

**KAUNO MEDICINOS UNIVERSITETAS**  
**Farmacijos fakultetas**  
**Farmacinės chemijos ir farmakognozijos katedra**

**Kanadinės jakšūnės (*Desmodium canadense* (L.) DC.) biologinių  
savumų ir fitocheminis tyrimas**  
**Magistro diplominis darbas**

**Darbo vadovai: doc. G. Puodžiūnienė**  
**doc. L. Ivanauskas**  
**dr. O. Ragažinskienė**  
**Paruošė: FF 5k. 6 gr. stud. V. Ribokaitė**

**Darbas atliktas remiant KMU Mokslo Fondo lėšomis.**

**KAUNAS, 2007**

# Turinys

<b>1. Įvadas</b> .....	5
<b>2.1. <i>Desmodium canadense</i> (L.) DC. – kanadinės jakšūnės apibūdinimas</b> .....	7
2.1.1. Botaninė klasifikacija.....	7
2.1.2. Geografinis paplitimas.....	7
2.1.3. Morfologija.....	8
2.1.4. Auginimas.....	9
2.1.5. Cheminė sudėtis.....	10
<b>2.2. Antžeminės augalo dalies augimo tyrimo metodai</b> .....	11
<b>2.3. Požeminės augalų dalies tyrimo metodai</b> .....	12
<b>2.4. Sėklų daigumo tyrimo metodai</b> .....	13
<b>2.5. Veikliųjų junginių fitocheminis tyrimas</b> .....	15
2.5.1. Flavonoidų cheminė sandara.....	15
2.5.2. Paplitimas augaliniame pasaulyje.....	16
2.5.3. Spektrofotometrinis flavonoidų kiekio nustatymo metodas augalinėje žaliavoje.....	16
<b>2.6. Efektyvioji skysčių chromatografija (ESC)</b> .....	16
2.6.1. Chromatografinių metodų klasifikacija.....	16
2.6.2. ESC naudojami siurbliai.....	18
2.6.3. Bandinių įleidimo įranga.....	19
2.6.4. Chromatografinės kolonėlės.....	20
2.6.5. Detektoriai.....	21
2.6.6. Duomenų registravimas ir apdorojimas.....	22
<b>2.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas</b> .....	23
<b>3. Tyrimo objektas ir metodai</b> .....	25
<b>4. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas</b> .....	29
<b>4.1. Kanadinės jakšūnės antžeminės dalies augimo tyrimų rezultatai ir jų aptarimas</b> .....	29
4.1.1. Kanadinės jakšūnės antžeminės dalies augintos natūraliomis sąlygomis ketvirtaisiais vegetacijos metais augimo ypatumai.....	29
4.1.2. Kanadinės jakšūnės antžeminės dalies augintos natūraliomis sąlygomis penktaisiais vegetacijos metais augimo ypatumai.....	30
<b>4.2. <i>Desmodium canadense</i> (L.) DC. šaknų morfologijos tyrimas</b> .....	34
<b>4.3. Sėklų daigumo tyrimai</b> .....	37
4.3.1. Sėklų daigumas laboratorijoje.....	37

4.3.2. Sėklų surinktų 2005 m., daigumo tyrimai dirvožemyje.....	40
<b>4.4. Fitocheminio penktųjų vegetacijos metų kanadinės jakšūnės tyrimo rezultatai ir jų aptarimas.....</b>	<b>43</b>
<b>5. Išvados.....</b>	<b>57</b>
<b>6. Naudota literatūra.....</b>	<b>60</b>
<b>7. Priedai.....</b>	<b>62</b>

## Santrauka

**Raktiniai žodžiai:** *Desmodium canadense* (L.) DC., kanadinė jakšūnė, biologiniai savumai, fitocheminis tyrimas, flavonoidai.

Gana dažnai nusilpusiai imuninei sistemai stabilizuoti vartojami augaliniai imunostimuliuojantys preparatai, nes jų poveikyje pasireiškia mažiau pašalinių reakcijų, jie saugesni vartojant didesnėmis dozėmis, todėl yra pranašesni už sintetinius cheminius preparatus. Herpes virusų sukeltoms ligoms gydyti vartojami ne tik cheminiai preparatai, bet ir augaliniai vaistai savo sudėtyje turintys flavonoidų ir fenolkarboksirūgščių. Šiuos junginius kaupia kanadinė jakšūnė (*Desmodium canadense* (L.) DC.).

Darbo tikslas – ištirti ketvirtųjų – penktųjų auginimo metų kanadinės jakšūnės (*Desmodium canadense* (L.) DC.) biologinius savumus Lietuvos klimatinėmis sąlygomis ir nustatyti besikaupiančių veikliųjų junginių dinamiką vegetacijos eigoje.

Buvo nustatyti kanadinės jakšūnės antžeminės dalies augimo ypatumai ketvirtaisiais ir penktaisiais auginimo metais. Ištirta *Desmodium canadense* (L.) DC. požeminės dalies vystymosi dinamika vaizdinės analizės metodu. Nustatytas kanadinės jakšūnės sėklų daigumas pritaikant skarifikavimo ir stratifikavimo metodus. Atlikta *Desmodium canadense* (L.) DC. fitocheminė analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (ESC) ir nustatyti besikaupiančių veikliųjų junginių kiekiai bei jų dinamika vegetacijos eigoje.

Gausiausia veikliųjų junginių susikaupia žydėjimo pradžioje. Kanadinės jakšūnės žolėje tuo laikotarpiu penktaisiais vegetacijos metais rasta 1,38 % flavonoidų ir fenolkarboksirūgščių, o lapuose – 2,1 % šių junginių. Pagrindiniai veiklieji junginiai yra apigeninas, liuteolinas bei jų glikozidai – orientinas, viteksinas, izoviteksinas, taip pat rasta rutino.

## 1. Įvadas

Šiuolaikinės visuomenės sąlygojamas greitas gyvenimo tempas, nuolatinis stresas, oro užterštumas neigiamai veikia žmogaus organizmą ir silpnina imuninę sistemą. To pasekoje žmogaus organizmas nepajėgia mobilizuoti visas savo gynybines galias ir apsisaugoti nuo ligų sukėlėjų – mikroorganizmų bei virusų. Gana dažnai nusilpusiai imuninei sistemai stabilizuoti vartojami augaliniai imunostimuliuojantys preparatai, nes jų poveikyje pasireiškia mažiau pašalinių reakcijų, jie saugesni vartojant didesnėmis dozėmis, todėl yra pranašesni už sintetinius cheminius preparatus. Dabartiniu metu mokslininkai vis dažniau atsigrežia į neištirtus augalus, todėl vaistingųjų augalų ir augalinių preparatų asortimentas nuolat auga.

Pūslelinė yra viena iš labiausiai paplitusių virusinių infekcijų. Žinomos septynios Herpes viruso rūšys, galinčios pažeisti žmogaus organizmą. Dažniausiai užsikrečiama paprastąja pūsleline – Herpes simplex (HSV). HSV-1 viruso atmaina užsikrečiama vaikystėje ir net apie 95 % suaugusiųjų žmonių populiacijos yra šio viruso nešiotojai. HSV-2 užsikrečiama subrendus ir 10-30 % suaugusiųjų žmonių populiacijos yra viruso nešiotojai.

Herpes virusų sukeltoms ligoms gydyti vartojami ne tik cheminiai preparatai, bet ir augaliniai vaistai savo sudėtyje turintys flavonoidų ir fenolkarboksirūgščių. Iš kanadinės jakšūnės (*Desmodium canadense* (L.) DC.) antžeminės dalies buvo išskirtas sausasis ekstraktas, pavadintas Helepinu D ir vartojamas Rusijoje kaip augalinis preparatas [12]. Jis pasižymi plačiu veikimo spektru: priešvirusiniu, priešuždegiminiu, antimikrobiniu, hipoazoteminiu veikimu. Gydant Herpes virusų sukeltas dermatozes jo poveikis prilygsta acikloviro („Zovirax“, „Acic“) preparatui [13].

*Desmodium* genties augalai pasižymi įvairiomis farmakologinėmis savybėmis. *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. pasižymi priešuždegiminiu veikimu, mažina akmenų susidarymą inkstų kanalėliuose. *Desmodium adscendens* (Sw.) DC. pasižymi analgetiniu poveikiu, slopina toninius traukulius bei atpalaiduoja kvėpavimo organų lygiuosius raumenis. *Desmodium gangeticum* (L.) DC. vartojama leišmanijoje gydyti [11]. Šios jakšūnių rūšys plačiai tyrinėjamos ir taikomos medicinos praktikoje.

*Desmodium canadense* (L.) DC. turimais literatūriniais duomenimis pasaulyje yra mažai tyrinėta. Šio augalo tėvynė – Šiaurės Amerika. Kanadinė jakšūnė natūraliai auga Kanadoje bei rytinėje Jungtinių Amerikos Valstijų dalyje. Ten ją naudoja prerijų apželdinimui ar augina kaip dekoratyvų augalą, dėl puošnių rožinių žiedų. XX a. 8-ajame dešimtmetyje kanadinė jakšūnė pradėta kultivuoti buvusioje TSRS – Visasajunginiame Vaistinių augalų mokslinio tyrimo institute ir jo padaliniuose. Prof. V. Janulis atliko kanadinės jakšūnės tyrimus ir nustatė veikliųjų junginių sudėtį bei sukūrė preparatą Helepiną D [12]. Profesorius keletą augalų atvežė į Lietuvą ir introdukavo VDU Kauno botanikos sodo vaistinių augalų skyriuje. Vėliau dr. G. Šimonienė tyrė Helepino D imunostimuliuojančias savybes [11]. Dr. A. Lukošius yra sukūręs 0,2 % Helepino D

akių lašus tinkamus oftalmoherpesui ir adenovirusinės akių infekcijos gydymui [13]. Ukrainos mokslininkai iš *Desmodium canadense* (L.) DC. yra sukūrę tepalą “Fladex”, kuris pasižymi ryškiu antivirusiniu efektu ir plačiai vartojamas virusinių dermatitų ir tropinių opų gydymui[11].

**Darbo naujumas.** Kanadinė jakšūnė nėra pasaulyje gerai ištyrinėtas vaistinis augalas. Lietuvoje esant panašioms klimatinėms sąlygoms, kaip ir tėvynėje, tikslinga buvo iširti jo introdukavimo galimybes. Todėl yra atliekami augalo biologinių savumų kultivuojant jį mūsų klimatinėmis sąlygomis tyrimai bei atliekami fitocheminiai tyrimai augalo veikliųjų junginių sudėčiai nustatyti.

**Darbo tikslas** – iširti ketvirtaisiais – penktaisiais auginimo metais kanadinės jakšūnės (*Desmodium canadense* (L.) DC.) biologinius savumus Lietuvos klimatinėmis sąlygomis ir nustatyti besikaupiančių veikliųjų junginių dinamiką vegetacijos eigoje.

**Darbo uždaviniai:**

1. Nustatyti kanadinės jakšūnės antžeminės dalies augimo ypatumus ketvirtaisiais ir penktaisiais auginimo metais.
2. Nustatyti *Desmodium canadense* (L.) DC. požeminės dalies vystymosi dinamiką vaizdinės analizės metodu.
3. Nustatyti kanadinės jakšūnės sėklų daigumą taikant skarifikavimo ir stratifikavimo metodus.
4. Atlikti *Desmodium canadense* (L.) DC. fitocheminę analizę ir nustatyti besikaupiančių veikliųjų junginių kiekius bei jų dinamiką vegetacijos eigoje.

## 2.1. *Desmodium canadense* (L.) DC. – kanadinės jakšūnės apibūdinimas

### 2. 1. 1. Botaninė klasifikacija

Augalai yra klasifikuojami, remiantis atitinkamais giminingumo požymiais. Bendrinio taksonominės informacijos tinklo (ITIS) duomenų bazėje pateikiama tokia kanadinės jakšūnės botaninė klasifikacija [1,3]:

Karalystė	<i>Plantae</i> – Augalai
Pokaralystė	<i>Tracheobionta</i> – Induočiai
Antskyris	<i>Spermatophyta</i> – Sėkliniai induočiai
Skyrius	<i>Magnoliophyta</i> – Magnolijūnai (Gaubtasėkliai)
Klasė	<i>Magnoliopsida</i> – Magnolijainiai (Dviskilčiai)
Poklasis	<i>Rosidae</i> – Erškėčiažiedžiai
Eilė	<i>Fabales</i> ( <i>Leguminosales</i> )– Pupiečiai (Ankštiečiai)
Šeima	<i>Fabaceae</i> ( <i>Leguminosae</i> ) – Pupiniai (Ankštiniai)
Gentis	<i>Desmodium</i> Desv. – Jakšūnių
Rūšis	<i>Desmodium canadense</i> (L.) DC. – Kanadinė jakšūnė

*Desmodium canadense* (L.) DC. taip pat gali būti sutinkama *Hedysarum canadense* L. arba *Meibomia canadensis* (L.) Kuntze. pavadinimais. Be to, ji turi ir daugybę liaudiškų pavadinimų – kaip antai išvaizdžioji limpančioji trilapė, kanadinė limpančioji trilapė, kanadinis limpantysis dobilas, didysis limpantysis dobilas, elgetų utėlė, velnio usnis, lipniosios kojinės.

Įvairios *Desmodium* augalų rūšys yra plačiai paplitusios visame pasaulyje. Jungtinių Amerikos Valstijų Žemės Ūkio Departamento duomenų bazėje (USDA) pateikiama 76 *Desmodium* augalų rūšys ir 14 jų atmainų. Jakšūnės atskirti tarpusavyje padeda skirtinga lapų forma bei jų išsidėstymas, taip pat kitoks ankštis pavidalas ar skirtingas jos segmentų skaičius [2].

### 2. 1. 2. Geografinis paplitimas

*Desmodium canadense* (L.) DC. natūraliai auga Kanadoje ir Rytinėje Jungtinių Amerikos Valstijų dalyje. Dažniausiai sutinkama pievose, atvirose laukymėse, paupiuose, paežerėse, pamiškėse, pakelėse, prie geležinkelių[6].

Kanadoje vidutinė vasario mėnesio temperatūra būna nuo  $-1^{\circ}\text{C}$  iki  $+7^{\circ}\text{C}$ . Žiemos virsmas į vasarą būna staigus, dažniausiai prasidedantis balandžio viduryje. Tuomet vidutinė temperatūra siekia nuo  $+4^{\circ}\text{C}$  iki  $+18^{\circ}\text{C}$ . Vasaros vidutiniškai šiltos ir drėgnos: oro temperatūra būna apie  $+25$

$^{\circ}\text{C}$ , o per mėnesį iškrinta 50-100 mm kritulių. Rudenį vidutinė oro temperatūra siekia nuo  $+7^{\circ}\text{C}$  iki  $+22^{\circ}\text{C}$  šilumos [4].

Rytinėje JAV dalyje žiemos ganėtinai šaltos. Vidutinė vasario mėnesio temperatūra siekia  $4-6^{\circ}\text{C}$  šilumos. Gegužės mėnesį oras sušyla iki  $+21^{\circ}\text{C}$ , nors naktys dar būna vėsios. Vasaros sausos ir šiltos – oro temperatūra siekia iki  $+28^{\circ}\text{C}$  šilumos. Rudenį oras palaipsniui vėsta ir lapkričio mėnesio vidutinė temperatūra būna iki  $+12^{\circ}\text{C}$  šilumos [4].

Kanadinė jakšūnė gali būti introdukuota bet kurioje šalyje su panašiomis klimatinėmis sąlygomis.

