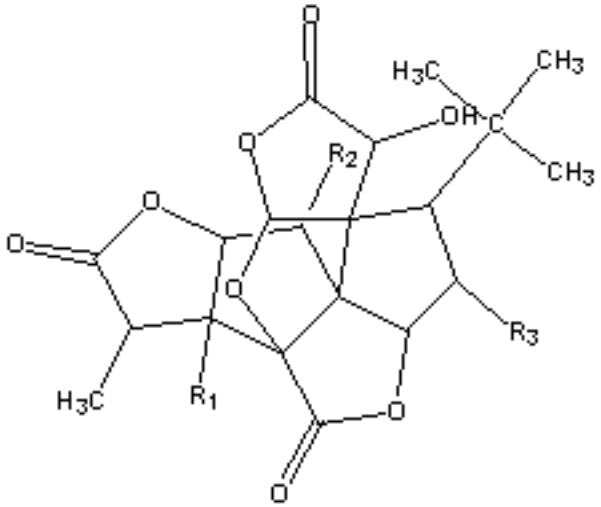
Flavanoidai yra kristalinės būsenos. Daugelis junginių turi būdingą spalvą – flavonai, flavonoliai - gelsvai oranžinę spalvą, o katechinai, flavanonai, izoflavonai, leukocianidinai – bespalvės

medžiagos. Jų tirpumas priklauso nuo glikozidinimo laipsnio. Glikozidai gerai tirpūs vandenyje, spirito ir vandens mišinyje. Aglikonai visada gerai tirpsta nepoliniuose organiniuose tirpikliuose – eteryje, etilacetate, spirite. Flavonoidams būdingas optinis aktyvumas. Dalyvauja oksidacijos – redukcijos reakcijose [9].

1.4. Terpenoidų klasifikacija ir struktūros ypatybės

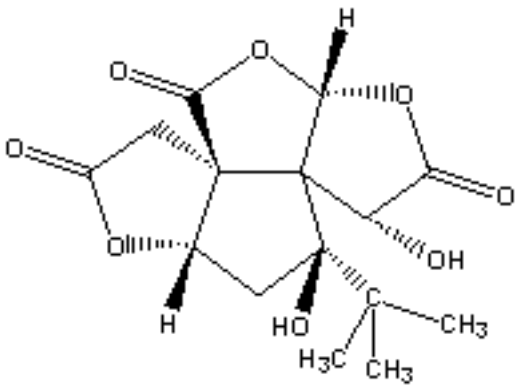
Terpenoidai- didelė natūraliai aptinkamų organinių junginių grupė, izopreno dariniai. Jie skirstomi į 8 grupes, pagal tai, kiek izopreną atkartojančių struktūrinių vienetų įeina į terpenoido struktūrą.Ginkmedžių lapuose aptinkami terpenolaktonai, kurie skirstomi į diterpenus ir seskviterpenus (bilobalidas), triterpenai (steroidų, fitosterolių), karotenoidų, poliprenoliai ir lakieji terpenai (monoterpenų ir seksviterpenų) [22, 30, 43]. Svarbiausiais šios grupės atstovais laikomi terpenolaktonai – ginkolidai ir bilobalidai, kurie daugiausiai randami tik šiame augale. Ginkolidai yra diterpenai (C_{20}), sudaryti iš šešių penkianarių žiedų: spiro[4,4]nonano žiedo, trijų laktono žiedų ir tetrahidrofurano žiedo, prie B žiedo prisijungusio tretinio butilo grupę. Ginkolidai skiriasi hidroksi grupių skaičiumi ir jų padėtimi spirononano struktūroje (7 pav.)

Bilobalido struktūra panaši į glikozidų, tačiau joje tetrahidrofurano žiedas pakeistas laktonu ir nėra A ir F žiedų (8 pav.).



	R1	R2	R3
Ginkolidas A	OH	H	H
Ginkolidas B	OH	OH	H
Ginkolidas C	OH	OH	OH
Ginkolidas J	OH	H	OH
Ginkolidas M	H	OH	OH

7 pav. Glikozidų struktūra [1, 13]



8 pav. Bilobalido struktūra [8, 13]

1.5. Dviskiaučių ginkmedžių ekstraktų biologinis poveikis

Pirmieji moksliniai tyrimai apibūdinę flavonoidų biologinį poveikį publikuoti dar 1936 metais. Iš visų flavonoidų daugiausiai išanalizuoti ir sutinkami : rutinas (vitaminas P1), hisperidinas (vitaminas P2), kvercetinas, sojų izoflavonoidai, antocianai (iš dviskiaučių ginkmedžių ir vynuogių), proantocianidinai (iš spanguolių), flavanai (iš arbatos ir obuolių). Flavonoidus būtina gauti su maistu, nes organizmas jų negamina. Mokslinė literatūra teigia, kad daugelyje *Ginkgo biloba* preparatų farmakologinį poveikį lemia jų sudėtyje esantys flavonoidai [1, 7, 30].

Dviskiaučių ginkmedžių preparatai gali būti naudojami vėžio prevencijai. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad sausas ekstraktas padidina p53 ekspresiją ir kaspazės-3 aktyvumą, taip sumažindamas vėžinių ląstelių proliferaciją. Poveikis pagrįstas ekstrakte esančiais flavonoidais, kurie veikdami vėžio supresorius, slopina tirozino kinazę ir pakeičia estrogeną, to pasekoje sumažinamas ir kancerogeniškumas [6, 29, 39].

Literatūroje teigiama, kad ginkmedžių preparatai naudojami kraujotakos sutrikimų prevencijai, taip pat reguliuoja kraujagyslių tonusą, elastingumą ir mažina kraujo klampumą [6, 20]. Šis veikimas pagrįstas flavonoidų poveikiu, nes veikdami kaip antioksidantai geba apsaugoti kraujagyslių endotelį nuo laisvųjų radikalų poveikio [23]. Taip pat nustatyta, kad flavonoidams būdingas antiagregacinis poveikis. Liuteolinas slopina leukocitų bei trombocitų agregaciją, o kvercetinas-eritrocitų agregaciją [10, 40]. Nustatyta atvirkštinė koreliacija tarp flavonoidų suvartojimo ir bendro cholesterolio kiekio, kuris yra vienas iš išeminės širdies ligos rizikos veiksnių, kiekio [28, 31, 50].

Gausūs *in vitro* ir *in vivo* moksliniai tyrimai rodo, kad flavonoidai (kvercetinas, liuteolinas, dihidrokvercetinas, rutinas, leukocianidinas bei katehinas) pasižymi priešuždegiminiu, priešvirusiniu

(ypač herpes) ir antiproliferaciniu poveikiu [11, 27, 47]. Taip pat žinoma, kad hisperidinas, bei kvercetinas pasižymi antihistamininiu poveikiu [25].

Toksikologijos tyrimai rodo, kad reikia atkreipti dėmesį į ginkolinės rūgšties kiekį esantį dviskiaučių ginkmedžių lapuose, nes ji toksiška, Sukelia alergines reakcijas, toksiškos imuninėms ląstelėms, embrionui, patekusios ant odos sukelia nudegimus ar uždegimą, patekus į vidų sukelia virškinimo trakto negalavimus. Pagal Europos, JAV, Japonijos ir Kinijos farmakopėjos standartus ginkolinės rūgšties kiekis dviskiaučių ginkmedžių ekstraktuose yra griežtai ribojamas. Europos ir Amerikos farmakopėjoje ginkolinės rūgšties kiekis negali viršyti 5ppm, o Kinijos – iki 10 ppm [52].

1.6. Dviskiaučių ginkmedžių lapuose esančių fenolinių junginių analizė

Nustatant cheminę sudėtį, esančią ginkmedžių lapuose ekstrakcijos metodiką galima padalyti į dvi dalis:

- ekstrakto paruošimas
- junginių nustatymas ir išskyrimas.

1.6.1. Ekstrakto paruošimas

Ekstrakcija – procesas, kurio metu vyksta biologiškai aktyvių junginių išgavimas iš augalinės žaliavos. Tradiciniai ekstrakcijos metodai: maceracija, perkoliacija, Soksleto ekstrakcija. Šių metodų trūkumai: trunka keletą valandų ar net dienų, sunaudojami dideli kiekiai organinių tirpiklių ir dideli kaštai. Nauji ekstrakcijos metodai: IR spindulių, superkritinių skysčių ekstrakcija, ekstrakcija mikrobangomis, ultragarsu. Atsižvelgiant į laiko trukmę trunka trumpiau, sunaudojama net iki kelių kartų mažiau organinių tirpiklių ir energijos [21].

Literatūros duomenimis fenoliniai junginiai esantys dviskiaučių ginkmedžių lapuose dažniausiai ekstrahuojami naudojant soksleto ekstrakciją arba maceraciją [26]. Naudojant tradicinius ekstrakcijos metodus kaip ekstrahentu pasirenkami etanolio/acetono ir vandens mišiniai, skirtingų koncentracijų metanolis. Tirpiklių pasirinkimas priklauso nuo biologiškai aktyvių junginių poliškumo. Mažo poliškumo flavonoidai (pvz., flavononai, metilinti flavonai ir flavonoliai) ekstrahuojami chloroformu, dicholrmetanu, dietileteriu. Didelio poliškumo flavonoidai (fenolininės rūgštys, flavonoidų glikozidai) negali būti pilnai išektrahuoti naudojant grynus organinius tirpiklius, todėl yra naudojami acetono – vandens, etanolio – vandens mišiniai. Vanduo yra nuaudojamas, kad išvengti nepolinių priemaišų, o organiniai tirpikliai sutrumpina ekstrakcijos laiką [44]. Be standartinių

ekstrakcijos metodų taikomi ir naujesni: ekstrakcija ultragarsu arba mikrobangų pagalba, superkritinių skysčių ekstrakcija ir aukšto hidrostatinio slėgio ekstrakcija. Taikant superkritinių skysčių ekstrakciją polinių junginių išskyrimui naudoti vieną anglies dioksidą nepakanka: kartu naudojant etanolį, metanolį, etilo acetatą ar kitą organinį modifikatorių, kontroliuojant slėgį ir susmulkinus *Ginkgo biloba* L. lapus iki 105μm dydžio miltelių, galima išskirti daugelį lapuose esančių fenolinių junginių. Didžiausias išekstrahuotų fenolinių junginių kiekis nustatytas esant 50-600 bar slėgiui 35°C ir temperatūrai [26, 41].Šis metodas pramonėje retai naudojamas, dėl metodo sudėtingumo ir laiko sąnaudų, todėl mokslininkai daugiausiai dėmesio skiria sąlygų optimizavimui naudojant ekstrakciją ultragarsu. Ekstrakcija ultragarsu yra greitesnė ir efektyvesnė, nereikalaujanti daug kaštų. Taip pat atlikti tyrimai parodė, kad fenolinių glikozidų išeiga iš dviskiaučių ginkmedžių lapų siekė net 97% [37, 48]. Tačiau yra kontraversiškų rezultatų, Rimmer ir kt. atliko eksperimentą ir palygino skirtingus ekstrakcijos metodus; ultragarsu ekstrakciją, aukšto hidrostatinio slėgio ekstrakaciją ir ekstrakciją soksleto aparatu, mėginiai buvo paruošti naudojant metanolį. Gauti rezultatai rodo, kad skirtingi ekstrakcijos metodai atsižvelgiant į flavonoidų glikozidų išeigos rezultatus statistiškai reikšmingo skirtumo nerodo [42].

1.6.2. Fenolinių junginių kiekybinis ir kokybinis nustatymas

Fenolinių junginių kiekybiniam ir kokybiniam nustatymui yra naudojama:

- efektyvioji skysčių chromatografija
- dujų chromatografija
- plonasluoksnė chromatografija

Efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodas naudojamas nuo 1964 metų. Tai vienas efektyviausių ir dažniausiai naudojamų metodų tiek kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui. Dažniausiai dviskiaučių ginkmedžių lapų fenoliniams junginiams atskirti taikoma atvirkštinių periodų chromatografija, skirstymui naudojamos trumpos ir siauros C18 silikagelio kolonėlės. Fenolinių junginių atskyrimui gali būti taikoma tiek gradientinė eliucija, tiek naudojamos izokratinės sąlygos. Mokslininkas S. Ding ir kt. identifikavo 70 ginkmedžių lapuose esančių fenolinių junginių naudojant gradientinę eliuciją: 90%(0,1% acto rūgštis vandenyje) pervedant į 98% (acetonitrilas-metanolis (1:1)) 125 min, tėkmės greitis - 4μl/min. X. Zhu ir kt. nustatymui taip pat naudojo gradientinę eliuciją: sudarytą iš 0,5% fosfatinio buferio ir metanolio (48:52), tėkmės greitį - 0,2 ml/min ir UV detekcija (λ = 360 nm). Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad dažniausiai, kaip organiniai tirpikliai naudojami metanolis ar acetonitrilas, nes pasižymi geresne rezoliucija per trumpesnį laiko tarpą, bei ryškesnėmis

smailių formomis ir lygesniu jų išsibarstymu [3, 46].

Dujų chromatografija (DC) flavonoidų analizei pirmą kartą naudota 1960m. Flavonoidų analizę pradėjus taikyti ESC dujų chromatografija naudojama rečiau. DC skirstymo metodas pagrįstas skirtingų dujinės fazės sudedamųjų dalių adsorbcija ant sorbento paviršiaus vykstantis kolonėlėje. Pastaruoju metu dažniausiai naudojamas masių spektrometrinis detektorius, kurio pagalba identifikuojamos itin mažos biologiškai aktyvių junginių koncentracijos. *Ginkgo biloba* L. lapuose esantys fenoliniai junginiai identifikuojami ir įvertinami naudojant DC metodą, bet pirmiausia prieš atliekant analizę reikia atlikti keletą etapų. Pirmiausia atliekama fenolinių junginių hidrolizė ir sonifikacija ir silinimas, kurio metu susidaro lakūs, mažesnio poliškumo ir termostabilūs junginiai. Paruošti junginiai įvedami į nepolinę kolonėlę, junginiai atskiriami naudojant 300°C temperatūrą, geresnį junginių atsiskyrimą sąlygoja MS detektorius, kuris taip pat sutrumpina metodikos laiką. Naudojant DC chromatografiją nelakiųjų junginių tyrimui vis dar išlieka sudėtingas, todėl dėl *Ginkgo biloba* L. fenolinių junginių nustatymui dažniausiai pasirenkamas kitas metodas, nereikalaujantis papildomo cheminio junginių apdorojimo [13, 46].

Plonasluoksnės chromatografijos (PC) metodas naudojamas nuo 1958 metų [2]. Šis metodas yra skysčių chromatografijos atmaina, kai nejudančioji faze yra chromatografinę plokštelę dengiantis sorbento sluoksnis. PC metodo pritaikymo galimybės: naudojama organinių ir bioorganinių junginių atskyrimui bei identifikavimui, taip pat jų valymui iš biologinių skysčių, vaistinių preparatų. PC metodas yra greitas, paprastas, selektyvus, tikslus, pigus bei plačiai taikomas fenolinių junginių nustatymui augalinėse žaliavose. Plonasluoksnės chromatografijos privalumai lyginant su kitais metodais (pvz., ESC ir DC), tyrimams nereikalinga brangi aparatūra, platus sorbentų ir tirpiklių pasirinkimas [20, 26, 46]. Kadangi ginkmedžių lapuose randami fenoliniai junginiai pasižymi tiek polinėmis tiek ir nepolinėmis savybėmis, reikalinga tirpiklių sistema su analogiškomis savybėmis. Labai metilinti ar acetilinti flavonai ir flavonoliai reikalauja nepolinių tirpiklių, tokių kaip chloroformo - metanolio mišinys (15:1). *Ginkgo biloba L.* lapuose sutinkamų flavonoidų aglikonų atskyrimui naudojamas chloroformo - metanolio (96:4) mišinys, arba į juos panašaus poliškumo tirpikliai. Plačiai naudojama Europos Farmakopėjos straipsnyje dviskiaučių ginkmedžių lapų biologiškai aktyvių junginių kokybiniam identifikavimui naudojama tirpiklių sistema, kurią sudaro etilo acetatas, skrusdžių rūgštis, acto rūgštis ir vanduo [5, 17 29]. Ši sistema dažniausiai naudojama dėl skirtingo poliškumo reagentų, todėl tinka tiek fenolinių rūgščių, tiek flavonoidų atskyrimui. Chloroformo, acetono, skruzdžių rūgšties sistema, tinka *Ginkgo biloba L.* biflavonoidų nustatymui, o tolueno ir acetono sistema (70:30) – flavan-3-olių nustatymui [46]. Taip pat biologiškai aktyvius junginius atskyrus PC metodu galima atlikti ir kiekybinį įvertinimą. Yra trys metodai, vienas jų tai – vizualinis įvertinimas, kuris yra labai netikslus ir šiomis dienomis beveik nenaudojamas. Daug tikslesnis, bet užimantis daugiau laiko tai – chromatografinės zonos nugramdymas nuo sorbento ir jos koncentracijos

apskaičiavimas įvairiais metodais. Nuogramdos perkeliamos į indą ir užpilamos tuo pačiu ekstrakcijai naudotu tirpikliu, maišoma kol visiškai ištirpsta analitė, sorbentas pašalinamas centrifūguojant arba filtruojant pro membraninį filtrą. Šio metodo trūkumai: sunku užtikrinti visišką chromatografinės zonos pašalinimą nuo sorbento ir galimo užteršimo su kitoje zonoje esančiais junginiais, dėl šių trūkumų densitometrija tapo populiariausiu, tiksliausiu ir patikimiausiu PC metodu [37].

2. TYRIMO METODIKA

2.1. Tyrimo objektas

Tyrimo objektas - dviskiaučių ginkmedžių (*Ginkgo biloba* L.) lapai, surinkti 2014- 2015 metais. Augalo lapai rinkti birželio - spalio mėnesiais (25-30 dienomis).

Šis laikotarpis pasirinktas norint įvertinti identifikuotų veikliųjų junginių kiekybinius skirtumus, skirtingais vegetacijos periodais. Lapų mėginių rinkimas atliktas remiantis anksčiau Lenkijoje atliktais tyrimais [18, 19].

Fenolinių junginių sudėties dinamikos kitimo tyrimams naudoti ėminiai, rinkti iš dviejų Lietuvos augaviečių. *Ginkgo biloba* L. lapai buvo renkami Šiaulių ir Klaipėdos botanikos sodų. Surinkti lapai buvo džiovinami 30-40°C temperatūroje, pilami į atskirus tamsaus stiklo buteliukus ir laikomi apsaugant nuo šviesos ir drėgmės.

2.2. Naudoti reagentai

Dviskiaučių ginkmedžių lapuose esančių junginių analizei buvo naudojami analitinio švarumo reagentai:

1. Skruzdžių (98-100%) rūgštis (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Vokietija);
2. Bevandenė acto rūgštis(Sigma-Aldrich, Scnelldorf, Vokietija);
3. Etilacetatas (Sigma-Aldrich, Toluca, Meksika);
4. Metanolis (>99,9%, Sigma-Aldrich, Seelze, Vokietija);
5. Tirpiklių sistemoje naudojamas vanduo buvo pagamintas naudojant „Milipore“ (JAV) vandens gryninimo sistemą;
6. Analizėje naudojami rutino (97,11%), izokvercitrino (94,14%) standartai buvo gauti iš HWI ANALYTIK GMBH (Schnelldorf ,Vokietija), kvercitrinas (98,5%) (Extrasynthese, Prancūzija) , astragalinas((>97%) Sigma-Aldrich, Scnelldorf, Vokietija).
7. 2-aminoetildifenilborinatas (≥97%) gautas iš Fluka analytical (Schnelldorf, Vokietija)
8. Polietileno glikolis 400 (Fluka BioChemika, Bornem, Belgija).

2.3. Naudota aparatūra ir priemonės

1. Analitinės svarstyklės (Shimadzu Auw 120 D, Bellingen, Vokietija)
2. Elektrinis malūnas (IKA A11 basic , Vokietija);
3. Automatinės pipetės (Eppendorf Research, Eppendorf, JAV)
4. Q-Max membraninis filtras (25 mm diametro, 0,45 µm dydžio poros, Frisenette, Knebel, Vokietija);
5. Mikrošvirkštas (100 µl; Camag Linomat Syringe, Muttenz, Šveicarija);
6. Termostatinė vonelė (WiseClean,Korėja)
7. 10 cm aukščio ir 10 cm pločio stiklo plokštelės (silikagelis $60F_{254}$; Merck, Vokietija)
8. Stiklinė, efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos kamera su metaliniu dangčiu (Camag, Muttenz, Šveicarija)
9. Pusiau automatinis mėginių užnešėjas Camag Linomat 5(Camag, Muttenz, Šveicarija);
10. Plonasluoksnės chromatografijos vizualizatorius (Camag, Muttenz, Šveicarija).
11. Elektrinė kaitlentė (Camag, TLC Plate Heater III, Šveicarija).

2.4. Tyrimų metodai

2.4.1. Tiriamojo mėginio paruošimas

Ekstrakcija atlikta remiantis Europos farmakopėjos 01/2008:1828 straipsnyje nurodytu metodu [5].

Išdžiovinti dviskiaučių ginkmedžių lapai susmulkinti elektriniu malūnėliu į miltelius ir atsverti po 2 g (±0,01 g). Į kaitinimui skirtą buteliuką supiltas atsvertas miltelių kiekis, kuris užpiltas 10 ml (±0,01 ml) metanoliu. Buteliuko turinys suplaktas, kad ekstrahentas gerai pasiskirstytų tarp vaistinės žaliavos miltelių dalelių. Ekstrakcija atlikta termostatinėje vonelėje 10 min, palaikant pastovią 65°C temperatūrą. Praėjus kaitinimui skirtam laikui, buteliukas išimtas, supurtytas ir atvėsintas kambario temperatūroje. Filtruota pro metanoliu sudrėkintą membraninį filtrą. Ekstraktai išpilstyti į švarius, tamsaus stiklo indus, kurie sandariai užkimšti ir laikyti tamsioje ir vėsioje vietoje, apsaugant nuo galimo fenolinių junginių degradacijos produktų susidarymo [5].

2.4.2. Etaloninių tirpalų paruošimas ir kalibracinių kreivių sudarymas

Atsverti standartai ištirpinti 10 ml metanolyje, iš gautų etaloninių tirpalų skiedimo principu paruošti skirtingų koncentracijų metanoliniai tirpalai. Paimant po 2 ml pradinio standartinio tirpalo, pilant į skirtingas kolbutes ir skiedžiant 2 ml 70 proc. metanoliu.

Kalibracinių kreivių koncentracijų ribos:

Rutino koncentracijos ribos 0,125 – 0,625 mg/ml;

Izokvercitrino koncentracijos ribos 0,05 – 0,275 mg/ml;

Kvercitrino koncentracijos ribos 0,195 – 0,455 mg/ml.

2.4.3. Flavonoidų kokybinis ir kiekybinis įvertinimas efektyviąja plonasluoksne chromatografija

Flavonoidų identifkavimui pasirinkta naudoti plonasluoksnės chromatografijos analizės metodika, atitinkanti Europos farmakopėjos 01/2008:1828 straipsnį [5].