### 2. 1. 3. Morfologija

Kanadinė jakšūnė – pupinių šeimos atstovas. Tai daugiametis žolinis augalas, užaugantis nuo 0,9 m iki 2 m aukščio, bet vidutiniškai jo aukštis siekia 1,3 m (1 pav.). Stiebai žali, statūs ir briaunuoti. Centrinis stiebas padengtas aštriais smulkiais baltais plaukeliais, kurie esant sausrai paruduoja. Subrendusių augalų šoniniai stiebai išaugina žiedus [6,8].



#### 1 pav. Kanadinės jakšūnės spalvinis eskizas ir natūraliai augantis augalas.

*D. canadense* (L.) DC. lapai trilapiai, linijiškai lancetiški ar lancetiški, suapvalėjusiais galais, pilkai žalios spalvos. Lapeliai būna nuo 1,25 iki 10 cm ar net 14 cm ilgio. Viršūninis lapelis ilgesnis, o jo ilgis 3 – 8 kartus didesnis už plotį. Kiekvienas lapelis turi trumpą apie 1 cm ilgio lapkotį su makštimi, o sudėtinis lapas irgi turi savo lapkotį. Lapų apatinė pusė padengta kabliuko formos plaukeliais, todėl jie kimba prie drabužių ar prabėgančių gyvūnų kailio[6].

Kanadinės jakšūnės žiedai rožinės ar purpurinės spalvos, susitelkę kekės pavidalo žiedynuose, stiebų viršūnėse ar viršūninių lapų pažastyse. Žiedyno ilgis gali siekti iki 40 cm. Žiedo skersmuo - 1,25 cm. Žiedai dvilyčiai, drugelio formos. Kiekvienas žiedas yra ant plaukeliais padengto raudono žiedkočio ir turi žalsvai raudoną plaukeliais padengtą taurelę. Žiedai nekvepia. Augalas žydi liepos – rugsėjo mėnesiais, bet intensyviausias žydėjimas trunka apie 3 savaites. Pirmiausiai pražysta žiedai išsidėstę žiedyno apačioje, vėliau – viršutiniai. Žydėjimo pabaigoje žiedai įgauna melsvą spalvą [6,8].

Kanadinė jakšūnė turi specifinį apdulkinimo mechanizmą. Kai vabzdys (bitė ar drugelis) nusileidžia rinkti nektaro, žiedlapiai susiskleidžia ir žiedas išsauna žiedadulkes ant vabzdžio kūno.



**2 pav. Kanadinės jakšūnės vaisiai ir sėklos**

Žiedlapiams išsiskleidus, žiedadulkėmis aplipęs vabzdys skrenda prie kito žiedo ir jį apdulkina [7].

*Desmodium canadense* (L.) DC. vaisius – plokščia, plaukeliais padengta ankštis, sudaryta iš 3 – 5 trikampio formos segmentų, kurie lengvai sutrūksta į atskiras dalis (2 pav.). Subrendusios ankšties segmento ilgis 7 mm, plotis 5 mm. Subrendusios ankštys būna tamsiai rudos spalvos. Augalo vegetacijos pabaigoje šoniniai stiebai nulinksta prie žemės, todėl lipnios ankštys lengvai prikimba prie drabužių ir gyvūnų kailio. Tokiu būdu augalai prisitaikę išplisti į naujas augimo vietas [6,9]. Kiekviename segmente būna po sėklą. Sėklos blizgančios, padengtos kietu gelsvai rusvos spalvos apvalkalu. Vidutiniškai 160 000 švarių kanadinės jakšūnės sėklų sveria apie 1 kg [8].

Šaknų sistemą sudaro ilga, plona, rudos spalvos liemeninė šaknis [6]. Šaknies paviršius padengtas gumbeliais, kuriuose gyvena azotą fiksuojančios *Rhizobium* genties bakterijos. Jos pasisavina laisvą atmosferos azotą iš kurio sintezuoja azoto druskas, todėl augalų nereikia papildomai tręšti azotinėmis trąšomis [5].

#### **2.1.4. Auginimas**

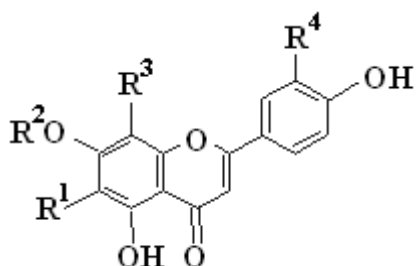
*Desmodium canadense* (L.) DC. gerai auga tiek saulėkaitoje, tiek paunksmėje, drėgnoje ar drenuotoje dirvoje. Tinkamas ir priemolis, jei jame gausu organinių medžiagų. Augalai gali būti dauginami sėklomis, sėjinukais bei šaknimis jas iškasus ir padalijus [6].

Sėklas galima sėti pavasarį (balandį – gegužę), vasarą (rugpjūtį - rugsėjį) ir net žiemą (lapkritį - kovą). Rekomenduojama naudoti skarifikuotas sėklas, nes jos greičiausiai sudygsta. Sėklos sėjamos gerai išpurentoje dirvoje 0,6 cm gylyje rankomis ar sėjamąja mašina. Vidutiniškai 1 ha apsėti reikia apie 4 kg kanadinės jakšūnės sėklų. Dirvožemis tręšiamas tik nustačius, kad jis

stokoja kalio ir/ar fosforo junginių. Pirmaisiais augalo vegetacijos metais nerekomenduojama naudoti azotinių trąšų, nes jos tik paskatins piktžolių augimą [8].

### 2. 1. 5. Cheminė sudėtis

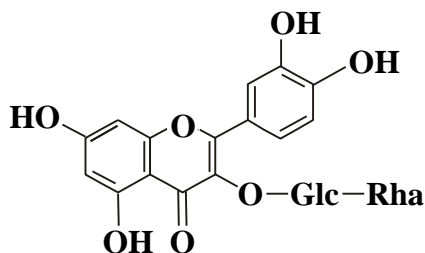
*Desmodium canadense* (L.) DC. žolė kaupia 1,8-2,5 % flavonoidų (3-4 pav.). Vyraujantys komponentai yra apigenino ir liuteolino glikozidai: izoorientinas, viteksinas, izoviteksinas, viceninas, desmodinas. Taip pat rasta rutino [10,12].



**3 pav. Izoorientinas**  $R_2 = R_3 = H$ ,  $R_4 = OH$ ,  $R_1 =$  gliukozė

**Viteksinas**  $R_1 = R_2 = R_4 = H$ ,  $R_3 =$  gliukozė

**Izoviteksinas**  $R_2 = R_3 = R_4 = H$ ,  $R_1 =$  gliukozė



**4 pav. Rutinas**

### 2. 1. 6. Vartojimas

Kanadinė jaksūnė pasižymi priešuždegiminiu, antimikrobiniu, priešvirusiniu, imunostimuliuojančiu poveikiu.

*Desmodium canadense* (L.) DC. yra priešvirusinio preparato “Fladex”, kuris pasižymi ryškiu antivirusiniu efektu ir plačiai vartojamas virusinių dermatitų ir trofinių opų gydymui, žaliava. “Fladex” tepalui būdingos ir priešuždegiminės, analgetinės, žaizdų gijimą gerinančios savybės [11].

Iš *Desmodium canadense* (L.) DC. žolės prof. V. Janulis sukūrė preparatą Helepiną D – sausą ekstraktą, tabletes ir tepalą [15]. Šis preparatas pasižymi plačiu veikimo spektru: hipoazoteminiu, priešuždegiminiu, antimikrobiniu, antivirusiniu poveikiu, be to jis turi įtakos

alteraciniams procesams uždegimo židinyje. Gydant Helepinu D *herpes* virusų sukeltas dermatozes jo poveikis prilygsta acikloviro (“Zovirax”) preparatui [11,12].

0,2 % Helepinu D tirpalas gali būti naudojamas sergant *herpes* viruso sukelta akių infekcija [13].

Kanadinė jakšūnė yra gajus ir nereiklus augalas, todėl tėvynėje dažniausiai naudojamas prerijų apželdinimui. Į bendrą sėklų mišinį kanadinės jakšūnės sėklų dedama 0,5 % - 1 % [8].

## 2. 2. Antžeminės augalo dalies augimo tyrimo metodai

Augalų augimo procesas yra negrįžtamas jų tūrio ir masės didėjimas, susijęs su nauju organizmo struktūrinių elementų susidarymu. Augant ląstelei susidaro nauji organoidai – plastidės, mitochondrijos, ribosomos. Augant visam augalui, formuojasi nauji organai - stiebas ir šaknis. Stiebai šakojasi, gausėja pumpurų, iš kurių išsiskleidžia nauji lapai, formuojasi ir auga dauginimosi organai. Taip pat auga ir tvirtėja šaknų sistema [14].

Augimas tiriamas įvairiais metodais: matuojamas stiebų aukštis, jų užimamas projekcinis plotas, lapų ilgis, plotis bei šaknų ilgis; skaičiuojamas stiebų kiekis ir lapų skaičius; nustatoma augalų masė, tai pat naudojami mikroskopiniai metodai - skaičiuojamos ląstelės [14].

Augalų aukščiui matuoti naudojama paprasčiausia priemonė – liniuotė, milimetrinio popieriaus, medžiaginė arba metalinė juosta. Šiuo metodu augimas tiriamas vegetaciniuose ar lauko bandymuose. Matuojama kartą per dieną arba rečiau (kas 3, 5, 10 dienų). Išmatuojama 10-50 augalų iš kiekvieno bandyminio laukelio ir išvedamas vidurkis. Apskaičiuojamas prieaugis per parą.

Norint gauti tikslesnius augalų augimo duomenis laboratorijoje vartojamas horizontalusis mikroskopas, auksanometrai ir auksanografai. Horizontalusis mikroskopas naudojamas šaknų augimui tirti. Auksanometras ir auksanografas veikia svirties principu. Augalas pririšamas už viršūnėlės siūlu, kuris permetamas per skridinį ir įtempiamas mažu svareliu. Prie skridinio įtaisyta rodyklė, kurios galas siekia lanko pavidalo skalę su padalomis [14].

Augimas dar gali būti tiriamas augalą pakartotinai fotografuojant ar filmuojant. Šio metodo privalumas, kad augalas auga natūraliai, netempiamas. Naudojantis šiuolaikiniais skaitmeniniais fotoaparatais ir filmavimo kameromis, gautus vaizdinius duomenis galima perkelti į personalinį kompiuterį. Tokius duomenis apdorojus specialiomis kompiuterinėmis programomis gaunami augalų augimo dvimačiai ar net trimačiai vaizdai. Trimačiams vaizdams kurti skirta L-sistema (Lindenmayer-System). Šią sistemą pirmasis panaudojo biologas A. Lindenmayer [16]. Trimačio vaizdo koordinatėms matuoti yra sukurta keletas prietaisų, naudojančių garsą, šviesą, magnetinį lauką, lazerius ar mikrojągos-impulsų radarą. Tačiau augalų augimo tyrimams galima pritaikyti tik keletą iš jų, kadangi lapai ir šakos užstoja linijinį vaizdą, žiūrint į augalą iš bet kurio

stebėjimo taško. Virtualių augalų ir jų organų kūrimui Kanados Kalgario universiteto mokslininkai įdiegė programę įrangą "Virtual Laboratory". Dabar šia įranga naudojasi daugelio pasaulio šalių tyrėjai [17].

Vokietijoje, mokslininkai M. Stitt ir U. Shurr atliko augalų augimo tyrimus, priklausomus nuo laiko ir vietos. Jie sukūrė daugiakanalę vaizdinę sistemą, kuri leidžia stebėti dinaminis procesus augančių augalų organuose. Eksperimentinė įranga buvo sumontuota taip, kad dieną ir naktį buvo gaunami augančių lapų dvimačiai ar trimačiai vaizdai. [18].

Dvimačių vaizdų kūrimui tiriamasis augalas (ricinmedis) pastatomas ant stovo, tiriamasis lapas rišamas už viršūnėlės nailoniniu siūlu. Kitame stove įtvirtinta standartine kamera kas 1 min. užfiksuojama po 1 kadra. Eksperimento trukmė 80 val.

Trimačių vaizdų kūrimui buvo sukonstruotas judantis kameros stovas, sujungtas su tachometru. Tokiu būdu kamera gali laisvai siūbuoti kaip švytuoklė. Pasinaudojant šia įranga lapo įtvirtinti nereikia, nes lapo judesius galima sekti siūbuojančios kameros pagalba [18].

### 2. 3. Požeminės augalų dalies tyrimo metodai

Šaknų sistemai tirti sukurtas tranšėjinis metodas (Fedorov 1962; Krasil'nikov, 1983; Lapinskienė, 1986). Pirmiausia apie augalo šaknų sistemą kasama tranšėja, šaknys atsargiai nuvalomos nuo žemių ir išmatuojamos.

Šaknų sistemos ilgiui matuoti Newman 1966 m. pasiūlė linijų kirtimo metodą [19,21]. Iškastos ir nuo žemių nuvalytos šaknys paskleidžiamos ant plokščio paviršiaus, kurio bendras plotas A. Paviršius būna padalintas linijomis (jų bendras ilgis H). Suskaičiavus kiek kartų šaknys kertasi su linijomis (N), šaknų ilgis (R) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$R = \frac{\pi \cdot N \cdot A}{2 \cdot H} \quad (1)$$

Vėliau Marsh atlikęs išsamesnius tyrimus pastebėjo, kad A ir H santykis yra pastovus dydis ir formulę supaprastino:

$$R = \frac{11}{14} \cdot N \quad (2)$$

Šis metodas užima daug laiko ir yra ganėtinai subjektyvus, ypač kai matuojamos tankios šaknų sistemos [19].

Šaknų ilgio ir diametro nustatymas yra svarbūs šaknų sistemos tyrimo kriterijai. Šaknų ilgis ir diametras gali būti tiriamas, mikroskopiniu būdu laboratorijoje arba daug greitesniu kompiuterinės analizės būdu pasinaudojant programinės įrangos paketais Delta-T Scan ir WinRHIZO, kurios integruojamos į daugiafunkcinį skenerį, vykdančią skenavimą, vaizdo vertimą skaitmenine forma ir pavyzdžių analizę. Skenuoti optiniai vaizdai gali būti iš karto analizuojami

arba saugomi kaip tiff failų plėtiniai. Siekiant tikslesnių rezultatų pirmiausia šaknis siūloma dažyti 24 h įmerkus į neutralaus raudonojo ar kito dažo tirpalą. Vėliau šaknų sistema žirkklėmis sukarpoma į 10 mm ilgio segmentus ar dar smulkiau. Šaknų tankumas tiriamajame inde turi būti ne didesnis kaip  $0,5 \text{ mm/mm}^2$ . Naudojantis WinRHIZO programa skiriamoji geba turi būti 400 skaitmeninio vaizdo taškų, o Delta-T Scan – 200 skaitmeninio vaizdo taškų. Vieno pavyzdžio analizei reikalingos 45 s skenavimui ir dar 85 s kompiuteriniam duomenų apdorojimui [22].

Kompiuterinė vaizdų analizė gali būti pritaikoma daugelio rūšių augalų šaknims tirti. Šiuo metodu sunkiau tiksliai išmatuoti tankias šaknis, nes jos dažnai persidengia tarpusavyje [21].

## 2.4. Sėklų daigumo tyrimo metodai

*Desmodium canadense* L. DC. vaisiai yra ankštys, kuriose subręsta pupelės formos, kietos, gelsvai rusvos spalvos sėklos. Pavasarį drėgnoje žemėje sėklos išbrinksta ir sudygsta. Bręsdamos sėklos džiūsta ir jose lieka apie 10-15 % nuodžiūvio. Tik išbrinkusios sėklos gali pradėti dygti. Žinoma keletas brinkinimo būdų [14]:

- Mirkymas vandenyje 12-24 val.;
- Įterpimas į drėgną žemę;
- Išdėstymas ant drėgno filtrinio popieriaus Petri lėkštelėje;
- Porcelianiniame daigintuve.