1. Pagaminti standartiniai metanoliniai rutino, izokvercitrino, astragalino ir kvercitrino tirpalai bei tiriamieji dviskiaučių ginkmedžių ekstraktų mėginiai užnešami ant silikageliu dengtos chromatografinės plokštelės, naudojant pusiau automatinį mėginių užnešėją *Camag Linomat 5* su 100µl tūrio mikrošvirktu, plokštelėje paliekančiu brūkšnio pavidalo dėmę.
2. Metanoliui nugaravus, plokštelės perkeltos į chromatografavimo kamerą, kurioje buvo supilta judri fazė, sudaryta iš: skruzdžių rūgšties, acto rūgšties, vandens ir etilacetato (7,5:7,5:17,5:67,5V/V/V/V) į kurią kartu įdėtas ir filtrinio popieriaus lakštas, siekiant užtikrinti tolygų garų pasiskirstymą chromatografavimo kameroje.
3. Tirpikliui pakilus 7 cm nuo starto linijos (ji pažymima 2,5 cm nuo plokštelės apačios) plokštelė ištraukiama ir džiovinama ant elektrinės kaitlentės esant 100-105°C temperatūrai.
4. Po kaitinimo plokštelės ryškintos su šviežiai pagamintu 10 g/l 2-aminoetildifenilborinato tirpalu metanolyje. Nudžiovinus prieš tai minėtą ryškinimo reagentą, plokštelė apipurškiama 50 g/l polietileno glikolio (PEG) 4000 tirpalu metanolyje. Pastarojo reagento naudojimo tikslas - stabilizuoti šviesos emisiją ir sustiprinti dėmių fluorescenciją, po apipurškimo 2-aminoetildifenilborinato tirpalu [51].

5. Užpurškus ryškinimo reagentus chromatografinės plokštelės išdžiovinamos ore. Išdžiovintos plokštelės apšviestos 366 nm bangos ilgio ultravioletine šviesa. Tiriamųjų junginių $R_f$reikšmės nustatytos vizualizatoriaus ir *Win-Cats*programinės įrangos pagalba.

6. Kiekybinis flavonoidų įvertinimas atliktas naudojant kalibracines kreives, kurios sudarytos naudojant identifikuotai analitei tapataus standarto skiedimus. Kiekybiniam biologiškai aktyvių junginių nustatymui naudotas *Camag* vizualizatorius kartu su *Win-Cats 1.4.9* programa, apdorojančią duomenis ir *VideoScan* programa, kuri geba atlikti kiekybinę gaunamų chromatogramų analizę.

2.5. Duomenų statistinis įvertinimas

Duomenų statistinis įvertinimas atliktas naudojant „Microsoft Office Excel 2007“ (Microsoft, JAV) ir „IBM SPSS statistics 20“ (IBM, JAV) statistines duomenų programas. Kiekybinis įvertinimas atliktas *Camag Videoscan* programine įranga, o Rf rodikliai nustatyti Camag *winCats* programinės įrangos pagalba. Rezultatų statistinis patikimumas įvertintas taikant vienfaktorę dispersinę analizę – ANOVA. Statistiškai reikšmingas skirtumas nustatytas jei $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Flavonoidų identifikavimas efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodu

Atlikus literatūros šaltinių analizę, pasirinkta analizuoti keturis flavonoidus, kurie pagal anksčiau atliktus PC tyrimus yra identifikuojami ginkmedžių augalinėje žaliavoje [16,34]. Analizė buvo atliekama naudojant efektyviąją plonasluoksnę chromatografiją, kuri pasižymi didesniu jautrumu ir efektyvumu, lyginant ją su plonasluoksne chromatografija.

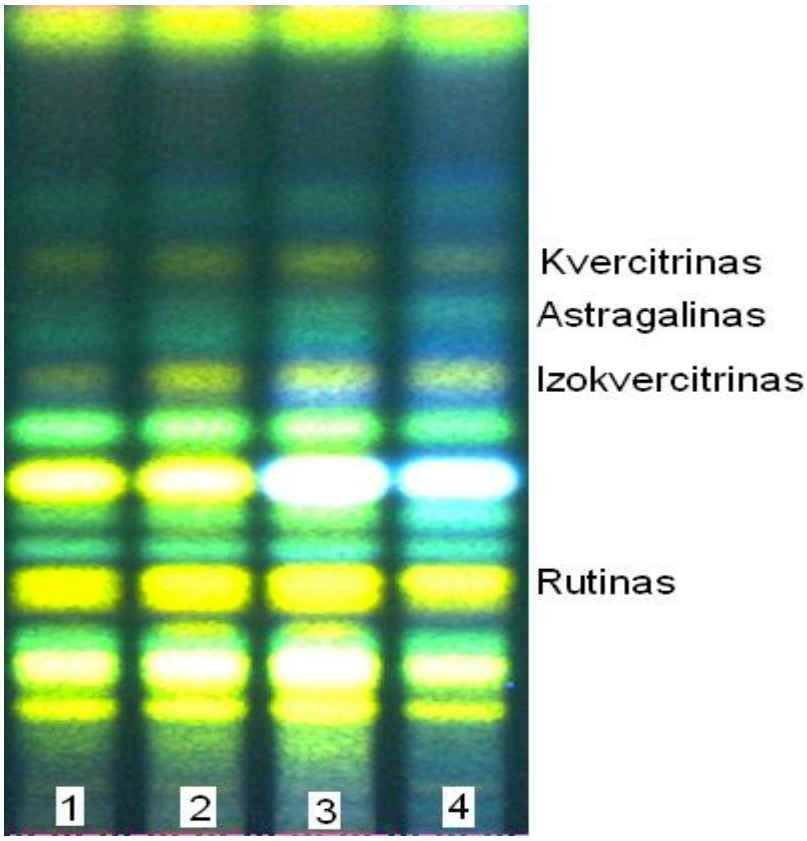
Pirmiausiai kokybinis tyrimas atliekamas su standartiniais rutino, izokvercitrino, kvercitrino ir astragalino tirpalais, siekiant išsiaiškinti ar veiklieji junginiai yra atskiriami vieni nuo kitų ir nemaišo jų, kaip atskirų komponenčių identifikavimui. Atlikus tyrimus nustatyta, kad biologiškai aktyvūs junginiai vienas kito kokybiniam įvertinimui įtakos neturi, toliau analizės atliekamos su metanoliniais dviskiaučių ginkmedžių ekstraktais. EPC tyrimams naudota Klaipėdos ir Šiaulių universiteto botanikos soduose surinkti dviskiaučių ginkmedžių lapai rinkti skirtingais vegetacijos periodais 2014 ir 2015 metais. Tyrimų metu pagaminti lapų metanoliniai ekstraktai lyginami su standartiniais rutino, izokvercitrino, kvercitrino ir astragalino tirpalais. Analizuoti mėginiai (n=10) iš Klaipėdos botanikos sodo ir mėginiai iš Šiaulių botanikos sodo (n=9). 2014 metais Šiaulių mėginių buvo surinkta mažiau, dėl to, kad birželio mėnesį negauta lapų ėminių.

Atlikus kokybinę analizę dviskiaučių ginkmedžių augalinėje žaliavoje pavyko identifikuoti keturis pasirinktus flavonoidus: astragaliną, rutiną, izokvercitriną ir kvercitriną. Šie flavonoidai nustatyti visuose analizuotuose lapų ekstraktuose, Rf reikšmės ir standartinis nuokrypis pateikiamas 1 lentelėje.

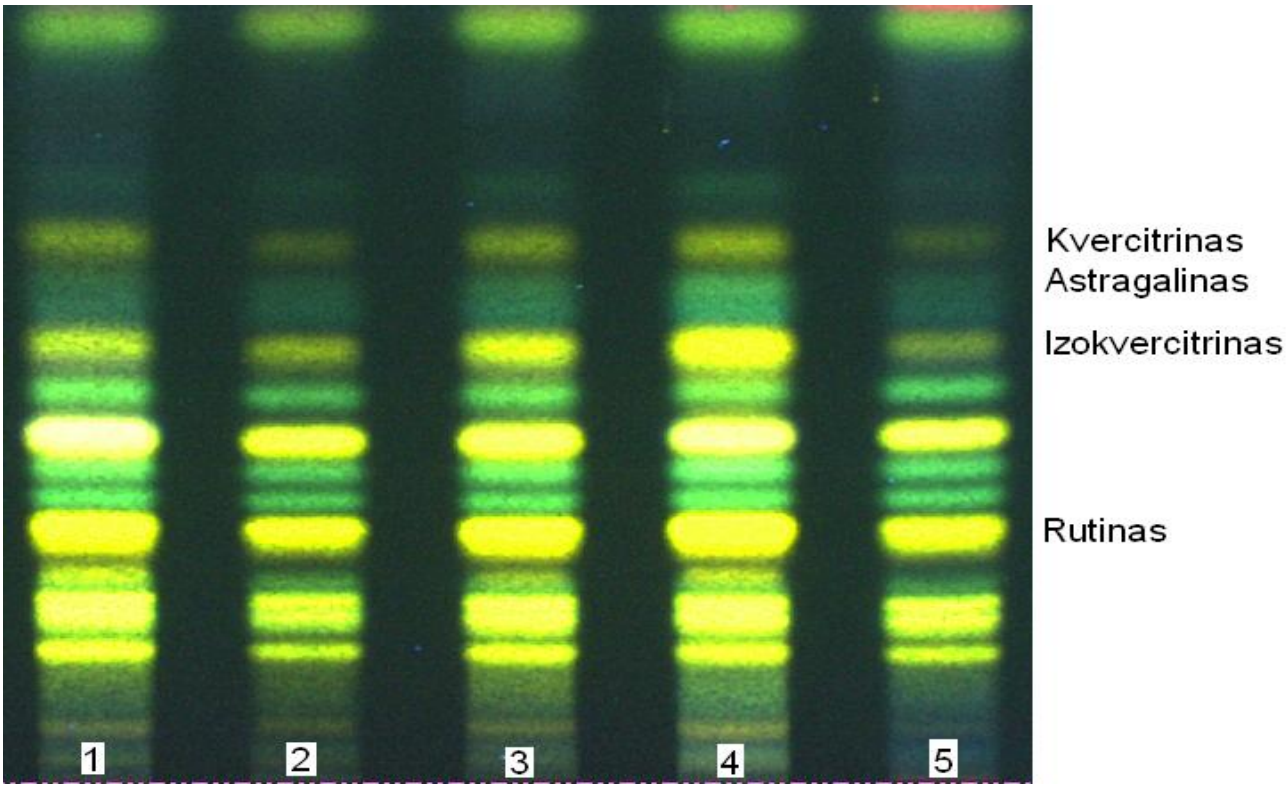
Lentelė 1. Standartinių tirpalų ir mėginių veikliųjų junginių Rf sulaikymo rodiklių vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai, (n=3)

Flavonoidai	Standartinių tirpalų Rf	Rf reikšmių standartiniai nuokrypiai	Metanolinių Ekstraktų Rf	Rf reikšmių standartiniai nuokrypiai
Rutinas	0,316	0,01	0,314	0,03
Izokvercitrinas	0,517	0,02	0,516	0,02
Astragalinas	0,651	0,01	0,649	0,03
Kvercitrinas	0,712	0,03	0,710	0,02

Skirtingų vegetacinių fazių, bei skirtingų rinkimo vietų, metanolinių ginkmedžių lapų ekstraktų chromatogramos pateikiamos 9 ir 10 pav.



9 pav. 2014m. Šiaulių apskrities Ginko biloba L. lapų mėginių chromatograma, skirtingu lapų rinkimo laikotarpiu, 1-Liepa, 2-Rugpjūtis, 3-Rugsėjis, 4-spalis.

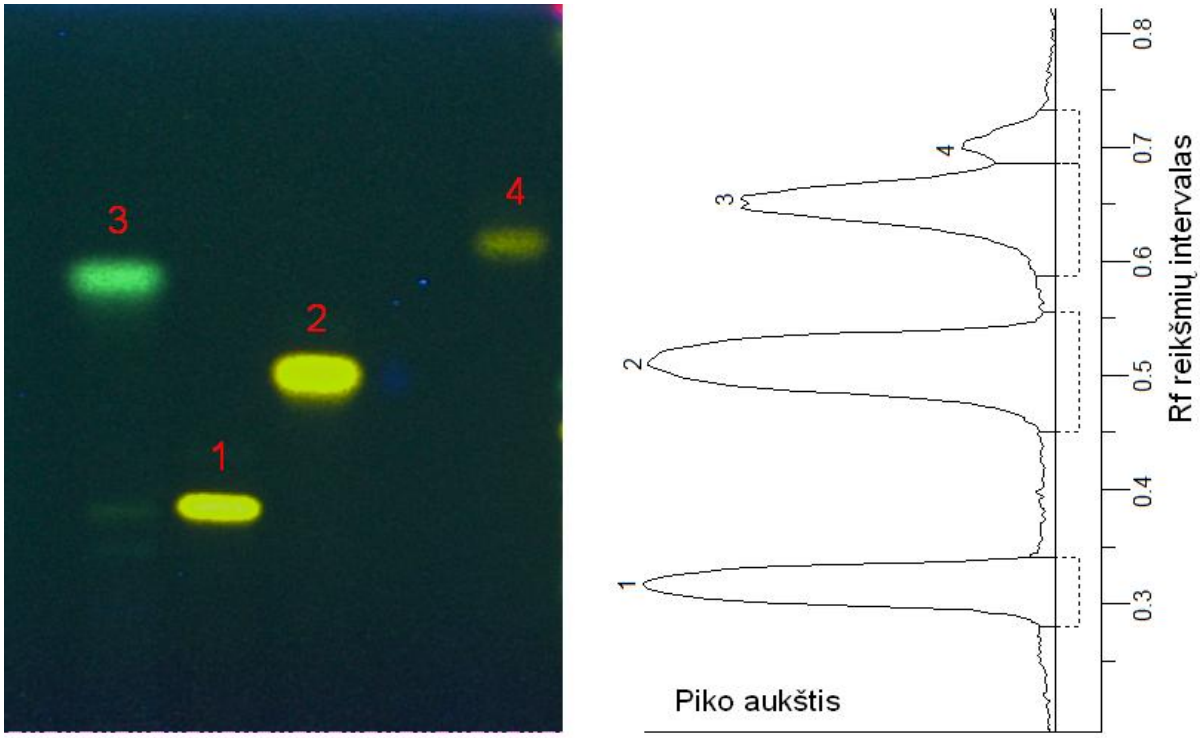


10 pav. 2015 m. Klaipėdos apskrities Ginko biloba L. lapų mėginių chromatograma, skirtingu lapų rinkimo laikotarpiu, 1-Birželis, 2-Liepa, 3-Rugpjūtis, 4-Rugsėjis, 5-Spalis.

3.2 Flavonoidų kiekybinis ivertinimas efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodu

Siekiant įvertinti identifikuotų flavonoidų kiekybinę sudėtį, bei palyginti sudėties įvairavimą skirtingu dviskiaučių ginkmedžių vegetaciniu periodu buvo sudarytos atskirų komponenčių kalibracinės kreivės. Astragalinui kiekybinė analizė netaikyta, dėl to, kad šalia esantis neidentifikuotas junginys trukdo tiksliam kiekiniam įvertinimui. Tarp kai kurių ginkmedžių lapų metanolinių ekstraktų, astragalino ir nežinomojo junginio dėmių, matomas jų persiklojimas, kas turi įtakos tikslių duomenų gavimui. Dėl šios priežasties sudarytos trijų žinomų junginių rutino, kvercitrino ir izokvercitrino kalibracinės kreivės.

Kalibracinės kreivės sudaromos iš atskirų standartinių tirpalų skiedimų, užpurškiant po 1µl skirtingų tirpalų koncentracijas ant chromatografinių plokštelių. Po EPC chromatografijos ir ryškinimo plokštelė nufotografuojama *Camag* vizualizacine sistema, naudojant 366 nm šviesos absorbcinį filtrą. Kreivių sudarymas paremtos šviesos absorbcijos smailės ploto priklausomybe nuo analizuojamo junginio koncentracijos (mg/ml). Atskirų standartinių junginių EPC chromatograma ir analičių smailės pateikiamos 11 pav.



11 pav. Standartinių tirpalų chromatograma su analičių smailėmis, kurios sudaromos Camag vizualizacinės sistemos pagalba

Kiekybiniai skaičiavimai atlikti pagal kalibracinių kreivių sudarytas matematines lygtis, lygtys pateikiamos 2 lentelėje.

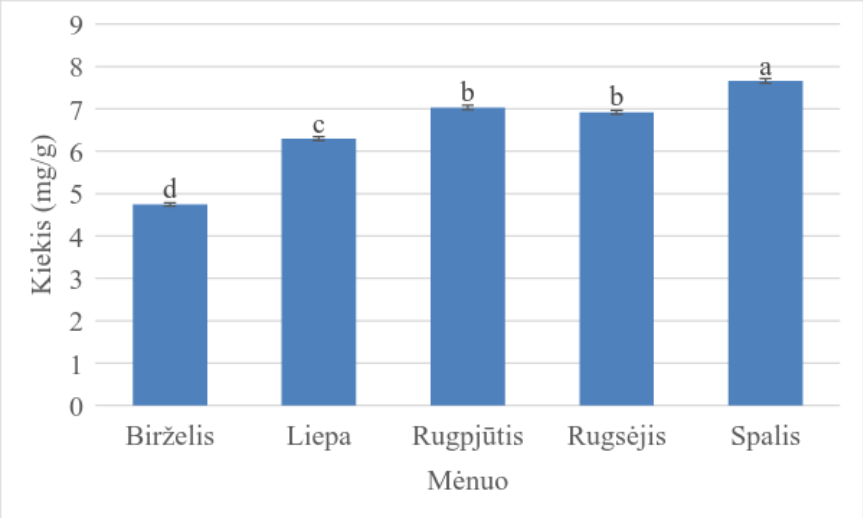
2 lentelė. Standartinių junginių kalibracinės lygtys.

Standartiniai junginiai	Lygtis
Rutinas	$Y= 5,33*10^3+1,63*10^5x$
Izokvercitrinas	$Y= -8,57*10^3+2,91*10^5x$
Kvercitrinas	$Y= -5,93*104+4,16*10^5x$

Apibendrinant dviskiaučių ginkmedžių lapų mėginių kokybinio įvertinimo tyrimus galima daryti išvadą, kad lapų ėminiuose yra rutino, izokvercitrino, kvercitrino ir astragalino. Šie flavonoidai nustatyti visuose analizuojamuose metanoliniuose mėginiuose. Vienintelis trūkumas, kuris apsunkina kiekybinį veikliųjų junginių įvertinimą yra astragalino sąlyginai nedidelės koncentracijos, bei šalia jo esantis junginys. Šis nežinomas junginys trukdo tiksliai įvertinti astragalino kiekį, nes jie yra tos pačios žalsvos spalvos ir jų Rf rodikliai yra labai panašūs. Kai kuriuose mėginiuose astragalino dėmės persikloja su neidentifikuotu junginiu, todėl buvo nuspręsta astragalino nevertintinti kiekybiškai.

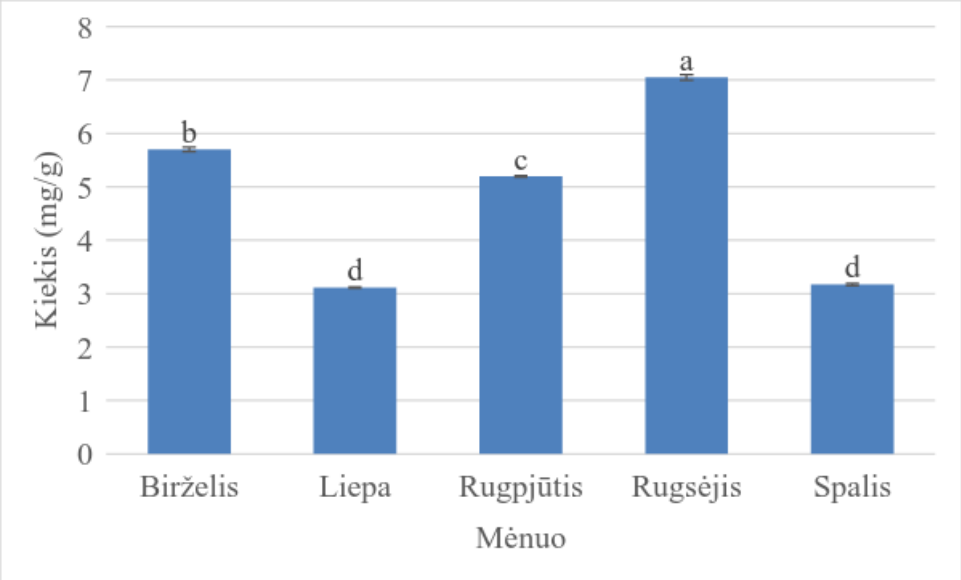
3.3. Rutino kiekio kitimas dviskiaučių ginkmedžių lapuose augalų vegetacijos metu

Atlikus 2014 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių analizę efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodu, nustatyta, kad rutino kiekis įvairuoja nuo 4,744 mg/g iki 7,661 mg/g. Mažiausias kiekis rutino (4,744±0,034 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose birželio mėnesį. Vegetacijos periodo metu rutino kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. Didžiausias kiekis rutino (7,661±0,055 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose spalio mėnesį (12 pav.).



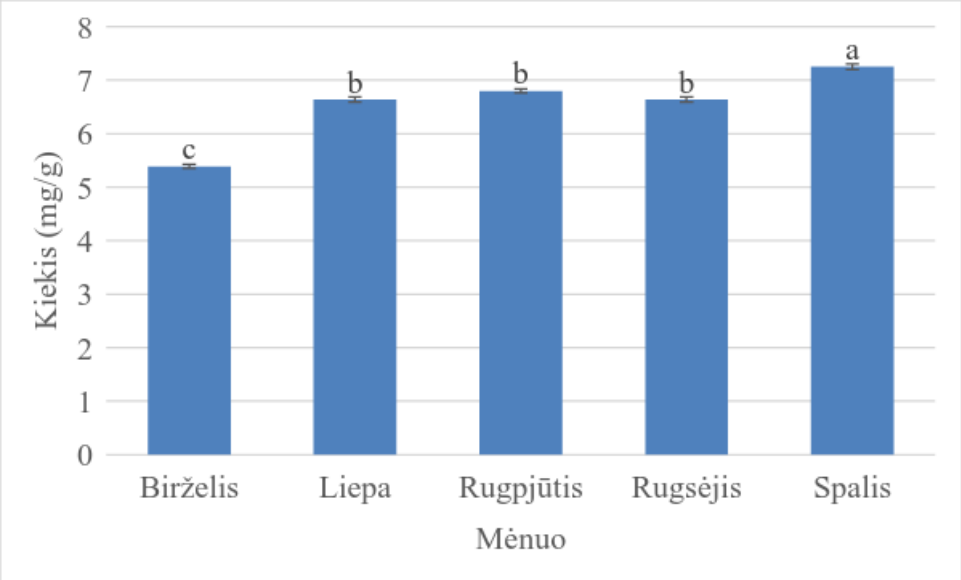
12 pav. Rutino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2014 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode (skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05)

Atlikus 2015 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad rutino kiekis kinta nuo 3,114 mg/g iki 7,050 mg/g. Birželio mėnesį surinktuose lapų ėminiuose nustatyta 5,700±0,041 mg/g rutino. Lapams vystantis rutino kiekis sumažėjo ir liepos mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose rutino nustatyta 3,114±0,009 mg/g. Nuo liepos mėnesio rutino kiekis ginkmedžių lapuose didėjo. Rugsėjo mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose nustatytas didžiausias ($p<0,05$) kiekis rutino (7,050±0,051mg/g). Spalio mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose rutino kiekis (3,172±0,023 mg/g) buvo 2,2 karto mažesnis už rutino kiekį, nustatytą rugsėjo mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose. Liepos ir spalio mėnesiais surinktuose lapuose nustatytas mažiausias rutino kiekis ($p<0,05$) (13 pav.).