Tačiau ne visų augalų sėklos lengvai brinksta. Pupinių šeimos augalai turi kietą sunkiai vandeniui pralaidžią luobelę, todėl siekiant palengvinti brinkimo procesus, sėklos gali būti skarifikuojamos arba stratifikuojamos [14].

Subrendusios sėklos turi ramybės periodą. Sėklų ramybės periodas būna dviejų tipų: egzogeninis (sėklos luobelės ramybės periodas) ir endogeninis (sėklos gemalo ramybės periodas). Egzogeninį ramybės periodą galima sutrumpinti naudojant skarifikavimo metodą, o endogeninį – stratifikavimą [22].

**Skarifikavimas.** Skarifikavimo metodas remiasi sėklų luobelių subraižymu, suskaldymu ar suminkštiniu, tam kad sėklų luobelė taptų pralaidi vandeniui ir dujoms. Sėklas skarifikuoti galima mechaniniais ir biologiniais metodais, sausu karščiu, veikiant karštu vandeniu ar cheminėmis medžiagomis [23].

Mechaniškai skarifikuojant sėklas, luobelės subraižomos pasinaudojant brūžekliu ar švitrinium popieriumi. Šis metodas tinkamesnis didelėms sėkloms. Kadangi skarifikavimas atliekamas rankiniu būdu, todėl ilgai trunka, bet yra saugus ir efektyvus.

Skarifikavimas karštu vandeniu ne tik suminkština sėklos luobelę, bet ir išplauna dygimą stabdančias medžiagas. Vandens temperatūra priklausomai nuo augalo rūšies turi būti 75 – 98 °C.

Negalima naudoti verdančio vandens! Vandens reikia imti 10-20 kartų daugiau nei sėklų. Vandeniui atvėsus sėklos jame dar paliekamos 12 – 24 valandoms. Sėklos padengtos vaško sluoksniu turi būti keletą kartų rūpestingai plaunamos karštu vandeniu, ir tik tada paliekamos mirkti.

Dažniausiai sėklos skarifikuojamos jas veikiant koncentruota sulfato rūgštimi. Sėklos suberiamos į stiklinį indą, užpilamos koncentruota sulfato rūgštimi ir pamaišius stikline lazdele paliekamos mirkti nuo 10 minučių iki keleto valandų. Mirkymo trukmė priklauso nuo to, kokio storio yra sėklų luobelės. Jei sėklos mirks per ilgai, tai rūgštis gali pažeisti endospermą ir sėklos nesudygs. Galiausiai sėklos keletą kartų išplaunamos vandeniu[23]. Vietoj koncentruotos sulfato rūgšties galima naudoti acto rūgštį. Tačiau ji mažiau efektyvi ir tinka tik plonas luobelės turinčioms sėkloms [24].

Tropinėse klimato juostose gaisrų ugnis yra natūralus gamtos veiksnys sutrumpinantis egzogeninį sėklų ramybės periodą. Kai kurioms augalų rūšims yra sėkmingai taikomas sėklų skarifikavimas jas “deginant”. Sėklos lygiu sluoksniu yra paskleidžiamos ant žemės ir apklojamos sausa žole, kuri padegama. Kai tik žolė sudega, sėklos suberiamos į šaltą vandenį. Sėklų luobelės sutrūkinėja dėl staigaus temperatūrų pokyčio. Paprastesnis šio metodo variantas yra sėklų veikimas sausu karščiu. Taikant šį metodą yra svarbu laikytis temperatūrinio režimo ir sėklų neperkaitinti [22].

**Stratifikavimas.** Endogeninio sėklų ramybės periodo sutrumpinimui yra naudojamas stratifikavimo metodas – sėklų sluoksniavimas su drėgna terpe (substratu). Tokia terpe gali būti smėlis, durpės, pjuvenos, vermikulitas (mineralas, magnio ir geležies aliumosilikatas), perlitas (stikliška vulkaninė uoliena), koiras (pluoštas iš storų plaušų, dengiančių kokoso riešutą) ir kt. Stratifikavimo metu stengiamasi atkurti natūralias sąlygas, kurias sėklos patirtų būdamos žemėje per žiemą, nes žemoje temperatūroje greičiau suyra dygimą stabdančios medžiagos – inhibitoriai, esantys sėklų luobelėse bei sėklaskiltėse [23].

Žinomi du stratifikavimo metodai: šaltas ir šiltas.

Šaltas stratifikavimas taikomas sėkloms, kurios subręsta vėlyvą rudenį. Pirmiausia sėklos gerai išvalomos, neturi būti lapų, ankščių fragmentų, kankorėžių žvynų, vaisių minkštimo likučių, tik riešutai stratifikuojami su kevalais. Rekomenduojama terpę apdoroti fungicidu pvz.: 0,1% chinosolio tirpalu. Sėklos tolygiai sumaišomos su drėgna terpe, kurios imama 2-5 kartus daugiau nei sėklų. Viskas sudedama į sandarų plastikinį maišelį ir laikoma šaldytuve esant (3 – 4) °C temperatūrai. Stratifikavimo trukmė priklauso nuo augalo rūšies ir gali būti nuo 1 iki 3 mėn. Šis laikotarpis žymiai sutrumpės, jei sėklos prieš stratifikavimą bus mirkomos 6-12 valandų šaltame vandenyje [26].

Šiltas stratifikavimas tinkamas sėkloms, kurios subręsta vasaros pabaigoje ar ankstyvą rudenį. Atliekamas taip pat, kaip ir šaltasis. Tik sėklos drėgnoje terpėje laikomas kambario temperatūroje (20 – 30) °C [23].

Sėklas stratifikuojant svarbu nuolat palaikyti reikiamą drėgmės kiekį. Jei substratas per drėgnas, sėklos gali supelyti. Jei naudojamas durpių substratas, tai vandens reikėtų imti santykiu 1:1, o vermikulitą reikėtų sudrėkinti tiek, kad suspaudus jį rankomis vanduo nelašėtų. Dažniausiai rekomenduojama naudoti vermikulitą arba smėlį, nes tokia terpė yra sterili ir nebrangi [25].

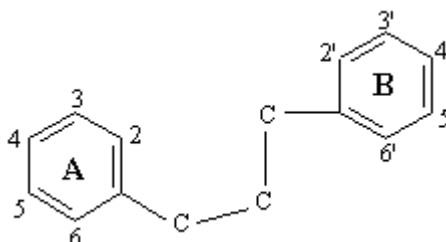
Kai kurių augalų rūšių sėkloms po šilto stratifikavimo gali prireikti ir šalto stratifikavimo. Toks metodas taikomas sėkloms sėjamos vasarą, kai tikimasi, kad jos sudygs kitą pavasarį [26].

*Desmodium canadense* (L.) DC. sėklas rekomenduojama šaltai stratifikuoti nuo – 4 °C iki +4 °C temperatūroje dvylika savaičių arba skarifikuoti koncentruota sulfato rūgštimi 15 min., o paskui sėti 20 °C temperatūros aplinkoje, kad sudygtų [27].

## 2. 5. Veikliųjų junginių fitocheminis tyrimas

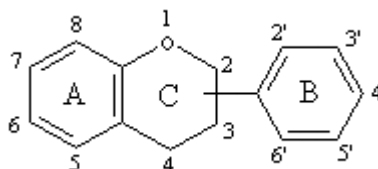
### 2. 5. 1. Flavonoidų cheminė sandara

Flavonoidai yra fenoliniai junginiai su dviem aromatiniais žiedais, kurių struktūros pagrindą sudaro C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> sistema (5 pav.) [28,29].



5 pav. Flavonoidų struktūros pagrindas – C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> sistema.

Kadangi pirmieji iš augalų išskirti junginiai buvo geltonos spalvos, dėl to jie taip ir pavadinti (lot. “flavus” – geltonas). Visų flavonoidų pagrindą sudaro 2-fenil-benzo-γ-pironas, kitaip dar vadinamas flavonu arba chromonu (6 pav.).



6 pav. 2-fenil-benzo-γ-pironas

Flavonoidai gamtoje randami laisvi arba glikozidų pavidale, kaip mono-, di-, tri-sacharidai. Labiausiai paplitę yra O-glikozidai. Juose cukrus jungiasi prie C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> ar C<sub>7</sub> padėtyse

esančių hidroksilo grupių, rečiau – C<sub>5</sub> ir C<sub>6</sub>. C-glikoziduose cukrus betarpiškai jungiasi prie 8 padėties anglies atomo. Šie glikozidai labai patvarūs. Juos suardyti galima tik hidrolizuojant koncentruotomis rūgštimis [28, 29].

## **2. 5. 2. Paplitimas augaliniame pasaulyje**

Flavonoidai plačiai paplitę aukštesniuosiuose augaluose, žaliuosiuose dumbliuose, kai kuriuose grybuose. Daugiausia jų randama dviskilčiuose augaluose ir tropinių kraštų medžiuose. Flavonoidus kaupia daugiau kaip 100 šeimų augalai. Flavonoidai kaupiasi įvairiuose augalų organuose. Didžiausias jų kiekis randamas žolinių augalų generatyviniuose organuose ir lapuose, gerokai mažiau – stiebuose ir šaknyse. Flavonoidų gali būti nuo šimtųjų procento dalių iki kelių procentų. Maksimalus kiekis yra augalo žydėjimo metu, o mažiausias vaisių brandimo fazėje [28].

## **2. 5. 3. Spektrofotometrinis flavonoidų kiekio nustatymo metodas augalinėje žaliavoje**

Flavonoidų kiekio nustatymas, pateiktas farmakopėjos straipsnių rinkinyje [30].

Flavonoidus išekstrahavus iš žaliavos arba vaistažolių mišinio, jie nustatomi matuojant absorbcijos dydį 425 nm ilgio bangoje. Bendras flavonoidų kiekis (% arba mg/g) perskaičiuojamas hiperozidu arba kvercetinu panaudojus atitinkamus perskaičiavimo koeficientus.

## **2. 6. Efektyvioji skysčių chromatografija (ESC)**

### **2. 6. 1. Chromatografinių metodų klasifikacija**

Chromatografija yra fizikinės-cheminės analizės metodas, leidžiantis bandinį išskirstyti į atskirus komponentus. Skirstymo metu bandinio komponentai pasiskirsto tarp nejudrios ir judrios fazės. Po junginių išskirstymo galima juos identifikuoti ir nustatyti jų kiekį bandinyje. Chromatografijos metu skirstymas vyksta molekuliniam lygmenyje. Gali būti atskirti mažamolekuliniai junginiai, jonai ir makromolekulės [31].

Chromatografinės analizės stadijos: bandinio įleidimas, bandinio skirstymas, atskirų analizių detekcija ir gautų duomenų apdorojimas bei įvertinimas. Mišinio komponentų atskyrimas vyksta dėl skirtingos mišinio komponentų fizikinės-cheminės sąveikos su nejudria ir judria fazėmis.

Yra kelios chromatografijos klasifikavimo rūšys:

1. Klasifikavimas pagal judrios fazės agregatinę būvį.

*Dujų chromatografija* – tai chromatografinis skirstymo metodas, kuris remiasi dujų būvio judria faze. Dujų chromatografija visuomet atliekama kolonėlėse.

*Skysčių chromatografija* – tai chromatografinis skirstymo metodas, kuris remiasi skysto būvio judria faze. Skysčių chromatografija gali būti atliekama kolonėlėse arba plokštuminiame formate.

*Superkritinių skysčių chromatografija* – tai chromatografijos rūšis, kuriai būdinga tai, kad judrios fazės vaidmenį atlieka superkritinis skystis (naudojama temperatūra ir slėgis šiek tiek aukštesni nei kritinės šių parametru reikšmės).

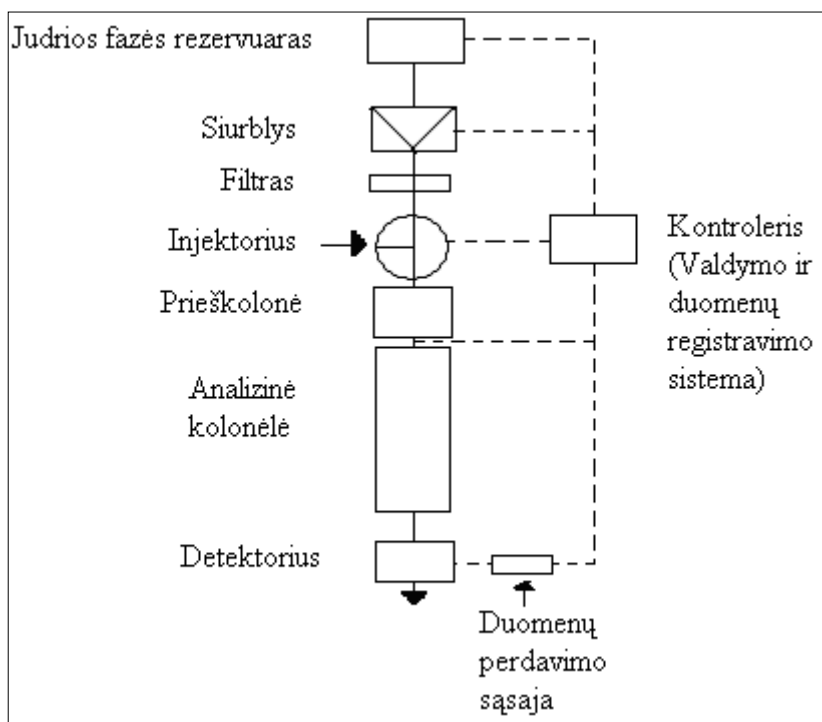
2. Klasifikavimas pagal chromatografinio sluoksnio formą:

- Kolonėlinė chromatografija;
- Plokštuminė chromatografija.

3. Klasifikavimas pagal skirstymo mechanizmą:

- Adsorbcinė chromatografija;
- Paskirstomoji chromatografija;
- Jonų mainų chromatografija;
- Gelchromatografija
- Afininė chromatografija.

1970 m. buvo pasiūlyta sąvoka efektyvioji skysčių chromatografija (ESC) (angl. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)). Klasikinei kolonėlinei skysčių chromatografijai



7 pav. ESC sistemos (izokratinės eliuacijos) principinė schema

atlikti dažniausiai naudojamos stiklinės kolonėlės, pripildytos didelių nejudrios fazės dalelių. Tokių kolonėlių skersmuo siekia kelis centimetrus. Judri fazė leidžiama per kolonėlę naudojant hidrostatinį slėgį arba žemo slėgio siurblius (slėgis iki 0,2-0,3 MPa). Gaunama maža skiriamoji geba, o skirstymo trukmė labai ilga. ESC naudojamos trumpos (5-15 cm) kelių milimetrų vidinio skersmens plieninės kolonėlės, jos pripildytos labai mažų (3-5  $\mu\text{m}$ ) nejudrios fazės granulių.

Judri fazė pumpuojama per kolonėlę naudojant didelio slėgio siurblius. Kitaip nei klasikinės kolonėlinės chromatografijos atveju, ESC yra greitas, efektyvus ir jautrus metodas. Analizės ESC metodu dažniausiai trunka 15-20 min., o efektyvumas yra apie 100 kartų didesnis nei klasikinės kolonėlinės chromatografijos atveju.

ESC sistema yra sudaryta iš nuosekliai sujungtų aparatūros modulių, atliekančių būdingas funkcijas (7 pav.). Šie moduliai gali būti autonominiai, t.y. juos galima pakeisti kitais analogiškais įrenginiais, arba integruoti į vieną atskirą sistemą. Kai kurie gamintojai siūlo integruotas sistemas, kuriose atskiri moduliai sujungti neišardomai [31].

## 2. 6. 2. ESC naudojami siurbliai

Siurbliai efektyviojoje skysčių chromatografijoje atlieka judrios fazės transportavimo ir matavimo vaidmenį. Kadangi šiuolaikinės chromatografinės kolonėlės įkrovą sudaro labai smulkios sorbento dalelės, įkrovos hidrodinaminiam pasipriešinimui nugalėti, transportuojant judrią fazę išilgai kolonėlės reikalingi aukšto slėgio siurbliai.

Svarbi siurblių funkcija yra ne tik transportuoti eliuentą, bet ir formuoti jo sudėtį iš atskirų komponentų. Kai eliuento sudėtis nekinta, tokia eliucija vadinama izokratine, kai eliuento eliuicinė geba didinama, vadinama gradientine. Gradientas gali būti nuoseklusis, pakopinis ar sudėtinis. Gradientas vadinamas nuosekliu, kai eliuento sudėtis keičiama tiesiškai, o pakopiniu, kai didesnės eliuicinės gebos komponento koncentracija didinama žingsniais, t.y. po tam tikro izokratinio režimo koncentracija pakeičiama staiga.

Reikalavimai skysčių chromatografijos siurbliams:

- Sistema turi būti pagaminta iš chemiškai inertinių judriai fazei medžiagų;
- Gali generuoti mažiausiai 30 bar, pageidautina 400 bar slėgį;
- Turi būti nepulsuojanti arba turėti pulsacijos slopintuvą (dempferį);
- Tėkmės greitis iki 5 ml/min. ar 10 ml/min.;
- Didelis judrios fazės tiekimo atkuriamumas.

Vieni iš pirmųjų efektyviajai chromatografijai panaudotų siurblių buvo **pneumatiniai** skysčio išstūmimo **siurbliai**. Tokius siurblius būtina periodiškai užpildyti nauja tirpiklio porcija, todėl jie yra periodinio veikimo. Šie siurbliai naudojami tik pastovaus slėgio režime.

**Švirkštiniai siurbliai** savo konstrukcija primena didelio tūrio švirkštą. Judri fazė tiekama be pulsacijų. Tokie siurbliai išvysto iki 40 MPa slėgį. Vieno siurblio nepakanka gradientinei eliucijai. Norint pakeisti judrią fazę tenka ištuštinti visą siurblio rezervuarą. Pagrindinis šių siurblių trūkumas yra veikimo periodiškumas.

**Membraniniai nuolatinio veikimo siurbliai.** Šie siurbliai turi grįžtamojo judesio stūmoklinę pavara, varomą ekscentrinio disko. Formuojamas eliuento srautas dėl periodinio

stūmoklio judesio patiria didelę pulsaciją. Stūmoklio įtraukimo metu eliuento tėkmė nutrūksta, todėl tėkmė turi būti stabilizuojama naudojant dempferį (pulsacijos slopintuvą). Pulsacija gali būti sušvelninta panaudojant dviejų priešinga faze veikiančių stūmoklių sistemą.

**Grižtamojo judesio** nuolatinio veikimo **stūmokliniai siurbliai**. Kitaip nei membraniniai siurbliai, grižtamojo judesio stūmokliniai siurbliai tiesiogiai išstumia tirpiklio porcijas, t.y. juose nėra membranos ir papildomos hidraulinės sistemos. Modernūs grižtamojo judesio stūmokliniai siurbliai turi ne įprastus skritulio pavidalo išcentrinius diskus, bet tam tikrą inksto profilį primenančią formą. Tokia disko forma užtikrina nuolatinį tirpiklio tiekimą. Plačiausiai ESC naudojami dviejų galvų grižtamojo judesio nuolatinio veikimo siurbliai.

**Pneumatinio stiprinimo siurbluose** palyginti nedidelio slėgio dujos stumdo didelio skerspjūvio stūmoklį, kurio kito galo skerspjūvis yra daug mažesnis. Tokių siurblių veikimas remiasi pneumatinio preso principu, t.y. veikianti jėga abiejų sistemų pusėse yra vienoda, tačiau slėgis yra didesnis mažojo stūmoklio pusėje. Slėgio stiprinimas yra proporcingas stūmoklių skerspjūvio plotų santykiui. Pneumatinio stiprinimo siurbliai dažnai naudojami kolonėlių įkrovimui sorbentu [31].

### 2. 6. 3. Bandinių įleidimo įranga

Bandinio įleidimas yra vienas iš kritiškiausių efektyviosios chromatografijos aspektų. Jei bandinys yra įleistas netinkamai, netgi turint puikią chromatografinę kolonėlę, skirstymo rezultatas bus nepatenkinamas. Teoriniu požiūriu, į kolonėlės viršutinės dalies centrą reikia įleisti be galo mažą bandinio kiekį neįleidžiant oro. Egzistuoja keletas bandinių įleidimo būdų:

1. Bandinys įleidžiamas į kolonėlės viršų sustabdžius judrios fazės srautą;
2. Naudojant mikrošvirkštą ir praduriamą pertvarą;
3. Naudojant vienaieigį vožtuvą;
4. Naudojant kilpinį injektorių;
5. Naudojant automatinę bandinio įleidimo sistemą (autoinjektorių).

Srauto stabdymas įleidžiant bandinį yra labai nepatinkamas chromatografiniai analizei, kadangi didelio slėgio sistemoje jungtys turi būti sandarios, o kaskart išardant ir sujungiant jungtį mažėja jų sandarumas. Dėl to ESC naudojami injektoriai, nestabdantys judrios fazės tėkmės.

Praduriamos pertvaros injektoriai plačiai naudojami dujų chromatografijoje, tačiau juos sunku pritaikyti ESC dėl pernelyg didelio slėgio. Be to, bandinys patenka į judrios fazės srautą ir jo praskiedimas priklauso nuo švirkštu bei judrios fazės siurbliu generuojamų srautų greičio skirtumo.

Vienaieigio vožtuvo injektorius savo konstrukcija primena praduriamosios pertvaros injektorių.

Kilpiniai injektoriai yra plačiausiai naudojami efektyviajai skysčių chromatografijai. Paprasčiausią kilpinį injektorių sudaro 6 kanalų statorius su pasukamu rotoriumi. Naudojant kilpinius injektorius galimi 2 injekcijos režimai: pilnas kilpos pripildymas ar dalinis kilpos pripildymas. Kilpų tūriai gali būti labai įvairūs: nuo nanolitrų (nl) iki šimtų mikrolitrų ( $\mu\text{l}$ ). Paprastai į analizinę efektyviosios skysčių chromatografijos kolonėlę (vidinis skersmuo 4,6 mm) injekuojama iki 20  $\mu\text{l}$  bandinio. Naudojant mikrokolonėles (skersmuo nuo 250  $\mu\text{m}$  iki 1 mm) pasirenkami injektoriai su vidinėmis mažo tūrio kilpomis, pritvirtintomis prie rotoriaus, kurių tūris yra tarp 0,5-5  $\mu\text{l}$ .

Autoinjektoriuose dažniausiai naudojami kilpiniai injektoriai, panašūs į rankinius injektorius, kurie elektromechaninė ar pneumatine pavara automatiškai perjungiami iš dalies ar visiškai pripildžius kilpą bandinio. Autoinjektoriai leidžia pilnai automatizuoti chromatografinę analizę, sumažinti analizės paklaidas ir padidinti rezultatų atkuriamumą, nes eliminuoja operatoriaus daromų klaidų dalį.

Bandinio tirpale negali būti kietų dalelių, todėl visada būtina bandinio tirpalą filtruoti per 0,22  $\mu\text{m}$  porų dydžio membraninį filtrą. Jei įmanoma, visuomet verta bandinį ištirpinti judrioje fazėje. Siekiant nustatyti kolonėlės tuščią tūrį injektuojamas tirpiklis, kuris yra silpnėsnis eliuentas nei judri fazė, bet yra panašios cheminės kompozicijos. Injektuotas tirpiklis nors ir nesorbuoja UV spindulių, tačiau dėl skirtingo lūžio rodiklio matomas kaip nedidelė teigiama ar neigiama smailė chromatogramos pradžioje. Didesnis efektyvumas kartais pasiekiamas ištirpinus bandinį prastesniame tirpiklyje nei judri fazė, nes tuomet vyksta bandinio komponentų sukongravimas kolonėlės pradžioje. Jeigu bandinio tirpiklis yra daug stipresnis eliuentas nei judri fazė, ši aplinkybė gali labai sumažinti skirstymo efektyvumą ar net sukelti kelių smailių vienam junginiui atsiradimą. Bandinio tūris turi būti kiek galima mažesnis, bet bandinys turi būti ir pakankamai praskiestas, norint išvengti bandinio masės perkrovos kolonėlės pradžioje. Paprastai egzistuoja maksimalus injekcijos tūris konkrečiai kolonėlei [31].

#### **2. 6. 4. Chromatografinės kolonėlės**

Kolonėlės pasirinkimas nėra paprastas procesas, jis glaudžiai susijęs su chromatografijos rūšies pasirinkimu bei skirstymo tikslu.

Chromatografinės kolonėlės užpildas, kurį sudaro sorbentas ar tiesiog matrica vadinamas įkrova. Sorbentas pasižymi sorbcinėmis savybėmis ir yra kieto agregatinio būvio. Jis išsiskiria dideliu paviršiaus ir tūrio santykiu ir yra sudarytas iš kietų tolygiai porėtų granuliu su porėtu paviršiaus sluoksneliu. ESC įkrovos matrica gali būti neorganinės ar organinės kilmės polimerinė medžiaga. Dažniausiai naudojamos neorganinės matricos yra silikagelis (silicio oksidas) ir

aliuminio oksidas. Jos pasižymi tvirtumu ir nebrinksta jokiame organiniame tirpiklyje. Polimerinės matricos yra chemiškai susiūtos, pvz.: polistirenas-divinilbenzenas, polimetakrilatai ar poliakrilamidai. Polimerinės įkrovos linkusios brinkti ar susitraukti priklausomai nuo vilgančios terpės. Normalių fazių chromatografijoje naudojamas nemodifikuotas silikagelis ar aliuminio oksidas, o atvirkštinių fazių chromatografijoje – silikagelis su chemiškai prijungtais angliavandenilių ligandais, grafitinė anglis ar stireno-divinilbenzenas.

Dauguma kolonėlių korpusų gaminama iš nerūdijančio plieno. Kolonėlės viršuje yra skirstytuvas, nukreipiantis injekuotą bandinį į kolonėlės centrą, o po skirstytuvu, įkrovos viršuje, yra metalinis tinklelis ar metalinis filtras. Kolonėlės gale taip pat yra filtras, kuris sulaiko įkrovą. Toliau eina jungtis ir trumpas metalinis ar polimerinis kapiliaras, kuris sujungia kolonėlę su detektoriumi. Populiariausios 3-10 cm ilgio kolonėlės, pakrautos 3-5 μm dalelių. Pagrindinis šių trumpų kolonėlių privalumas yra greitesnis skirstymas, mažesnės tirpiklių sąnaudos ir padidėjęs detekcijos jautrumas.

Pagrindinės kolonėlės gedimo ar pažeidimo priežastys yra mechaninių ir cheminių teršalų sankaupos kolonėlės viršuje. Dėl to padidėja slėgis, o chromatografiniai rezultatai būna netikslūs. Mechaninė tarša sumažinama filtruojant judrios fazės tirpiklius ir pasirenkant tinkamą bandinio tirpiklį. Pašalinti žalingas priemaišas padeda prieš kolonėlę instaliuoti papildomi filtrai.

Prieškolonės – tai trumpi cilindriniai segmentai, pakrauti dažniausiai tos pačios sorbcinės medžiagos kaip ir kolonėlė. Prieškolonė sukaupia visus teršalus tiek iš bandinio, tiek iš tirpiklių. Ji apsaugo kolonėlę nuo užteršimo ir pailgina jos naudojimo laiką[31].

## 2. 6. 5. Detektoriai

Detektoriai – tai įrenginiai, nustatantys išskirstytas analites ištekančiame iš kolonėlės eliuate. ESC detektoriams keliami šie reikalavimai:

1. Būtinasis jautrumas visiems eliuuotiems junginiams arba tik dominančioms analitėms.
2. Maža temperatūros ar judrios fazės sudėties pokyčių įtaka detektoriaus signalui.
3. Pakankamas jautris labai mažiems koncentracijos pokyčiams.
4. Mažas kiuvetės tūris, kaip mažos įtakos chromatografinės juostos išsiplėtimui prielaida.
5. Pakankamas koncentracijos matavimo dažnis, siekiant nustatyti labai siauras chromatografinės juostas, greitai pratekančias kiuvete.
6. Pigumas, paprastas valdymas ir patikimumas.

UV absorbciniai detektoriai yra patys populiariausi ESC. Esminę jų konstrukciją sudaro prataki kiuvetė, kuria teka judri fazė. Šioje kiuvetėje judrios fazės kelias susikerta su UV ar

matomos šviesos fotometro ar spektrometro spinduliuotės keliu. Šio tipo detektoriai yra atrankūs ir reaguoja tik į analites, kurios sugeria UV (ar matomą) spinduliuotę. Tarp šių junginių yra arenai, alkenai ir junginiai turintys keleriopus ryšius tarp C ir O, N ar S atomų.

Fluorescentiniai detektoriai. Daugelis junginių sugeria UV spinduliuotę ir išspinduliuoja didesnio bangos ilgio spinduliuotę tiesiogiai (fluorescencija) arba po tam tikros trukmės (fosforescencija). Paprastai išspinduliuotos ir absorbuotos energijos santykis yra mažas. Tačiau kai kuriems junginiams ši reikšmė siekia 0,1-1. Tokiems junginiams tinka fluorescencinė detekcija. Savaimė fluorescuojantys junginiai turi konjuguotą ciklinę struktūrą (policikliniai aromatiniai angliavandeniliai). Daugelis nefluorescuojančių junginių gali būti perversi į fluorescuojančią formą, naudojant atitinkamus reagentus. Fluorescentiniai detektoriai yra daug kartų jautresni (iki 1000 kartų) už UV absorbcijos detektorius.

Elektrocheminiais detektoriais nustatomos analitės, gebančios oksiduotis arba redukuotis, o detektoriaus signalas yra gaunamas matuojant tarp detektoriaus elektrodų plokštumų analičių reakcijų generuotą elektronų srautą. Jeigu reakcija vyksta iki pat pabaigos (sureaguojant visai analitei), srovė tampa lygi nuliui, o bendras generuotas krūvis yra proporcingas analitės, kuri sureagavo, bendrai masei. Šis procesas yra vadinamas kulometriniu detekcija.

Lūžio rodiklio detektoriai (refraktometrai) plačiai naudojami angliavandenių ir polimerų analizei. Lūžio rodiklis  $n$  yra bendrinė eliuato savybė, todėl refraktometrai yra universalūs (nespecifiniai) detektoriai ir jais galima nustatyti įvairiausias analites. Šiuose detektoriuose matuojamasis fizikinis parametras yra lūžio rodiklio pokytis koncentracijos atžvilgiu.

Laidumo detektoriai (konduktometrai) yra įprastiniai jonų detektoriai, matuojantys eliuato laidumą, kuris yra proporcingas joninės analitės koncentracijai. Jų jautris mažėja didėjant judrios fazės savitajam laidumui.

Radioaktyvumo detektoriai naudojami radioaktyviai žymėtiems junginiams nustatyti. Dažniausiai nustatomi beta spinduliuotę skleidžiantys junginiai, t.y. turintys  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{131}\text{I}$ .

Infraraudonos (IR) spinduliuotės detektoriai. Visos organinės molekulės sugeria infraraudoną spinduliuotę ties vienu ar kitu bangos ilgiu. Naudojant IR detektorius, judri fazė neturi pati absorbuoti spinduliuotės ties matavimo bangos ilgiu [31].