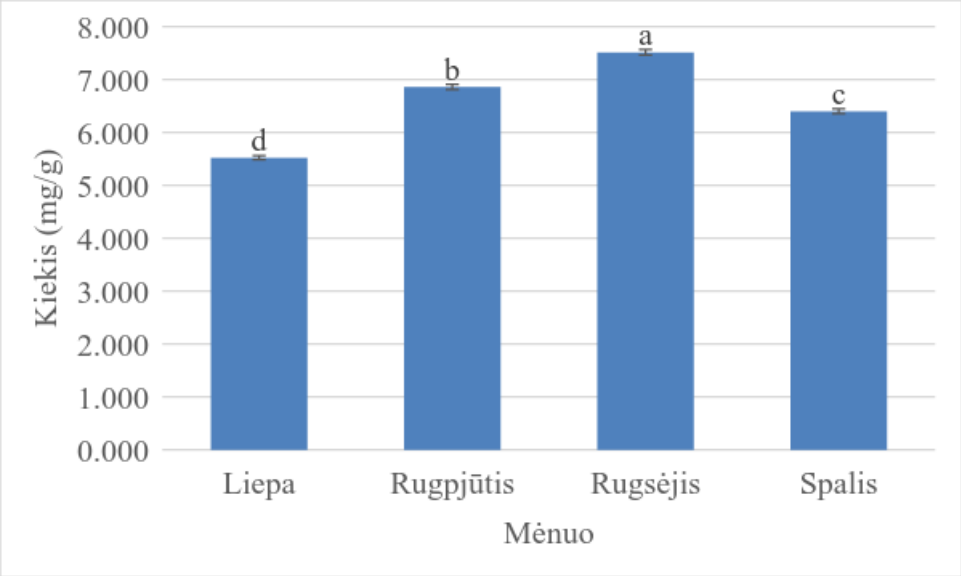
13 pav. Rutino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2015 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode (skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05)

Atlikus 2014 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad rutino kiekis kinta nuo 5,391 mg/g iki 7,253 mg/g. Mažiausias kiekis rutino (5,391±0,039 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose birželio mėnesį. Vegetacijos periodo metu rutino kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. Didžiausias kiekis rutino (7,253±0,052 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose spalio mėnesį (14 pav.).



14 pav. Rutino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2014 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode(skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05)

Atlikus 2015 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad rutino kiekis kinta nuo 5,254 mg/g iki 7,515 mg/g. Mažiausias kiekis rutino (5,524±0,040 mg/g, p<0,05) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose liepos mėnesį. Vegetacijos periodo metu rutino kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. Rugsėjo mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose nustatytas didžiausias (p<0,05) kiekis rutino (7,515±0,054mg/g). Spalio mėnesį surinktuose lapų ėminiuose nustatytas mažesnis (p<0,05) rutino kiekis (6,400±0,046 mg/g) (15 pav.).

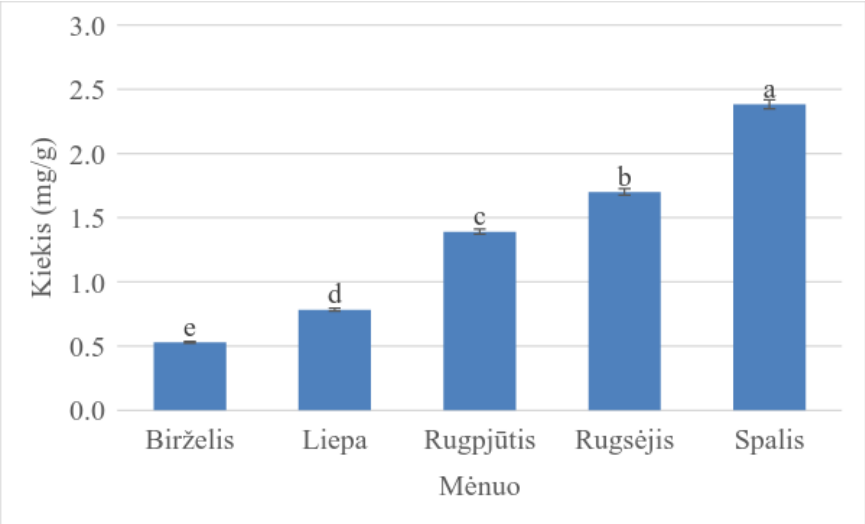


15 pav. Rutino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2015 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode(skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05)

Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad rutino kiekio kitimo tendencija nustatyta ištyrus Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių ėminių flavonoidų kiekinę sudėtį atitinka rutino kiekio dinamikos dėsningumus, nustatytus ištyrus Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktų ginkmedžių lapų ėminius. Rutino kiekio dinamika ginkmedžių lapuose vegetacijos metu skirtingais metais skyrėsi. 2014 m. vegetacijos periodo metu rutino kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. 2015 m. vegetacijos periodo metu lapams vystantis rutino kiekis sumažėjo ir liepos mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose rutino nustatytas mažiausias kiekis. Nuo liepos mėnesio rutino kiekis ginkmedžių lapuose didėjo iki rugsėjo mėnesio, o vegetacijos periodo pabaigoje sumažėjo. Palyginus duomenis su kitų mokslininkų, galima teigti, kad jie skiriasi. Lobstein ir kt. nustatė, kad rutino kiekis vegetacijos periodo metu mažėja ir padidėja tik lapams pradėjus kristi [32]. Skiriasi ir nustatytas rutino kiekis. Šių mokslininkų atlikto tyrimo metu nustatytas mažesnis rutino kiekis (0,933-2,598 mg/g) nei mūsų tyrimo metu.

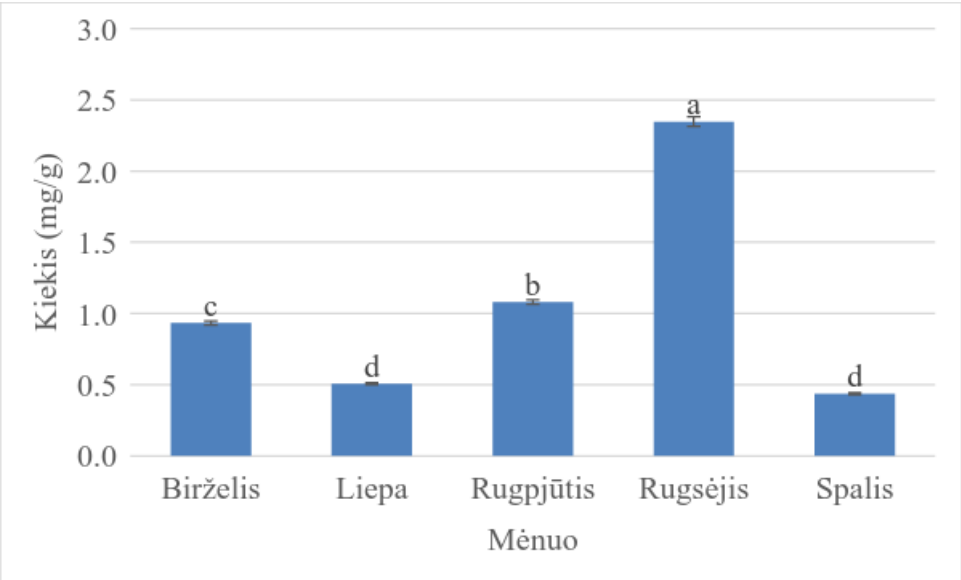
3.4. Izokvercitrino kiekio kitimas dviskiaučių ginkmedžių lapuose augalų vegetacijos metu

Atlikus 2014 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių analizę efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodu, nustatyta, kad izokvercitrino kiekis įvairuoja nuo 0,528 mg/g iki 2,383 mg/g. Mažiausias kiekis izokvercitrino (0,528±0,008 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose birželio mėnesį. Vegetacijos periodo metu izokvercitrino kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. Didžiausias kiekis izokvercitrino (2,383±0,034 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose spalio mėnesį (16 pav.).



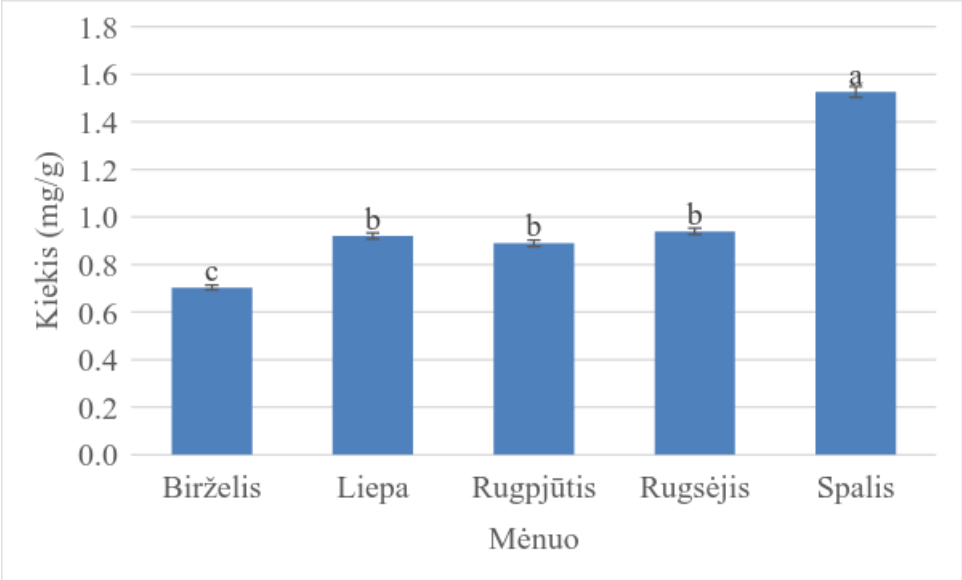
16 pav. Izokvercitrino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2014 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode (skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05)

Atlikus 2015 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad izokvercitrino kiekis kinta nuo 0,437 mg/g iki 2,348 mg/g. Birželio mėnesį surinktuose lapų ėminiuose nustatyta 0,933±0,013 mg/g izokvercitrino. Lapams vystantis izokvercitrino kiekis sumažėjo ir liepos mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose izokvercitrino nustatyta 0,506±0,009 mg/g. Nuo liepos mėnesio izokvercitrino kiekis ginkmedžių lapuose didėjo. Rugsėjo mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose nustatytas didžiausias ($p<0,05$) kiekis izokvercitrino (2,348±0,034 mg/g). Spalio mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose izokvercitrino kiekis (0,437±0,023 mg/g) buvo 5,4 karto mažesnis už izokvercitrino kiekį, nustatytą rugsėjo mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose. Liepos ir spalio mėnesiais surinktuose lapuose nustatytas mažiausias izokvercitrino kiekis ($p<0,05$) (17 pav.).



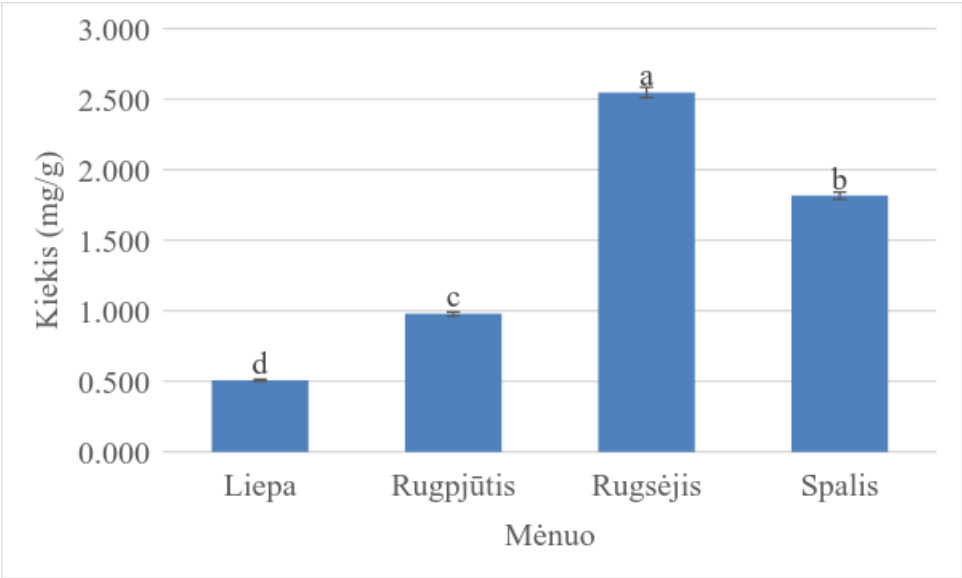
17 pav. Izokvercitrino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2015 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode(skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05)

Atlikus 2014 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad izokvercitrino kiekis kinta nuo 0,703 mg/g iki 1,526 mg/g. Mažiausias kiekis izokvercitrino (0,703±0,010 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose birželio mėnesį. Vegetacijos periodo metu izokvercitrino kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. Didžiausias kiekis izokvercitrino (1,526±0,022 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose spalio mėnesį (18 pav.).



18 pav. Izokvercitrino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2014 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode(skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05)

Atlikus 2015 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad izokvercitrino kiekis kinta nuo 0,508 mg/g iki 2,548 mg/g. Mažiausias kiekis izokvercitrino (0,508±0,007 mg/g, p<0,05) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose liepos mėnesį. Vegetacijos periodo metu izokvercitrino kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. Rugsėjo mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose nustatytas didžiausias (p<0,05) kiekis izokvercitrino (2,548±0,037mg/g). Spalio mėnesį surinktuose lapų ėminiuose nustatytas mažesnis (p<0,05) izokvercitrino kiekis (1,816±0,026 mg/g) (19 pav.).

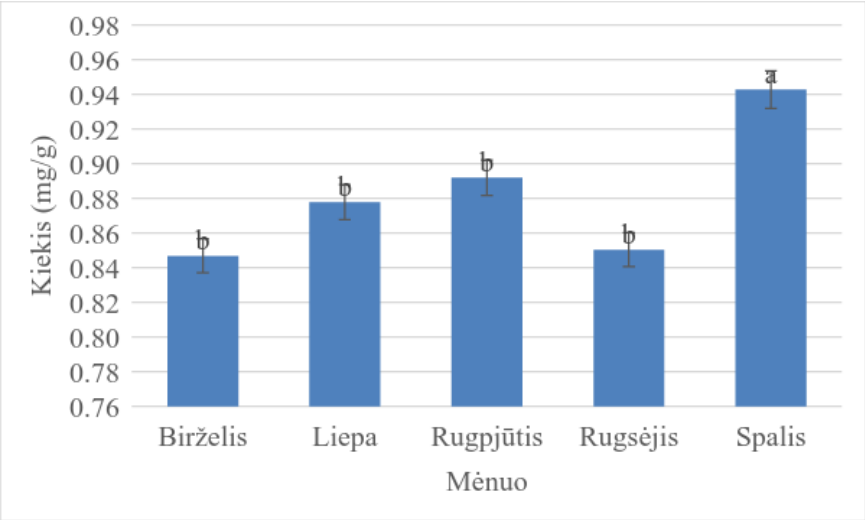


19 pav. Izokvercitrino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2015 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode (skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05)

Apibendrinus gautus tyrimų rezultatus, galima teigti, kad izokvercitrino kiekio kitimo dinamika ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose Šiaulių universiteto Botanikos sode, atitinka izokvercitrino kiekio kitimo dinamiką, nustatytą ištyrus Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktus ginkmedžių lapų ėminius. 2014 m. vegetacijos periodo metu izokvercitrino kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. 2015 m. vegetacijos periodo metu lapams vystantis izokvercitrino kiekis sumažėjo ir liepos mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose izokvercitrino nustatytas mažiausias kiekis. Nuo liepos mėnesio izokvercitrino kiekis ginkmedžių lapuose didėjo iki rugsėjo mėnesio, o vegetacijos periodo pabaigoje sumažėjo. Mūsų nustatytos izokvercitrino kiekio kitimo tendencijos priešingos nustatytoms kitų mokslininkų. Lobstein ir kt. nustatė, kad izokvercitrino kiekis vegetacijos periodo metu mažėja ir padidėja tik lapams pradėjus kristi [32]. Skiriasi ir nustatytas izokvercitrino kiekis. Šių mokslininkų atlikto tyrimo metu nustatytas izokvercitrino kiekis varijavo panašiame intervale (0,489-1,629 mg/g) mūsų atlikto tyrimo metu.

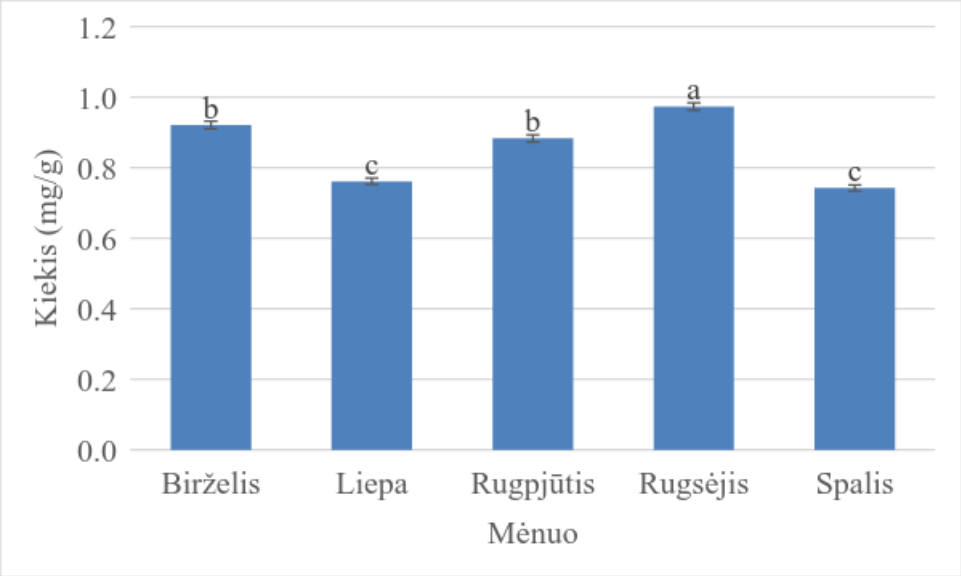
3.5. Kvercitrino kiekio kitimas dviskiaučių ginkmedžių lapuose augalų vegetacijos metu

Atlikus 2014 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių analizę efektyviosios plonasluoksnės chromatogafijos metodu, nustatyta, kad kvercitrino kiekis įvairuoja nuo 0,847 mg/g iki 0,943 mg/g. Birželio – rugsėjo mėnesiais surinktų ginkmedžių lapų ėminiuose kvercitrino kiekis įvairavo nuo 0,847 mg/ iki 0,892 mg/g, tačiau kiekinės sudėties skirtumai nėra statistiški reikšmingi ($p>0,05$). Didžiausias kiekis kvercitrino (0,943±0,011 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose spalio mėnesį (20 pav.).



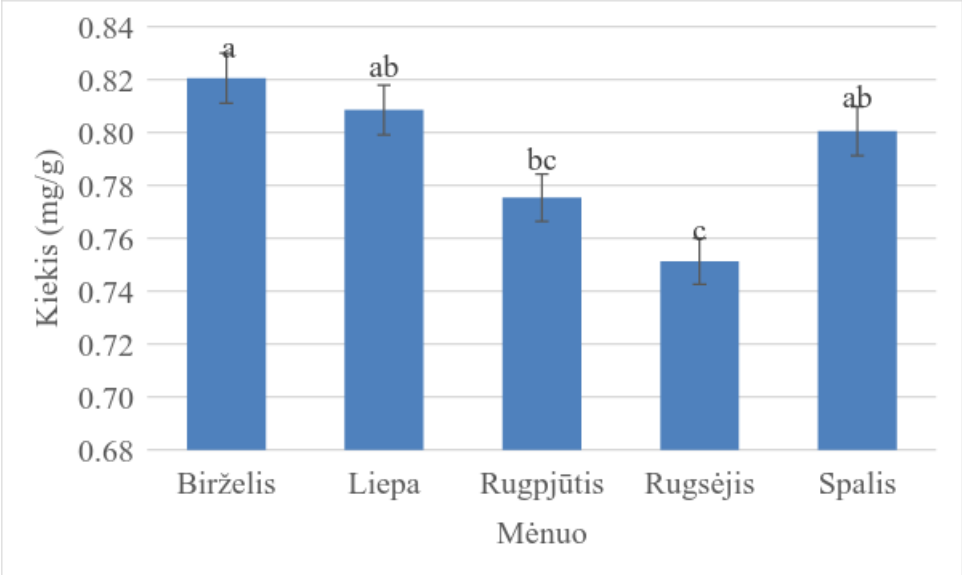
20 pav. Kvercitrino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2014 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode (skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05)

Atlikus 2015 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad kvercitrino kiekis kinta nuo 0,742 mg/g iki 0,742 mg/g. Birželio mėnesį surinktuose lapų ėminiuose nustatyta 0,921±0,011 mg/g kvercitrino. Lapams vystantis kvercitrino kiekis sumažėjo ir liepos mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose kvercitrino nustatyta 0,761±0,009 mg/g. Nuo liepos mėnesio kvercitrino kiekis ginkmedžių lapuose didėjo. Rugsėjo mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose nustatytas didžiausias ($p<0,05$) kiekis kvercitrino (0,973±0,011 mg/g). Spalio mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose nustatytas kvercitrino kiekis (0742±0,009 mg/g) mažesnis už kvercitrino kiekį, nustatytą rugsėjo mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose. Liepos ir spalio mėnesiais surinktuose lapuose nustatytas mažiausias kvercitrino kiekis ($p<0,05$) (21 pav.).



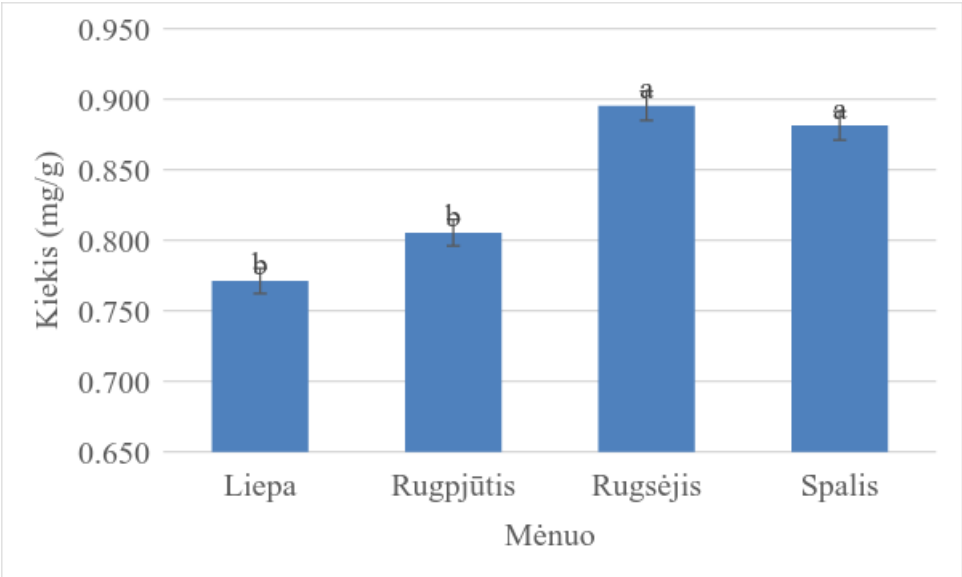
21 pav. Kvercitrino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2015 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode(skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05).