## **2. 6. 6. Duomenų registravimas ir apdorojimas**

Duomenų registravimui, rezultatų apskaičiavimui bei ataskaitos paruošimui naudojamos duomenų registravimo bei apdorojimo programos. Paprasčiausiu atveju savirašis brėžia iš detektoriaus gaunamo elektrinio signalo priklausomybę trukmės atžvilgiu, t.y. chromatogramą. Šiuo metu visos chromatografinės sistemos turi kompiuterizuotas duomenų užrašymo, apdorojimo bei saugojimo programas.

Kokybinė analizė. Kokybinės analizės metu siekiama keletu tikslų: išsiaiškinti, ar bandinys turi ieškomąją analitę; ar analitė gali būti atskirta nuo kitų komponentų; ar chromatografinė smailė neturi priemaišų. Kokybiniam nustatymui pakanka eliuacijos trukmės ar spektro sutapimo.

Kiekybinė analizė. Šios analizės uždavinys yra nustatyti bandinio komponentų koncentracijas/ kiekius. Tikslas gali būti pasiektas keliais kiekybinės analizės metodais:

- Procentų;
- Išorinio standarto;
- Vidinio standarto.

Kiekybinės analizės metodai dar gali būti suskirstyti į nekalibruotuosius ir kalibruotuosius. Paprasčiausias iš jų, procentų, priklauso nekalibruotiesiems metodams. Procentinę bandinio sudėtį nustatome pagal smailių plotų ar aukščių santykį su bendru, suminiu smailių plotu ar aukščiu.

Pagrindinis kalibruotasis kiekybinio nustatymo metodas yra išorinio standarto metodas. Atliekant kiekybinę analizę šiuo būdu, braižoma analitei tapataus etalono kalibracinė kreivė ir analogiškoms chromatografinėms sąlygoms atliekama nežinomos koncentracijos bandinio analizė. Nežinomos koncentracijos analitės smailė palyginama su matuojamojo signalo priklausomybės nuo kiekio (koncentracijos) kalibracine kreive. Atliekant kiekybinę analizę išorinio standarto metodu būtina įleisti pastovų bandinio kiekį.

Vidinio standarto metodas pranašesnis už išorinio standarto metodą, kadangi papildomai naudojamas antrasis junginys, kurio vienodas ir tikslus kiekis dedamas tiek į kalibracinius etalono tirpalus, tiek ir į nežinomos koncentracijos bandinį. Šis junginys atlieka vidinio standarto vaidmenį. Pasirinktas vidinis standartas chemine sandara ir chromatografinėmis savybėmis turi būti panašus į tiriamąją analitę, tačiau chromatografijos metu turi visiškai atsiskirti nuo analitės smailės [31].

## **2.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas**

Atlikus literatūros apžvalgą paaiškėjo, kad plačiausiai mokslininkai yra išanalizavę kanadinės jakšūnės antžeminės dalies morfologiją. Tikslių duomenų apie augalo augimą skirtingais vegetacijos tarpsniais aptikti nepavyko. Lietuvoje augalas auginamas VDU Kauno botanikos sode, vaistinių augalų skyriuje. Išsamūs *Desmodium canadense* (L.) DC. biologinių savumų tyrimai pradėti 2003m. Antraisiais ir trečiaisiais vegetacijos metais tirtas augalo augimas ir vystymasis skirtingomis fenofazėmis, nustatyta tręšimo įtaka derlingumui. Remiantis skirtingomis tyrėjų rekomendacijomis buvo atlikta sėklų daiginimo tyrimai laboratorijoje. Labai mažai duomenų rasta apie šaknų sistemos vystymąsi, todėl šaknų sistema buvo tirta vaizdų analizės metodu.

Taigi buvo nutarta tęsti pradėtus tyrimus, siekiant gauti tikslesnius kelių metų duomenis, kuriuos mažiau įtakotų įvairūs klimatiniai veiksniai. 2005-2006 m. buvo nutarta atlikti *Desmodium*

*canadense* (L.) DC. augimo vystymosi tyrimą skirtingais vegetacijos tarpsniais, patikrinti sėklų daigumą laboratorijoje ir dirvožemyje, analizuoti šaknų sistemą vaizdų analizės metodu.

Literatūroje rasta mažai duomenų apie kanadinės jakšūnės cheminę sudėtį. Todėl buvo imtasi tirti veikliųjų junginių kiekį skirtinguose augalo organuose, įvairiais vegetacijos tarpsniais, efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodu.

### 3. Tyrimo objektas ir metodai

Ketvirtųjų-penktųjų auginimo metų kanadinė jakšūnė (*Desmodium canadense* (L.) DC.) tirta 2005-2006 m. VDU Kauno botanikos sode, vaistinių augalų skyriuje (8 pav.). Tai daugiametis žolinis pupinių (Fabaceae) šeimos augalas, kurio tėvynė – Šiaurės Amerika. Kanadinė jakšūnė užauga iki 1,3 m aukščio, lapai trilapiai lancetiški pilkai žalsvos spalvos. Žiedai rožinės spalvos, sutelkti kekės pavidalo žiedynuose. Augalas žydi liepos mėnesį, o rugpjūtį – rugsėjį užaugina ir subrandina ankštis. Ankštys plokščios, sudarytos iš 3-5 segmentų, padengtos plaukeliais, todėl lengvai prikimba prie drabužių ar gyvūnų kailio. Šaknų sistemą sudaro rudos spalvos šakotinė šaknis. Šaknies paviršius padengtas gumbeliais, kuriuose gyvena azotą fiksuojančios *Rhizobium* genties bakterijos.

#### ***Desmodium canadense* (L.) DC. antžeminės dalies augimo tyrimas.**

Kanadinės jakšūnės antžeminės dalies augimo tyrimai atlikti augalų vegetacijos metu – birželio-spalio mėnesiais. 2003 m. netreštame dirvonavusiame 30 m<sup>2</sup> bandymų plote trimis eilėmis kas 50 cm, paliekant 70 cm pločio tarpueilius buvo pasodinti 279 vienu metų amžiaus sodinukai. 2003-2004 m. atliktų stebėjimų duomenimis nustatyta, kad augalai susodinti per tankiai. 2005m. augalai retinti eilėse paliekant kas antrą augalą. Atstumai tarp augalų susidarė 1 m. Tyrimai atlikti 2005-2006 m. Auginimo metu atlikti augalų priežiūros darbai: parenti ir ravėti tarpueiliai. Matavimams pasirinkti ir sužymėti 6 vidutinio dydžio augalai. Augalo aukštis ir projekcinis plotas matuoti liniuote. Vegetacijos pradžioje – butonizacijos ir žydėjimo fazėse – matavimai atlikti kas 10-15 dienų, vėliau – kas 20 dienų. Gauti duomenys apdoroti programa Statistika 5.0.

#### **Kanadinės jakšūnės požeminės dalies augimo stebėjimai ir matavimai.**

Kanadinės jakšūnės šaknys buvo tiriamos ketvirtaisiais ir penktaisiais vegetacijos metais. Tyrimai atlikti vegetacijos pabaigoje (spalio mėn.). Augalo požeminė dalis tirta tranšėjiniu metodu ir nufotografuota skaitmeniniu fotoaparatu. Šaknies ilgio ir pločio matavimai buvo atlikti klasikiniu būdu (su liniuote) bei vaizdų analizės metodu.

Vaizdų analizės metodas pritaikytas pasinaudojant kompiuterine programa ACD FotoCanvas. Augalų šaknų skaitmeninės nuotraukos pirmiausia buvo apdorojamos naudojant įrankį *Magic Wand*. Jo pagalba buvo automatiškai pažymimi pasirinktos spalvos taškai, kurie sudaro šaknies vaizdą. Vėliau įrankio *Fill* pagalba pažymėtiems nuotraukos taškams buvo suteikta vienoda spalva. Kadangi šaknys buvo fotografuotos ant milimetrinio popieriaus, tai su įrankiu *Line* ir *Text* buvo nubraižyta skalė su 50 mm atstumu atitinkančiomis atžymomis. Galiausiai pasinaudojant įrankiais *Levels* bei *Auto Levels* šaknies vaizdai buvo suteikta kontrastinė juoda spalva ir baltas fonas. Tokie šaknų morfologiniai vaizdai buvo išsaugoti “JPG” failų plėtimu. Remiantis šiais šaknų paveikslėliais galima tiksliai nusakyti šaknų tipą, ilgį bei plotį.



**8 pav. Ketvirtųjų auginimo metų kanadinės jakšūnės auginimo laukas žydėjimo metu.**

#### **Laboratoriniai sėklų daigumo tyrimai.**

Kanadinės jakšūnės sėklų daigumas buvo nustatinėjamas vadovaujantis J. Dagio metodika. Tyrimui buvo imta po 100 sėklų ir bandymas kartojamas 4 kartus. Sėklos buvo išlukštentos ir laikomos kambario temperatūroje.

Tyrimui sunaudota 1600 vnt. sėklų. Pusė šio kiekio (800 vnt.) 3 mėn. buvo laikoma šaldytuve +4 °C temperatūroje, praviruose plastikiniuose maišeliuose.

400 šaldytų ir 400 nešaldytų sėklų buvo skarifikuota - 15 min. laikyta koncentruotoje sulfato rūgštyje. Tada sėklos plautos distiliuotu vandeniu iki neutralios reakcijos pagal lakmuso popierėlį.

Po 100 vnt. sėklų daiginta Petri lėkštelėse. Lėkštelės dezinfekuotos etanoliu (96 % V/V), o jų dugne ištiesta keletas sluoksnių filtro popieriaus, kuris kiekvieną dieną drėkintas distiliuotu vandeniu.

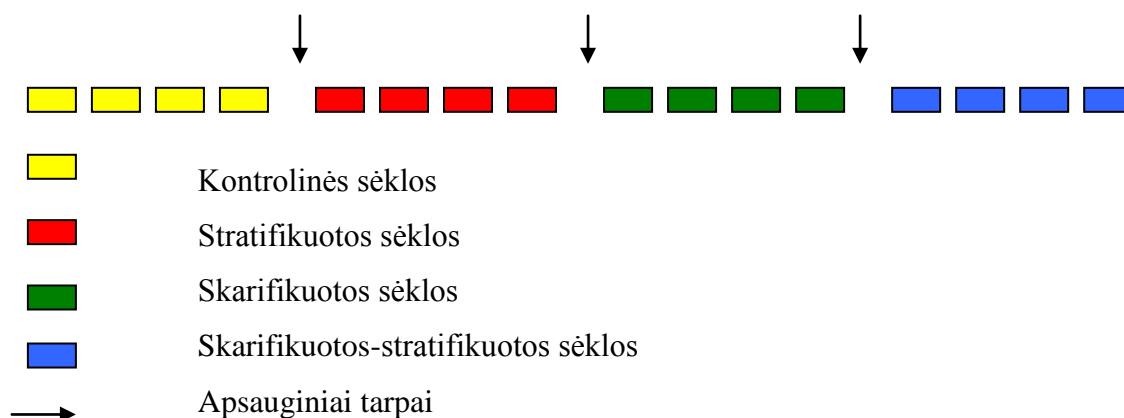
- a) 4-iose Petri lėkštelėse daigintos stratifikuotos (šaldytos) sėklos;
- b) 4-iose lėkštelėse – skarifikuotos (paveiktos 15 min. koncentruota sulfato rūgštimi) sėklos;
- c) 4-iose – stratifikuotos (šaldytos) ir skarifikuotos (paveiktos 15 min. koncentruota sulfato rūgštimi) sėklos;
- d) 4-iose Petri lėkštelėse daigintos nešaldytos sėklos (kontrolinis bandymas).

Visos Petri lėkštelės buvo laikytos termostate, pastovioje 23 °C temperatūroje. Sėklos stebėtos kiekvieną dieną, sudygusios sėklos buvo suskaičiuojamos ir išrenkamos pincetu. Sėkloms nustojus dygti, jos dar buvo stebimos dvi savaites ir jei daugiau sėklų nebesudygsta bandymas pabaigiamas.

Sėklų daigumo bandymai buvo atlikti su 2005 ir 2006 m. rinktomis sėklomis.

### Sėklų, surinktų 2005 m. daigumo bandymai dirvožemyje.

*Desmodium canadense* (L.) DC. ketvirtųjų vegetacijos metų sėklų daigumo dirvožemyje bandymai atlikti Kaune, VDU Kauno botanikos sode. Bandymų ploto dirvožemis – velėninis glėjiškas vidutinio sunkumo priemolis, netreštas, nusaustas uždaru drenažu.



### 9 pav. Daigumo bandymų ploto išplanavimas.

Tyrimui buvo imta po 100 sėklų ir bandymas kartojamas 4 kartus. Sėklos buvo išlukštentos ir laikomos kambario temperatūroje. Tyrimui sunaudota 1600 vnt. sėklų. Pusė šio kiekio (800 vnt.) 3 mėnesius buvo laikoma šaldytuve +4 °C temperatūroje, praviruose plastikiniuose maišeliuose. 400 šaldytų ir 400 nešaldytų sėklų buvo skarifikuota - 15 min. laikyta koncentruotoje sulfato rūgštyje. Vėliau sėklos plautos distiliuotu vandeniu iki neutralios reakcijos pagal lakmuso popierėlį.

Sėklos suskaičiuotos po 100 vnt. ir pasėtos 1m ilgio dirvožemio ploteliuose, tarp kurių daryti 0,5 m apsauginiai tarpai (9 pav.).

- a) 4-iuose 1m ilgio ploteliuose pasėtos nestratifikuotos sėklos (kontrolinis bandymas);
- b) 4-iuose ploteliuose – stratifikuotos (šaldytos) sėklos;
- c) 4-iuose – skarifikuotos (paveiktos 15 min. koncentruota sulfato rūgštimi) sėklos;
- d) 4-iuose - stratifikuotos (šaldytos) ir skarifikuotos (paveiktos 15 min. koncentruota sulfato rūgštimi) sėklos.

Tiriamieji ploteliai buvo stebimi kas antrą dieną ir laistomi pagal poreikį. Išdygę daigeliai buvo suskaičiuojami ir išraunami. Sėkloms nustojus dygti, jie dar stebimi dvi savaites ir jei daugiau sėklų nebeišdygsta bandymas laikomas pabaigtu.

### **Kanadinės jakšūnės fitocheminis tyrimas.**

Fitocheminė analizė atlikta tiriant penktaisiais kultivavimo metais surinktą kanadinės jakšūnės žaliavą.

Žaliava rinkta:

- Butonizacijos tarpsnyje;
- Žydėjimo pradžioje;
- Žydėjimo tarpsnyje;
- Vaisių brandos pradžioje;
- Pilnos vaisių brandos metu.

Fitocheminis tyrimas buvo atliekamas visose vegetacijos fazėse, tiriant skirtingas augalo dalis: žolę, lapus, stiebus, pumpurus, žiedus, vaisius, sėklas. Taip pat tirtos ketvirtųjų ir penktųjų kanadinės jakšūnės auginimo metų vegetacijos pabaigoje iškastos šaknys.

Buvo atsverta 0,5g (tikslus svėrinys) susmulkintos žaliavos ir užpilta 25 ml 70 % (V/V) etanolio. Užkimšus palikta ekstraguotis 6 valandom. Po to ištrauka filtruota į 25 ml talpos kolbutę ir skiesta 70 % (V/V) etanoliumi iki brūkšnio.