Atlikus 2014 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad kvercitrino kiekis kinta nuo 0,715 mg/g iki 0,8205 mg/g. Birželio mėnesį surinktuose ginkmedžių lapuose nustatyta 0,821±0,01mg/g. Vegetacijos periodo metu kvercitrino kiekis ginkmedžių lapuose mažėjo iki rugsėjo mėnesio. Rugsėjį surinktuose lapų ėminiuose nustatyta 0,751±0,01mg/g kvercitrino. Vegetacijos pabaigoje kvercitrino kiekis padidėjo ir spalio mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose nustatyta 0,801±0,01 mg/g kvercitrino (22 pav.).



22 pav. Kvercitrino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2014 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode(skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05).

Atlikus 2015 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad kvercitrino kiekis kinta nuo 0,771 mg/g iki 0,895 mg/g. Kvercitrino kiekio kitimo dinamika ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2015 m. Mažiausias kiekis kvercitrino (0,771±0,009 mg/g, p<0,05) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose liepos mėnesį. Vegetacijos periodo metu kvercitrino kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. Rugsėjo ir spalio mėnesiais surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose nustatyti didžiausias (p<0,05) kiekiai kvercitrino (atitinkamai, 0,895±0,010 mg/g ir 0,881±0,010 mg/g) (23 pav.).

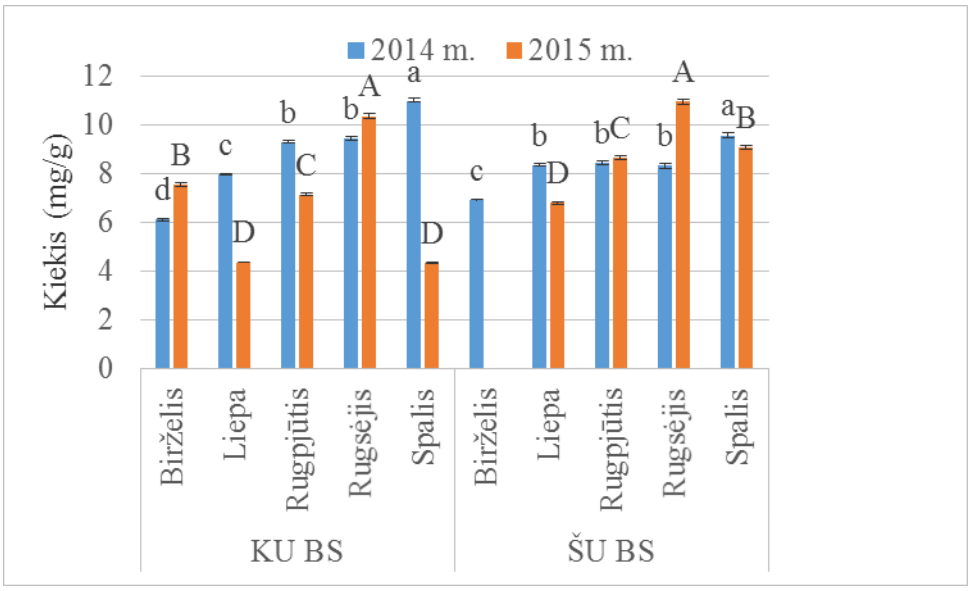


23 pav. Kvercitrino kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose 2015 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode(skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05).

Apibendrinus gautus duomenis, galima teigti, kad kvercitrino kiekio kitimo dinamika ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose Šiaulių universiteto Botanikos sode, atitinka kvercitrino kiekio kitimo dinamiką, nustatytą ištyrus 2015m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktus ginkmedžių lapų ėminius. 2015 m. vegetacijos periodo metu lapams vystantis kvercitrino kiekis sumažėjo ir liepos mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose kvercitrino nustatytas mažiausias kiekis. Nuo liepos mėnesio kvercitrino kiekis ginkmedžių lapuose didėjo iki rugsėjo mėnesio, o vegetacijos periodo pabaigoje sumažėjo. 2014 m. kvercitrino kiekis ginkmedžių, auginamų skirtingose vietose, lapuose vegetacijos eigoje kito skirtingai. Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapuose kvercitrino kiekis vegetacijos metu įvairavo, tačiau kiekinės sudėties skirtumai nebuvo statistiški reikšmingi ($p>0,05$). Vegetacijos pabaigoje kvercitrino kiekis padidėjo. Didžiausias kvercitrino kiekis nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose spalio mėnesį. 2014 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapuose kvercitrino kiekis vegetacijos periodo metu mažėjo iki rugsėjo mėnesio. Vegetacijos pabaigoje kvercitrino kiekis padidėjo.

3.6. Suminio flavonoidų kiekio kitimas dviskiaučių ginkmedžių lapuose augalų vegetacijos metu

Atlikus dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų sudėties analizę efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodu kvercetino glikozidai rutinas, izokvercitrinas ir kvercitrinas įvertinti kiekybiškai. Įvertintas suminis šių glikozidų kiekis ir jo įvairavimas vegetacijos periodo metu skirtingose augavietėse auginamų dviskiaučių ginkmedžių lapuose (24 pav.).



24 pav. Suminio flavonoidų kiekio įvairavimas vegetacijos metu ginkmedžių lapų ėminiuose(skirtingos raidės stulpeliuose rodo statistiškai reikšmingą skirtumą, kaip p<0,05; palyginimas atliktas kiekvienai augavietei ir kiekvienam vegetacijos periodui atskirai)

Atlikus 2014 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių analizę, nustatyta, kad suminis kvercetino glikozidų kiekis įvairuoja nuo 6,120 mg/g iki 10,986 mg/g. Mažiausias suminis flavonoidų kiekis (6,120±0,052 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose birželio mėnesį. Vegetacijos periodo metu suminis flavonoidų kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. Didžiausias suminis flavonoidų kiekis (10,986±0,101 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose spalio mėnesį.

Atlikus 2015 m. Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad suminis flavonoidų kiekis kinta nuo 4,351 mg/g iki 10,371 mg/g. Birželio mėnesį surinktuose lapų ėminiuose suminis flavonoidų kiekis buvo 7,554±0,065 mg/g. Lapams vystantis suminis flavonoidų kiekis sumažėjo iki 4,381±0,025 mg/g (ginkmedžių lapų ėminiuose, surinktuose liepos mėnesį). Nuo liepos mėnesio suminis flavonoidų kiekis ginkmedžių lapuose didėjo. Rugsėjo mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose nustatytas didžiausias ($p<0,05$) suminis flavonoidų kiekis (10,371±0,096 mg/g). Spalio mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose suminis flavonoidų kiekis (4,351±0,038 mg/g) buvo 2,4 karto mažesnis už suminį flavonoidų kiekį, nustatytą rugsėjo mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose. Liepos ir spalio mėnesiais surinktuose lapuose nustatytas mažiausias suminis flavonoidų kiekis ($p<0,05$).

Atlikus 2014 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad suminis flavonoidų kiekis kinta nuo 6,914 mg/g iki 9,580 mg/g. Mažiausias suminis flavonoidų kiekis (6,914±0,059 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose birželio mėnesį. Vegetacijos periodo metu suminis flavonoidų kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. Didžiausias suminis flavonoidų kiekis (9,580±0,084 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose spalio mėnesį.

Atlikus 2015 m. Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę, nustatyta, kad suminis flavonoidų kiekis kinta nuo 6,803 mg/g iki 10,958 mg/g. Mažiausias suminis flavonoidų kiekis (6,803±0,056 mg/g, $p<0,05$) nustatytas lapų ėminiuose, surinktuose liepos mėnesį. Vegetacijos periodo metu suminis flavonoidų kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. Rugsėjo mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose nustatytas didžiausias ($p<0,05$) suminis flavonoidų kiekis (10,958±0,101mg/g). Spalio mėnesį surinktuose lapų ėminiuose nustatytas mažesnis ($p<0,05$) suminis flavonoidų kiekis (9,098±0,083 mg/g).

Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad suminio flavonoidų kiekio kitimo tendencija nustatyta ištyrus Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių ėminių flavonoidų kiekinę sudėtį atitinka suminio flavonoidų kiekio dinamikos dėsningumus, nustatytus ištyrus Klaipėdos universiteto Botanikos sode surinktų ginkmedžių lapų ėminius. Suminio flavonoidų kiekio dinamika ginkmedžių lapuose vegetacijos metu skirtingais metais skyrėsi. 2014 m.

vegetacijos periodo metu suminis flavonoidų kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo. 2015 m. vegetacijos periodo metu lapams vystantis suminis flavonoidų kiekis sumažėjo ir liepos mėnesį surinktuose ginkmedžių lapų ėminiuose nustatytas mažiausias suminis flavonoidų kiekis. Nuo liepos mėnesio suminis flavonoidų kiekis ginkmedžių lapuose didėjo iki rugsėjo mėnesio, o vegetacijos periodo pabaigoje sumažėjo.

3.7. Flavonoidų kiekinės sudėties dviskiaučių ginkmedžių lapuose tyrimo apibendrinimas

Atlikta dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kokybinės ir kiekinės sudėties analizė efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodu. Ginkmedžių lapų ekstraktuose identifikuoti kvercetino (rutinas, izokvercitrinas ir kvercitrinas) ir kemferolio (astragalinas) glikozidai. Kvercetino glikozidai buvo įvertinti kiekybiškai.

Atlikus skirtingais vegetacijos periodais surinktų ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties tyrimus, nustatyta, kad tirtų flavonoidų kiekinė sudėties dinamika skiriasi. Ginkmedžių lapuose, surinktuose skirtingose augavietėse auginamų ginkmedžių to paties vegetacijos periodo metu, flavonoidų kiekinės sudėties kitimo tendencijos, tendencijos panašios. 2014 m. vegetacijos periodo metu tirtų flavonoidų glikozidų kiekis dviskiaučių ginkmedžių lapuose didėjo, išskyrus kvercitriną. Kvercitrino kiekis lapų ėminiuose surinktuose Šiaulių universiteto Botanikos sode surinktų dviskiaučių ginkmedžių lapuose kvercitrino kiekis vegetacijos periodo metu mažėjo iki rugsėjo mėnesio, vegetacijos pabaigoje – padidėjo. 2015 m. vegetacijos periodo metu lapams vystantis rutino, izokvercitrino ir kvercitrino kiekiai sumažėjo. Nuo liepos mėnesio tirtų flavonoidų kiekis ginkmedžių lapuose didėjo iki rugsėjo mėnesio, o vegetacijos periodo pabaigoje sumažėjo.

Palyginus tirtų flavonoidų kiekius, nustatytus ginkmedžių lapuose, surinktuose skirtingais vegetacijos periodais Klaipėdos universiteto Botanikos sode, nustatyta, kad jų kiekiai skiriasi statistiškai reikšmingai ($p<0,05$). Statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta tarp rutino kiekių, nustatytų lapų ėminiuose, surinktuose rugsėjo mėnesį skirtingais vegetacijos periodais. Skirtumas tarp kvercitrino kiekių lapų ėminiuose, surinktuose rugpjūčio mėnesį skirtingais vegetacijos periodais, taip pat statistiškai nereikšmingas.

Palyginus tirtų flavonoidų kiekius, nustatytus ginkmedžių lapuose, surinktuose skirtingais vegetacijos periodais Šiaulių universiteto Botanikos sode, nustatyta, kad jų kiekiai skiriasi statistiškai reikšmingai ($p<0,05$). Statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta tarp rutino kiekių, nustatytų lapų ėminiuose, surinktuose rugpjūčio mėnesį skirtingais vegetacijos periodais.