Fitocheminė analizė atlikta efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

Analizei atlikti naudotas chromatografas Waters 2690 su dviem detektoriais: Waters 2487 UV/Vis ir Waters 996 PDA (Waters, JAV), kolonėlė "XTerra RP 18" 3,5 μm (0,15 m x 3,9 mm). Tyrimui atlikti injekuota 10 μl bandinio. Bandinio komponentai buvo atskirti naudojant tirpiklių sistemą sudarytą iš 95 % 0,1 % trifluoracto rūgštimi (C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) parūgštinto vandens (tirpiklis A) ir 5 % 0,1 % trifluoracto rūgštimi parūgštinto acetonitrilo (tirpiklis B). Buvo atliekama gradientinė eliucija: 0–45 min. 95→55 % A, 5→45 % B; 45–50 min. 55 % A, 45 % B; 50–55 min. 55→95 % A, 45→5 % B. Eliuento tėkmės greitis – 0,4 ml/min. Kolonėlės temperatūra 20 °C. Eliucija buvo vykdoma esant 360 nm bangos ilgiui. Flavonoidų ir fenolinių rūgščių tapatybė nustatyta lyginant analizių sulaikymo trukmes su standartų sulaikymo trukmėmis ir spektrais, gautais su PDA detektoriumi.

## 4. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

### 4.1 Kanadinės jakšūnės antžeminės dalies augimo tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

#### 4.1.1 Kanadinės jakšūnės antžeminės dalies augintos natūraliomis sąlygomis

##### ketvirtaisiais vegetacijos metais augimo ypatumai

2003 m. gegužės mėnesį buvo pasodinta 279 vienetai vienerių metų kanadinės jakšūnės sodinukų trimis eilėmis vienodais 50 cm atstumais tarp augalų ir 70 cm pločio tarpueiliais. Trečiaisiais vegetacijos metais augalai gausiai suvešėjo ir nebeišsiteko jiems skirtame plote. Tai sutrikdė jų augimą ir vystymąsi. Todėl 2005 m. gegužės mėnesį augalai buvo retinami, eilėse paliekant kas antrą augalą. Po retinimo liko 138 *Desmodium canadense* (L.) augalai, o atstumai tarp augalų eilėse padidėjo iki 100 cm.

Vegetacijos pradžioje – butonizacijos ir žydėjimo fazėse – matavimai atlikti kas 10-15 dienų, vėliau – kas 20 dienų. Buvo matuojamas stiebų aukštis, skaičiuojamas stiebų bei lapų kiekis ir išaugusio augalo santykinis projekcinis plotas. Tyrimų rezultatai pateikiami 1 ir 2 lentelėse.

1 lentelė. Ketvirtųjų vegetacijos metų (2005 m). kanadinės jakšūnės vidutinė augimo dinamika (augalo matmenų pokyčiai)

Data	Aukštis, cm	Santykinis projekcinis plotas, m <sup>2</sup>
	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$
Vegetacija	30,43 ± 2,27	-
Butonizacija	70,51 ± 8,86	0,59 ± 0,17
Žydėjimas	112,67 ± 9,20	1,19 ± 0,39
Vaisių brandos pradžia	127,13 ± 7,83	1,55 ± 0,44
Pilna vaisių branda	129,00 ± 7,79	1,60 ± 0,43
Vegetacijos pabaiga	128,83 ± 7,90	1,69 ± 0,43

Pastaba:  $\bar{X} \pm S_x$  – aritmetinis vidurkis ± vidutinis kvadratinis nuokrypis.

Išanalizavus pateiktus duomenis matyti, kad ketvirtaisiais vegetacijos metais kanadinės jakšūnės užaugo iki 1,29 m aukščio, vidutiniškai užaugino po 26-27 stiebus ant kurių kiekvieno vidutiniškai išaugo po 35 lapus. Ketvirtaisiais vegetacijos metais augalai sparčiai augo ir sudarė 1,69 m<sup>2</sup> santykinį projekcinį plotą, todėl viršijo 1 m atstumą tarp augalų, paliktą juos retinant ir ėmė užgožti vienas kitą.

**2 lentelė. Ketvirtųjų vegetacijos metų (2005 m.) kanadinės jakšūnės vidutinė augimo dinamika (augalo stiebų ir lapų kiekybiniai pokyčiai)**

Data	Stiebų skaičius	Lapų skaičius
	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$
<b>Vegetacija</b>	24,83 ± 5,04	154,5 ± 29,16
<b>Butonizacija</b>	26,33 ± 5,54	417,17 ± 74,49
<b>Žydėjimas</b>	26,67 ± 5,57	710,83 ± 134,10
<b>Vaisių brandos pradžia</b>	26,67 ± 5,57	889,00 ± 162,39
<b>Pilna vaisių branda</b>	26,67 ± 5,57	916,00 ± 153,00
<b>Vegetacijos pabaiga</b>	26,83 ± 5,42	917,67 ± 154,12

Pastaba:  $\bar{X} \pm S_x$  – aritmetinis vidurkis ± vidutinis kvadratinis nuokrypis.

Buvo tiriamas kanadinių jakšūnių augimo intensyvumas viso augalų vegetacijos periodo metu. Tyrimo rezultatai pateikiami 3 lentelėje. Iš nurodytų duomenų matyti, kad intensyviausiai ketvirtaisiais vegetacijos metais augalai augo vegetacijos pradžioje (05.06.03-05.06.30), kai augimo intensyvumas siekė net 131,71 %. Vegetacijos pabaigoje augimas tapo neigiamas (-0,13%), nes augalai išgulė.

**3 lentelė. Ketvirtųjų vegetacijos metų (2005 m.) *D. canadense* (L.) stiebų aukščio augimo intensyvumas**

Augimo periodas	05.06.03-05.06.30 Vegetacija	05.06.30-05.07.15 Butonizacija	05.07.15-05.07.29 Žydėjimas	05.07.29-05.08.26 Vaisių brandimas	05.08.26-05.09.09 Vegetacijos pabaiga
Augimo intensyvumas, %	131,71	59,79	12,83	1,47	-0,13

#### **4.1.2 Kanadinės jakšūnės antžeminės dalies augintos natūraliomis sąlygomis penktaisiais vegetacijos metais augimo ypatumai**

Dėl šaltos 2005-2006 m. žiemos (sausio mėn. oro temperatūra -30 °C ir buvo susiformavęs plonas sniego dangos sluoksnis) 6 kanadinių jakšūnių augalai iššalo.

2006 m. buvo tiriama *Desmodium canadense* (L.) augimo dinamika penktaisiais vegetacijos metais. Vegetacijos pradžioje – butonizacijos ir žydėjimo fazėse – matavimai atlikti kas 10-15

dienų, vėliau – kas 20 dienų. Buvo matuojamas stiebų aukštis, skaičiuojamas stiebų skaičius, lapų kiekis bei santykinis augalo projekcinis plotas. Tyrimų duomenys pateikiami 4 ir 5 lentelėse.

**4 lentelė. 2006 m. kanadinių jakšinių vidutinė aukščio ir projekcinio ploto kitimo dinamika**

Data	Aukštis, cm	Santykinis projekcinis plotas, m <sup>2</sup>
	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$
<b>Vegetacija</b>	28,32 ± 2,49	0,11 ± 0,02
<b>Butonizacija</b>	92,15 ± 12,81	1,02 ± 0,24
<b>Žydėjimas</b>	126,45 ± 12,75	1,42 ± 0,34
<b>Vaisių brandos pradžia</b>	144,10 ± 13,73	1,88 ± 0,57
<b>Pilna vaisių branda</b>	145,27 ± 13,73	2,07 ± 0,67
<b>Vegetacijos pabaiga</b>	145,88 ± 13,38	2,01 ± 0,55

Pastaba:  $\bar{X} \pm S_x$  – aritmetinis vidurkis ± vidutinis kvadratinis nuokrypis.

**5 lentelė. 2006 m. kanadinės jakšūnės vidutinė stiebų ir lapų skaičiaus kitimo dinamika**

Data	Stiebų skaičius	Lapų skaičius
	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$
<b>Vegetacija</b>	47,33 ± 14,26	319,00 ± 64,82
<b>Butonizacija</b>	49,17 ± 14,44	758,50 ± 196,90
<b>Žydėjimas</b>	49,50 ± 14,01	1173,50 ± 327,70
<b>Vaisių brandos pradžia</b>	49,50 ± 14,01	1351,00 ± 327,50
<b>Pilna vaisių branda</b>	49,67 ± 13,81	1367,50 ± 337,06
<b>Vegetacijos pabaiga</b>	49,67 ± 13,81	1371,83 ± 335,35

Pastaba:  $\bar{X} \pm S_x$  – aritmetinis vidurkis ± vidutinis kvadratinis nuokrypis.

Iš 4 ir 5 lentelėse pateiktų duomenų matyti, kad penktaisiais vegetacijos metais augalai išaugo iki 1,45 m aukščio, užaugino vidutiniškai po 49-50 stiebų, t.y. beveik 2 kartus daugiau nei ketvirtaisiais vegetacijos metais, o santykinis projekcinis plotas vegetacijos pabaigoje buvo 2 m<sup>2</sup>. Kiekvienas stiebas vidutiniškai išaugino po 28 lapus, t.y. 20 % mažiau nei ketvirtaisiais vegetacijos metais. Penktaisiais vegetacijos metais augalai dar labiau sutankėjo ir užgožė vienas kitą, nes neišsiteko jiems skirtame plote.

**6 lentelė. Penktųjų vegetacijos metų kanadinės jakšūnės stiebų aukščio augimo intensyvumas**

Augimo periodas	06.05.29- 06.06.29 Vegetacija	06.06.29- 06.07.13 Butonizacija	06.07.13- 06.07.27 Žydėjimas	06.07.27- 06.08.24 Vaisių brendimas	06.08.24- 06.09.07 Vegetacijos pabaiga
Augimo intensyvumas, %	225,39	37,22	13,96	0,81	0,42

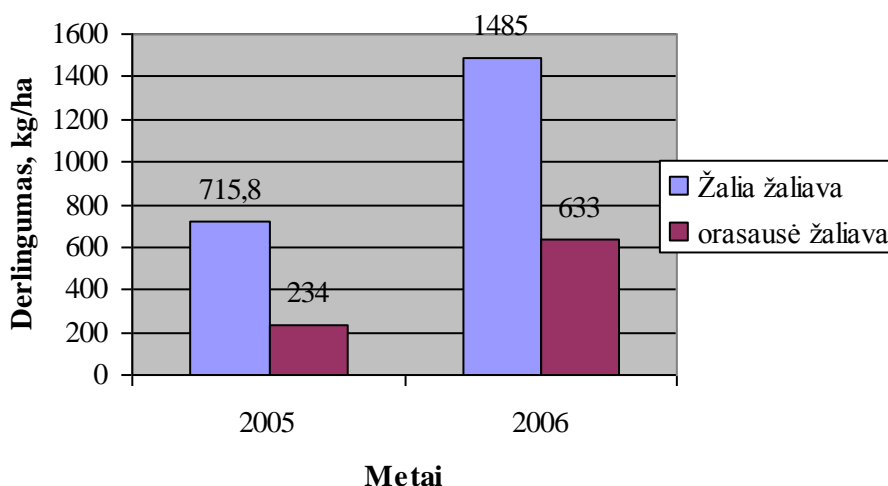
6 lentelėje pateikiami duomenys atspindi penktųjų vegetacijos metų augalų aukščio augimo intensyvumą. Sparčiausiai augalai augo vegetacijos pradžioje (06.05.29-06.06.29). Augimo intensyvumas tuo laikotarpiu siekė 225,39 %, t.y. 42 % buvo intensyvesnis nei ketvirtaisiais vegetacijos metais tuo pačiu laikotarpiu.

**Kanadinės jakšūnės derlingumo tyrimas**

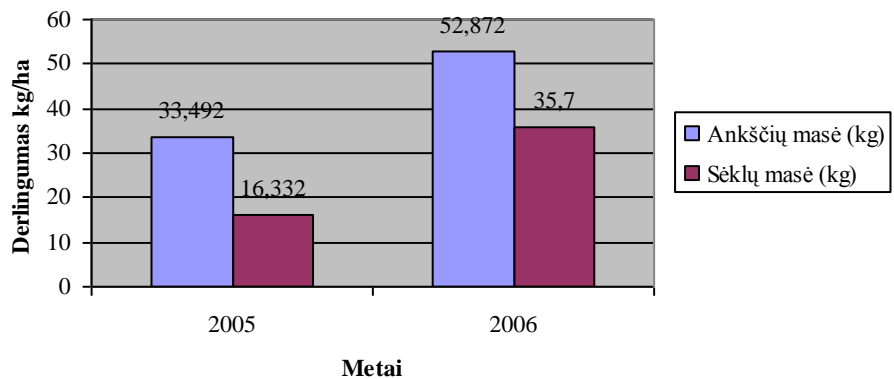
Kanadinės jakšūnės žaliavos derlingumas buvo nustatomas tiriamajame plote nupjaunant 10 vidutinio dydžio nepažymėtų augalų antžeminę dalį. Buvo pasverta žalia ir orasausė žaliava ir apskaičiuotas derlingumas. Gauti duomenys pateikti 10 paveiksle. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad penktaisiais vegetacijos metais žalios žaliavos gauta dvigubai daugiau, o orasausės net 2,7 karto daugiau.

Taip pat buvo skaičiuotas sėklų derlingumas. Nuo šešių augalų surinktos prinokusios ankštys ir pasvertos. Gauti rezultatai pavaizduoti 11 paveiksle. Vėliau pasvertos išlukštentos sėklos. 2006 metais ankščių surinkta 1,5 karto daugiau, o sėklų – 2,2 karto daugiau nei 2005 m.

Žymų žaliavos ir sėklų derlingumo padidėjimą lėmė tai, kad penktaisiais vegetacijos metais augalai labai suvešėjo ir jų stiebų skaičius padidėjo dvigubai.



**10 pav. Žaliavos derlingumo dinamika.**



### 11 pav. Sėklų derlingumo dinamika.

#### Išvados:

1. Penktaisiais vegetacijos metais kanadinė jakšūnė išaugo 1,12 karto aukštesnė ir užaugino 46 % daugiau stiebų lyginant su ketvirtais vegetacijos auginimo metais.
2. Penktaisiais auginimo metais žaliavos derlingumas padidėjo 2,7 karto, o sėklų 2,2 karto.
3. Tikslinga tęsti augalo biologinių savumų tyrimus ir surinkti kelerių metų duomenis.

#### 4.2 *Desmodium canadense* (L.) DC. šaknų morfologijos tyrimas

Kanadinės jakšūnės šaknų sistema tirta tranšėjiniu metodu. Pirmaisiais ir antraisiais vegetacijos metais šaknų sistema yra liemeninio tipo, o trečiaisiais metais pakinta į šakotinį.

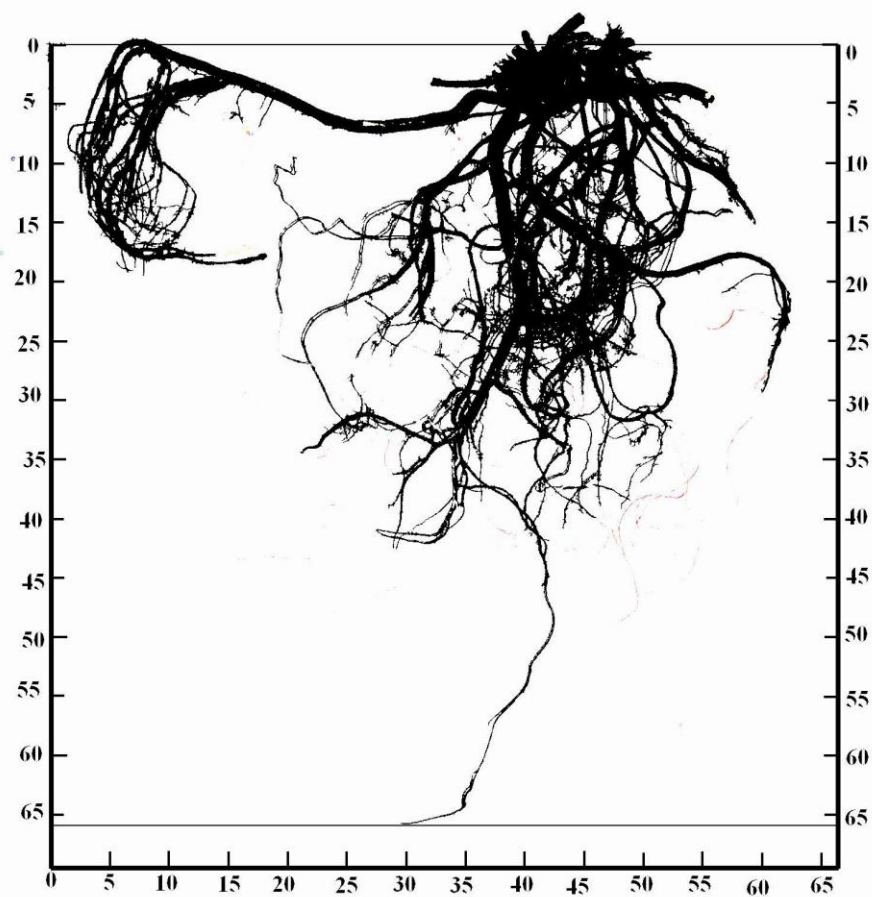
12 ir 13 paveiksluose matomas kanadinės jakšūnės šaknies vaizdas ketvirtųjų vegetacijos metų pabaigoje – spalio mėnesį. Šaknis yra šakotinio tipo, apytiksliai 66 cm ilgio ir 63 cm pločio. Pastebimi gumbeliai, kuriuose būna bakterijos, kaupiančios azotą. Ketvirtųjų vegetacijos metų pradžioje buvo atliktas augalų retinimas, todėl buvo pažeista šaknų sistema. Tokiu būdu galėjo būti įtakotas morfologinis šaknų vystymasis. Pateikiama atsitiktinai parinkto augalo šaknis.

14 ir 15 paveiksluose pavaizduota *Desmodium canadense* (L.) DC. šaknis penktųjų vegetacijos metų rudenį. Šaknų sistema šakotinė. Šoninės šaknys išsidėsčiusios įvairiomis kryptimis, dalis jų tęsiasi horizontaliai, kitos išsilenkusios lanku skverbiasi gilyn į žemę, palaipsniui plonėdamos. Šaknis vidutiniškai išaugo iki 49 cm ilgio ir 81 cm pločio. Šaknies plotis padidėjo 1,29 karto. Pateikiama atsitiktinai parinkto augalo šaknis.

16 paveiksle pateikiamas ketvirtųjų ir penktųjų vegetacijos metų kanadinės jakšūnės šaknų sistemos vaizdas vienoje skalėje, kad galima būtų tiksliau įvertinti morfologinius pokyčius.



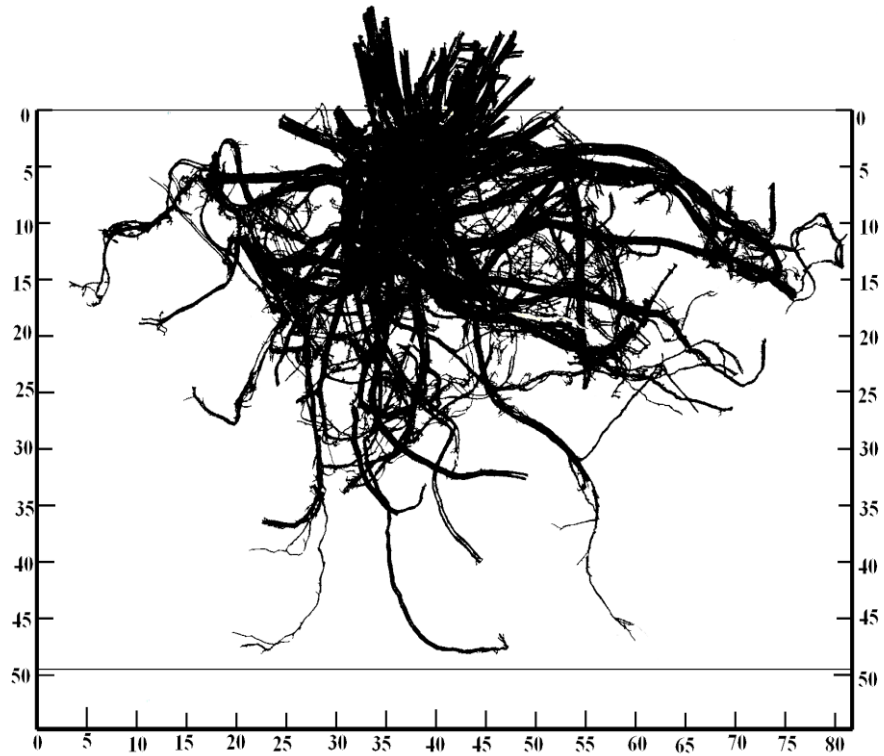
12 pav. Ketvirtųjų vegetacijos metų kanadinės jakšūnės šaknų sistema



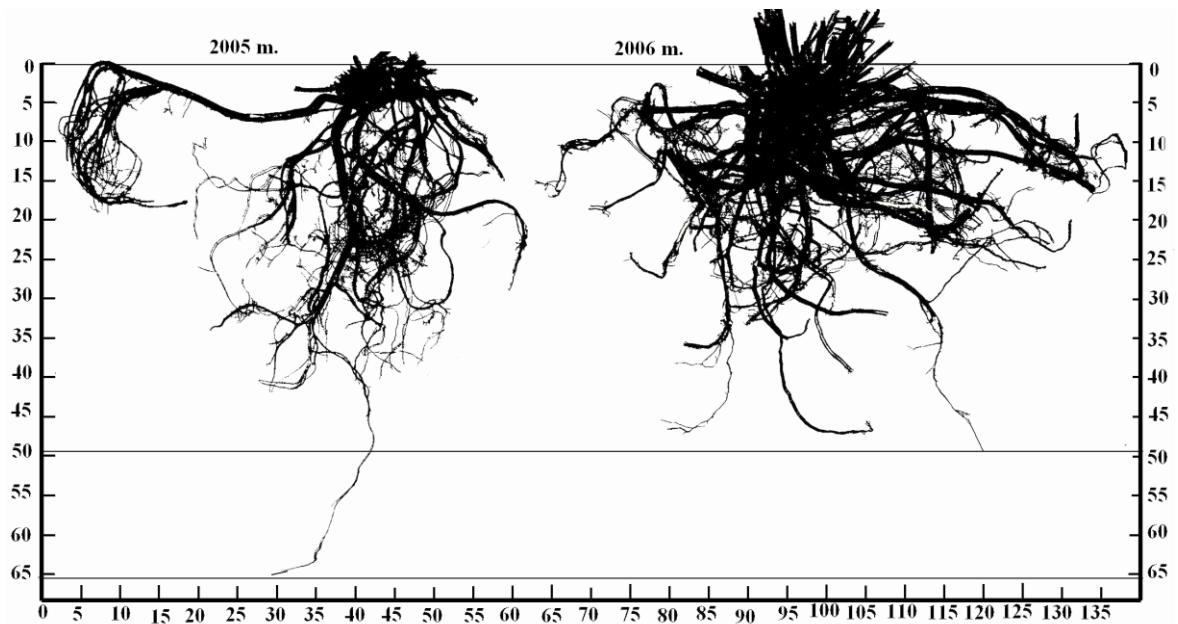
**13 pav. Ketvirtuju vegetācijas metu kanadinēs jaksūnēs šakņu sistēma**



**14 pav. Penktuju vegetācijas metu kanadinēs jaksūnēs šakņu sistēma**



15 pav. Penktųjų vegetacijos metų kanadinės jakšūnės šaknų sistema



16 pav. Palyginamasis *Desmodium canadense* (L.) DC. šaknų sistemos vystymosi vaizdas

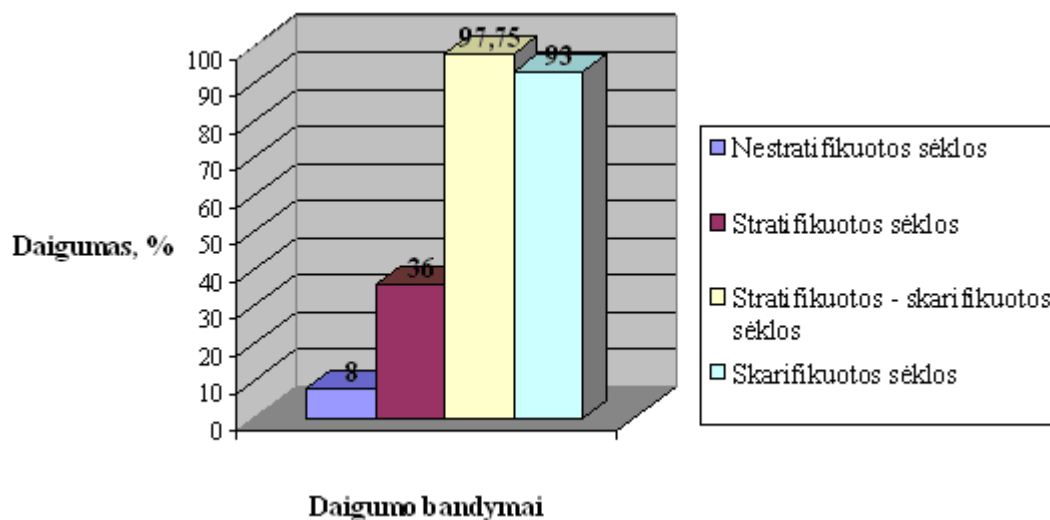
**Išvados:**

1. Ketvirtaisiais vegetacijos metais kanadinės jakšūnės šaknų sistema yra šakotinio tipo.
2. Penktaisiais vegetacijos metais susiformuoja dar daugiau šoninių šaknų – šaknų sistema šakotinio tipo.

### 4.3. Sėklų daigumo tyrimai

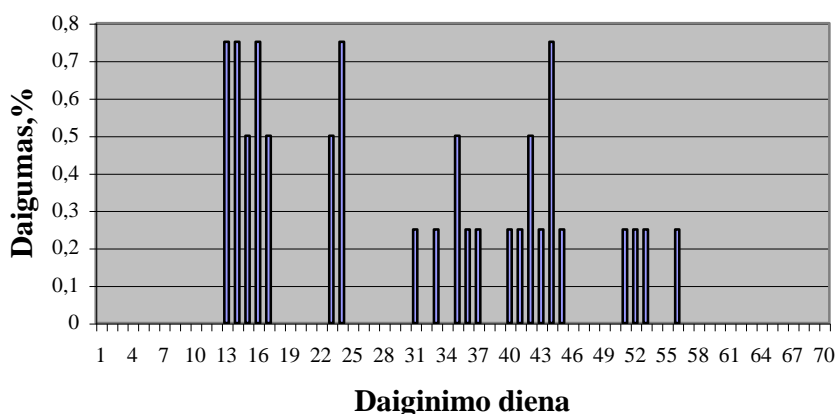
#### 4.3.1 Sėklų daigumas laboratorijoje

2003 m. atlikti daigumo bandymai parodė, kad kanadinės jakšūnės sėklos tais pačiais metais pasėtos į dirvą dygsta labai sunkiai. Daigumą nuspręsta tirti laboratorinėmis sąlygomis. Daigumui pagerinti buvo taikyti skarifikavimo ir stratifikavimo metodai.



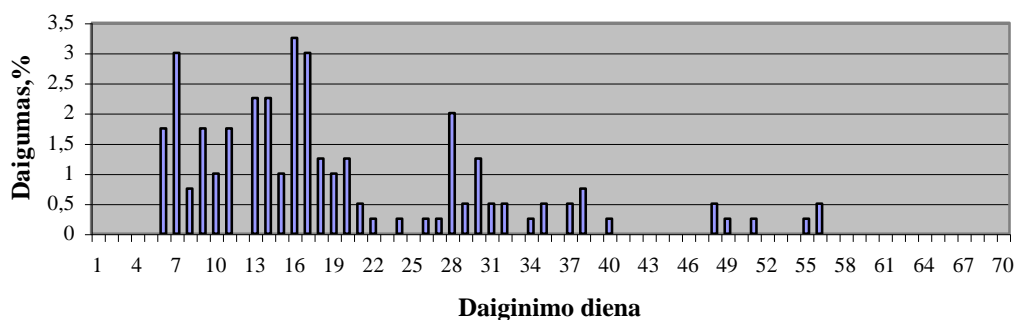
#### 17 pav. 2005 m. surinktų kanadinių jakšūnių sėklų daigumas, %

Kanadinių jakšūnių sėklų daigumo duomenys pateikiami 17 paveiksle, iš kurių matyti, kad stratifikavimas sėklų daigumą padidina 4,5 karto, skarifikavimas – 11,63 karto, o skarifikavimas ir stratifikavimas – 12,22 karto, lyginant su nestratifikuotomis sėklomis.



#### 18 pav. 2005 m. surinktų kanadinių jakšūnių nestratifikuotų sėklų vidutinis daigumas

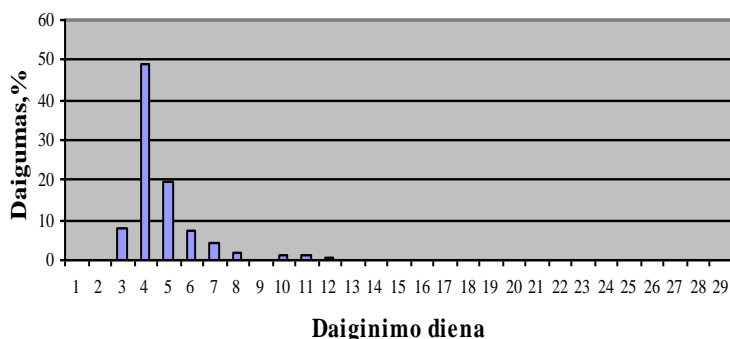
Nestratifikuotos kanadinių jakšūnių sėklos pradėjo dygti 13 eksperimento dieną. Dygimo procesas tęsėsi 44 dienas, iš viso sudygo 8% nestratifikuotų sėklų (18 pav.).



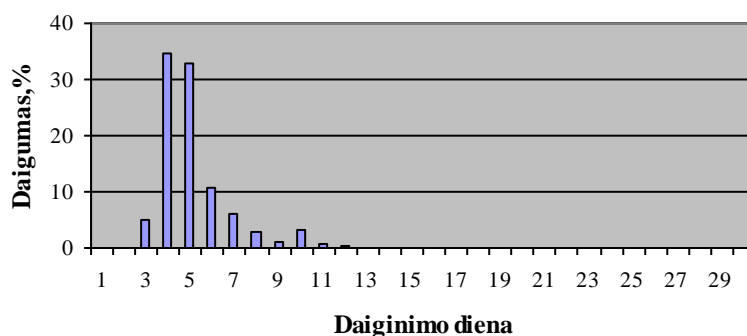
**19 pav. 2005 m. surinktų kanadinių jakšūnių stratifikuotų sėklų vidutinis daigumas**

Vadovaujantis pateikta metodika, stratifikavus *Desmodium canadense* sėklas, per 71 dieną jų sudygo 36%. Intensyvus dygimas tęsėsi nuo 6 iki 22 eksperimento dienos (19 pav.). Stratifikavimas dygimo procesą pagreitino 4,5 karto, lyginant su nestratifikuotomis sėklomis.