4. Išvados

1. Dviskiaučių ginkmedžių metanolinių ekstraktų kokybinei analizei pritaikyta efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodika. Atlikus analizę identifikuoti keturi flavonoidai: rutinas, izokvercitrinas, kvercitrinas ir astragalinas. Šie flavonoidai nustatyti visuose analizuotuose lapų mėginiuose surinktuose Šiaulių ir Klaipėdos universitetų botanikos soduose lapų augimo vegetacijos perioduose.

2. Atlikus dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminių flavonoidų kiekinės sudėties analizę nustatyta, kad flavonoidų kiekinė sudėtis priklauso vegetacijos periodo, vegetacijos periodo tarpsnio, ir augavietės, kurioje surinkta vaistinė augalinė žaliava, taip pat ir šių faktorių sąveikos. Nustatyta, kad priklausomai nuo šių veiksnių dviskiaučų ginkmedžių lapų suminis kvercetino glikozidų kiekis įvairuoja nuo 4,351 mg/g iki 10,986 mg/g, rutino kiekis – nuo 3,114 mg/g iki 7,661 mg/g, izokvercitrino kiekis – nuo 0,437 mg/g iki 2,548 mg/g, kvercitrino kiekis – nuo 0,742 mg/g iki 0,973 mg/g.

3. Atlikus gautų duomenų statistinę analizę nustatyta, kad tirtuose dviskiaučių ginkmedžių lapų ėminiuose (Šiaulių ir Klaipėdos universitetų botanikos sodai) kaupiamų flavonoidų kiekiui reikšmingos įtakos ($p<0,05$) turėjo mėginių rinkimo laikas.

5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Siekiant surinkti ginkmedžių lapų vaistinę augalinę žaliavą, kurioje būti didžiausias kiekis rutino, izokvercitrino ir kvercitrino, remdamiesi gautais tyrimų rezultatais vaistinę augalinę žaliavą rekomenduojame rinkti rugsėjo – spalio mėnesiais. Bet atsižvelgiant į tyrimus yra mažesnis duomenų išsibarstymas. Todėl rekomenduojama rinkti rugsėjo mėnesį.

6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ahlemeyer B, Krieglstein J. Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 2003;60(9):1779-92.
2. Ashworth MRF, Stahl E. Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook: Springer Science & Business Media; 2013.
3. Avula B, Sagi S, Gafner S, Upton R, Wang Y-H, Wang M, et al. Identification of *Ginkgo biloba* supplements adulteration using high performance thin layer chromatography and ultra high performance liquid chromatography-diode array detector-quadrupole time of flight-mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry. 2015;407(25):7733-46.
4. Bansal, Gulshan, et al. "Stability Testing of Herbal Drugs: Challenges, Regulatory Compliance and Perspectives." Phytotherapy Research (2016).
5. Bimbiraitė K, Ragažinskienė O, Maruška A, Kornyšova O. Comparison of the chemical composition of four yarrow (*Achillea millefolium* L.) morphotypes. biologija. 2008;54(3):208-12.
6. Boghdady NAE. Antioxidant and antiapoptotic effects of proanthocyanidin and *Ginkgo biloba* extract against doxorubicin induced cardiac injury in rats. Cell biochemistry and function. 2013;31(4):344-51.
7. Cao Y, Chu Q, Fang Y, Ye J. Analysis of flavonoids in *Ginkgo biloba* L. and its phytopharmaceuticals by capillary electrophoresis with electrochemical detection. Analytical and bioanalytical chemistry. 2002;374(2):294-9.
8. Chandra A, Li Y, Rana J, Persons K, Hyun C, Shen S, et al. Qualitative categorization of supplement grade *Ginkgo biloba* leaf extracts for authenticity. Journal of Functional Foods. 2011;3(2):107-14.
9. Chebil L, Humeau C, Anthoni J, Dehez F, Engasser J-M, Ghoul M. Solubility of flavonoids in organic solvents. Journal of Chemical & Engineering Data. 2007;52(5):1552-6.
10. Chen J, Wang X, Zhu J, Shang Y, Guo X, Sun J. Effects of *Ginkgo biloba* extract on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. Journal of cardiovascular pharmacology. 2004;43(3):347-52.
11. Chen S, Xing X-H, Huang J-J, Xu M-S. Enzyme-assisted extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves: improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by Penicillium decumbens cellulase. Enzyme and microbial technology. 2011;48(1):100-5.
12. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet: John Wiley & Sons; 2008.

13. Deng F, Zito SW. Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, Ginkgolides and flavonoids in *Ginkgo biloba* L. extract and pharmaceutical preparations. Journal of Chromatography A. 2003;986(1):121-7.
14. Diamond, Bruce J, Bailey MR. "*Ginkgo biloba*: indications, mechanisms, and safety." Psychiatric Clinics of North America 36.1 (2013): 73-83.
15. Dörken VM. Morphology, anatomy and vasculature in leaves of *Ginkgo biloba* L.(*Ginkgoaceae, Ginkgoales*) under functional and evolutionary aspects. Feddes Repertorium. 2013;124(23):80-97.
16. Dubber M-J, Kanfer I. High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in *Ginkgo biloba* solid oral dosage forms. J Pharm Pharm Sci. 2004;7:303-9.
17. Ekiert H, Szewczyk A, Kuś A. Free phenolic acids in *Ruta graveolens* L. in vitro culture. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009;64(10):692-4.
18. Ellnain-Wojtaszek M, Kruczynski Z, Kasprzak J. Analysis of the content of flavonoids, phenolic acids as well as free radicals from *Ginkgo biloba* L. leaves during the vegetative cycle. Acta poloniae pharmaceutica. 2001;58(3):205-10.
19. Ellnain-Wojtaszek M, Kruczyński Z, Kasprzak J. Variations in the free radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* L. leaves in the period of complete development of green leaves to fall of yellow ones. Food chemistry. 2002;79(1):79-84.
20. European Pharmacopoeia 8.0 Volume 1. Strasbourg: Council of Europe; 2014.
21. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants (United Nations Industrial Development Organisation and the International Centre for Science and High Technology). ICS-UNIDO, AREA Science Park Padriciano. 2008;99:34012.
22. Hasler A, van Beek T. Chemical constituents of *Ginkgo biloba*. *Ginkgo biloba*. 2000:109-42.
23. Hassellund S, Flaa A, Kjeldsen S, Seljeflot I, Karlsen A, Erlund I, et al. Effects of anthocyanins on cardiovascular risk factors and inflammation in pre-hypertensive men: a double-blind randomized placebo-controlled crossover study. Journal of human hypertension. 2013;27(2):100-6.
24. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of nutritional biochemistry. 2002;13(10):572-84.
25. Huang SM, Lesko LJ. Drug-Drug, Drug-Dietary Supplement, and Drug-Citrus Fruit and Other Food Interactions: What Have We Learned? The Journal of Clinical Pharmacology. 2004;44(6):559-69.

26. Kanba S, Richelson E. Herbal Medicines for Neuropsychiatric Diseases: Current Developments and Research: Routledge; 2013.
27. Kitazato K, Wang Y, Kobayashi N. Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. Drug Discov Ther. 2007;1(1):14-22.
28. Kuller LH, Ives DG, Fitzpatrick AL, Carlson MC, Mercado C, Lopez OL, et al. Does *Ginkgo biloba* reduce the risk of cardiovascular events? Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes. 2010;3(1):41-7.
29. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. The Scientific World Journal. 2013;2013.
30. Li L, Stanton JD, Tolson AH, Luo Y, Wang H. Bioactive terpenoids and flavonoids from *Ginkgo biloba* extract induce the expression of hepatic drug-metabolizing enzymes through pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, and aryl hydrocarbon receptor-mediated pathways. Pharmaceutical research. 2009;26(4):872-82.
31. Liebgott T, Miollan M, Berchadsky Y, Drieu K, Culcasi M, Pietri S. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion. Basic research in cardiology. 2000;95(5):368-77.
32. Lobstein A, Rietsch-Jako L, Haag-Berrurier M, Anton R. Seasonal variations of the flavonoid content from *Ginkgo biloba* leaves. Planta medica. 1991;57(05):430-3.
33. Mahadevan S, Park Y. Multifaceted therapeutic benefits of *Ginkgo biloba* L.: chemistry, efficacy, safety, and uses. Journal of Food Science. 2008;73(1):R14-R9.
34. Mohammad M, Zawilla N. Thin-layer and column-chromatographic methods for simultaneous analysis of ambroxol hydrochloride and doxycycline hyclate in a binary mixture. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC. 2009;22(3):201-6.
35. Patil AB, Jadhav AS. Flavonoids an antioxidant: a review. International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences Research and Devlopment. 2013;1(1):7-20.
36. Pociūtė A. Lietuvoje augančių dviskiaučių ginkmedžių (*Ginkgo biloba* L.) lapuose kaupiamų fenolinių junginių sudėties įvertinimas plonasluoksnės chromatografijos metodu: Lithuanian University of Health Sciences.
37. Qiang-Min CJ-EK, ZHANG H-R. Optimization of Microwave-Ultrasound Assisted Extraction of Flavonids from *Ginkgo Biloba* Leaves by Orthogonal Design [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory. 2011;2:033.
38. Ragažinskienė O, Rimkienė S, Sasnauskas V. Vaistinių augalų enciklopedija: Lututė; 2005.
39. Reuse-Blom S, Drieu K. Effect of *Ginkgo biloba* extract on arteriolar spasm in rabbits. Rökan: *Ginkgo biloba* Recent Results in Pharmacology and Clinic. 2012:162.

40. Ryu KH, Han HY, Lee SY, Jeon SD, Im G-J, Lee BY, et al. *Ginkgo biloba* extract enhances antiplatelet and antithrombotic effects of cilostazol without prolongation of bleeding time. Thrombosis research. 2009;124(3):328-34.
41. Sarker SD, Nahar L. An introduction to natural products isolation. Series Editor John M Walker School of Life Sciences University of Hertfordshire Hatfield, Hertfordshire, AL10 9AB, UK. 2006:1.
42. Schantz MM, Bedner M, Long SE, Molloy JL, Murphy KE, Porter BJ, et al. Development of saw palmetto (Serenoa repens) fruit and extract standard reference materials. Analytical and bioanalytical chemistry. 2008;392(3):427-38.
43. Singh B, Kaur P, Singh R, Ahuja P. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*. Fitoterapia. 2008;79(6):401-18.
44. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. Journal of separation science. 2007;30(18):3268-95.
45. Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič M, Knez Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food chemistry. 2005;89(2):191-8.
46. van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. Journal of Chromatography A. 2009;1216(11):2002-32.
47. Vender R. Adverse reactions to herbal therapy in dermatology. Skin Therapy Lett. 2003;8(3):5-8.
48. Wang X-W, Hai H, Jin W-Y, Wang K, Yang D. Optimization of microwave-ultrasound assisted extraction of flavonids from *Ginkgo biloba* leaves by response surface methodology [J]. Food Science and Technology. 2010;3:058.
49. Wohlmuth, Hans, et al. Adulteration of *Ginkgo biloba* products and a simple method to improve its detection. Phytomedicine 21.6 (2014): 912-918.
50. Xie Z-q, Liang G, Zhang L, Wang Q, Qu Y, Gao Y, et al. Molecular mechanisms underlying the cholesterol-lowering effect of *Ginkgo biloba* extract in hepatocytes: a comparative study with lovastatin. Acta Pharmacologica Sinica. 2009;30(9):1262-75.
51. Zarzycki PK, Ohta H, Harasimiuk FB, Jinno K. Fast separation and quantification of C60 and C70 fullerenes using thermostated micro thin-layer chromatography. Analytical Sciences. 2007;23(12):1391-6.
52. Zhou C, Li X, Du W, Feng Y, Kong X, Li Y, et al. Antitumor effects of Ginkgolic acid in human cancer cell occur via cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis. Chemotherapy. 2010;56(5):393-402.