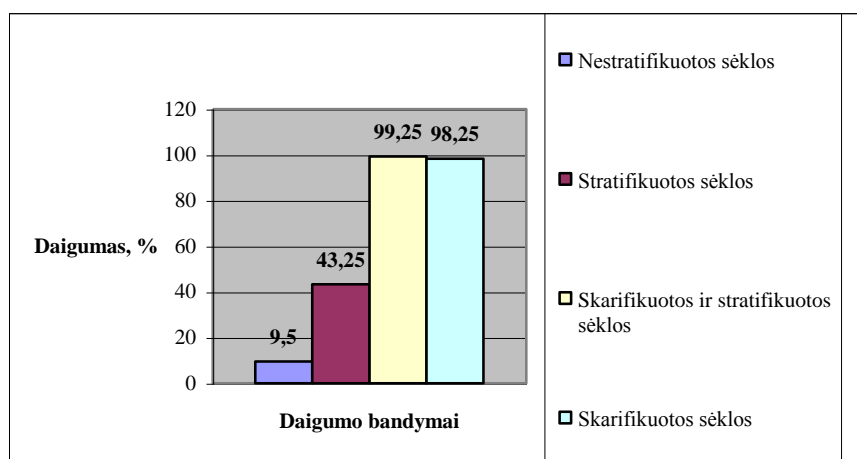
Geriausių rezultatų pasiekta, panaudojus skarifikavimo metodą (kai sėklos prieš daiginimą 15 min. veikiamos koncentruota sulfato rūgštimi, o paskui išplaunamos vandeniui). Skarifikuotos ir stratifikuotos - stratifikuotos sėklos pradėjo dygti jau 3 eksperimento dieną, o dygimo procesas tęsėsi tik 10 dienų. Per 31 bandymo dieną sudygo 93% skarifikuotų ir net 97,75 % skarifikuotų – stratifikuotų sėklų (20-21 pav.).



**20 pav. 2005m. surinktų skarifikuotų ir stratifikuotų sėklų vidutinis daigumas**



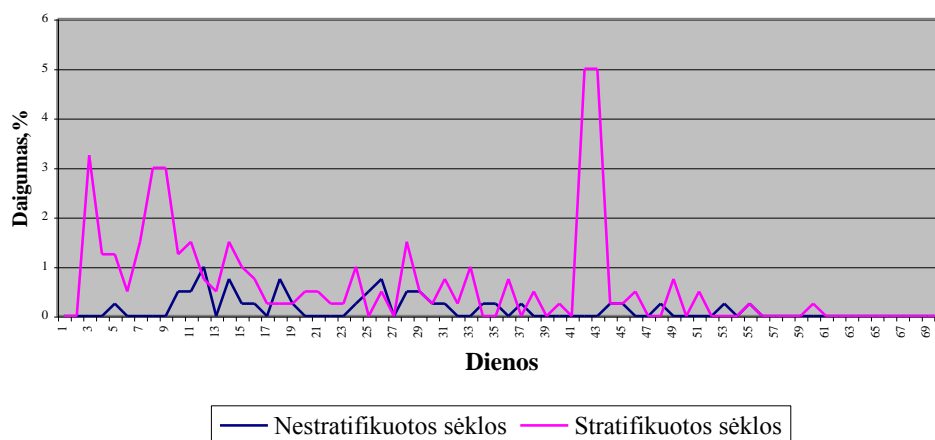
**21 pav. 2005 m. surinktų skarifikuotų sėklų vidutinis daigumas**



**22 pav. 2006 m. surinktų kanadinių jakšūnių sėklų vidutinis daigumas %**

Bandymas buvo pakartotas su 2006 m. surinktomis kanadinės jakšūnės sėklomis. Stratifikuotos sėklos sudygo 4,55 karto intensyviau, skarifikuotos – 10,34 karto intensyviau, o skarifikuotos ir stratifikuotos – 10,45 karto intensyviau už kontrolines (22 pav.).

Greičiausiai ir intensyviausiai dygsta skarifikuotos bei skarifikuotos – stratifikuotos *Desmodium canadense* (L.) DC. sėklos. Stratifikavimas padidino sėklų daigumą, bet ne taip žymiai kaip skarifikavimas lyginant su kontrolinėmis nestratifikuotomis sėklomis (23 pav.).

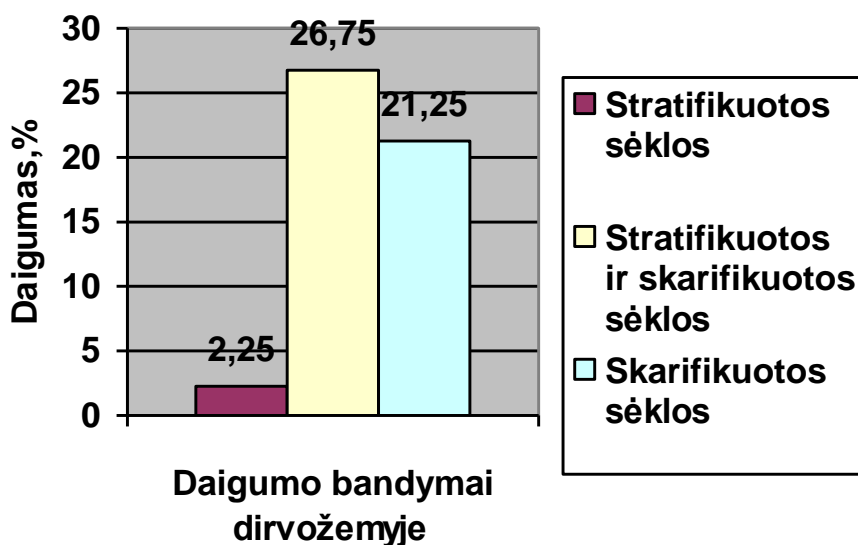


**23 pav. 2006 m. surinktų kanadinių jamšūnių sėklų daigumo dinamika**

**Išvados:**

1. Skarifikavimas kanadinės jakšūnės sėklų daigumą pagerina 10,98 karto, o stratifikavimas – 4,5 karto, skarifikuotos ir stratifikuotos sėklos dygsta 11,33 karto intensyviau nei kontrolinės.
2. Paveikus koncentruota sulfato rūgštimi (skarifikuotos), sėklos sudygsta 5 kartus greičiau.
3. Laboratorinėmis sąlygomis daiginant kanadinės jakšūnės sėklas, greičiausias ir efektyviausias metodas yra skarifikavimas.

#### 4.3.2 Sėklų surinktų 2005 m., daigumo tyrimai dirvožemyje



24 pav. 2005 m. surinktų *Desmodium canadense* sėklų daigumo bandymų dirvožemyje rezultatai.

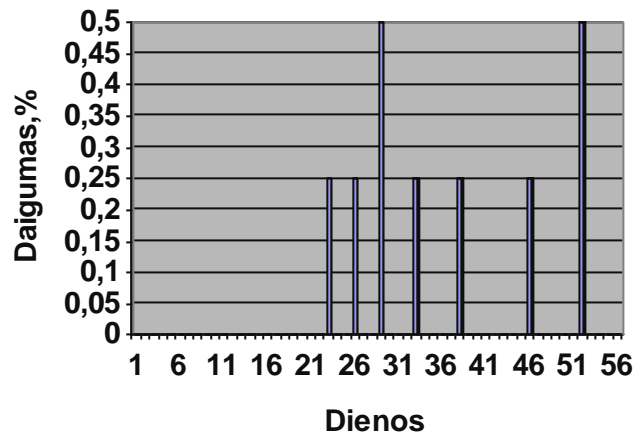
Kanadinių jakšūnių sėklos dirvožemyje dygsta sunkiai. Nestratifikuotos – kontrolinės sėklos visai nesudygo. Stratifikuotų sėklų daigumas buvo vos 2,25 %, skarifikuotų sėklų – 21,25%. Geriausiai sudygo skarifikuotos – stratifikuotos sėklos, kurių daigumas siekė 26,75 % (24 pav.)

Stratifikuotos *Desmodium canadense* L. sėklos pradėjo dygti 23 bandymo dieną. Dygimo procesas tęsėsi 30 dienų (25 pav.).

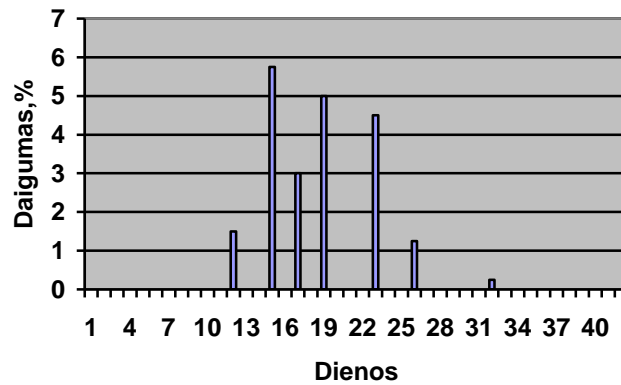
Sėklos, paveiktos koncentruota sulfato rūgštimi (skarifikuotos), pradėjo dygti 12 bandymo dieną (dvigubai greičiau nei stratifikuotos sėklos). Intensyviausias dygimo procesas buvo 15-19 eksperimento dienomis. Dygimo procesas truko 22 dienas (26 pav.).

Skarifikuotų – stratifikuotų sėklų sudygo daugiausiai – 26,75 %. Dygimas prasidėjo 12 eksperimento dieną ir tęsėsi 15 dienų (27 pav.).

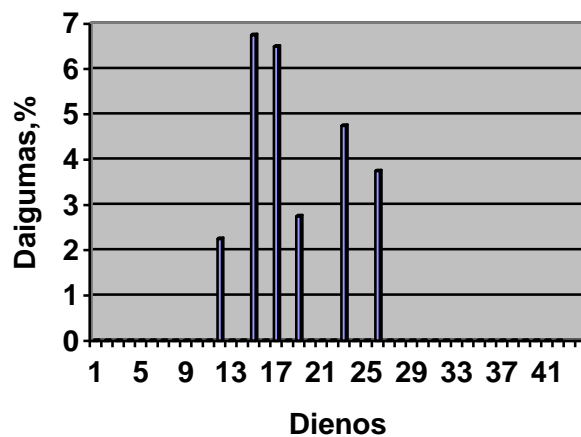
Sėklų dygimo intensyvumas pavaizduotas 28 paveiksle. Greičiausiai ir intensyviausiai dygsta skarifikuotos bei skarifikuotos – stratifikuotos *Desmodium canadense* L. sėklos. Stratifikuotų sėklų dygimo intensyvumas 12 kartų mažesnis nei skarifikuotų, o dygimo procesas tęsiasi dvigubai ilgiau.



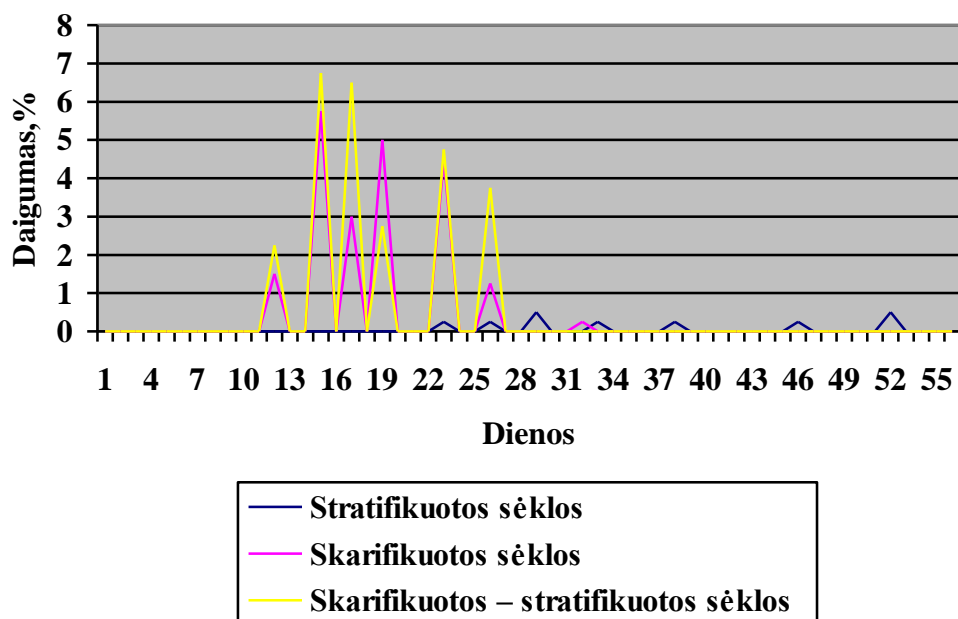
25 pav. 2005 m. surinktų stratifikuotų sėklų vidutinis daigumas dirvožemyje



26 pav. 2005 m. skarifikuotų sėklų vidutinis daigumas dirvožemyje



27 pav. 2005 m. skarifikuotų – stratifikuotų sėklų vidutinis daigumas dirvožemyje



28 pav. 2005 m. kanadinės jakšūnės sėklų daigumo dirvožemyje dinamika

**Išvados:**

1. Nestratifikuotos kanadinių jakšūnių sėklos dirvožemyje nesudygo.
2. Skarifikuotų sėklų sudygo 9,44 karto daugiau nei stratifikuotų.
3. Skarifikuotų – stratifikuotų sėklų sudygo 11,89 karto daugiau lyginant su stratifikuotom.
4. Koncentruota sulfato rūgštimi paveiktos sėklos (skarifikautos) pradėjo dygti dvigubai greičiau, o dygimo procesas sutrumpėjo dvigubai.
5. Skarifikavimas yra greičiausias ir efektyviausias metodas *Desmodium canadense* (L.) DC. sėklų daiginimui dirvožemyje.

#### 4.4 Fitocheminio penktųjų vegetacijos metų kanadinės jakšūnės tyrimo rezultatai ir jų aptarimas

Veikliųjų junginių ekstrakcijai naudotas etanolis. Pirmiausia buvo nustatyta kokios koncentracijos etanolio galima išekstraguoti didžiausią flavonoidų ir fenolkarboksirūgščių kiekį. Tuo tikslu buvo tirta butonizacijos fazėje surinkta žolė. Ekstrakcijai naudotas 50 %, 70 % ir 90 % (V/V) etanolis. Tyrimų duomenys pateikiami 7 lentelėje.

7 lentelė. Flavonoidų ir fenolinių rūgščių kiekis kanadinės jakšūnės žolėje ekstraguotoje 50 %, 70 % ir 90 % (V/V) etanolio

Nr.	Pavadinimas	Veikliųjų junginių kiekis, µg/g		
		50 % etanolis ( $\bar{X} \pm S_x$ )	70 % etanolis ( $\bar{X} \pm S_x$ )	90 % etanolis ( $\bar{X} \pm S_x$ )
1	Chlorogeno rūgštis	19,01±5,79	24,24±49,69	13,30±2,47
2	Kavos rūgštis	390,01±19,4	246,02±21,17	176,39±25,37
3	Viceninas	1891,47±43,81	1803,87±21,48	982,77±97,24
4	Orientinas	7577,78±332,19	6493,76±309,06	4206,84±296,71
5	Viteksino ramnozidas	89,05±6,71	99,75±52,86	66,64±14,28
6	Viteksinas	1867,65±70,54	1544,86±75,24	1038,67±17,31
7	Izoviteksinas	1615,41±93,71	1334,92±85,75	913,69±45,86
8	Rutinas	1662,30±34,82	938,09±7,11	773,02±92,06
9	Hiperozidas	94,52±6,17	73,28±3,69	41,15±2,44
10	Apigenin 7 glikozidas	6,06±2,15	195,76±7,27	138,31±6,85
11	Astragalinas	54,43±15,93	65,31±19,15	47,68±8,85
12	Kvercitrinas	10,05±8,63	21,38±7,78	10,99±2,41
13	Liuteolinas	6,69±0,73	10,01±1,04	5,04±1,67
14	Kvercetas	23,13±6,94	34,46±5,02	22,82±4,59
15	Apigeninas	7,98±1,62	21,82±6,54	9,17±2,13
16	Kemferolis	11,55±0,59	28,87±4,45	11,66±0,96

Pastaba:  $\bar{X} \pm S_x$  – aritmetinis vidurkis  $\pm$  vidutinis kvadratinis nuokrypis.

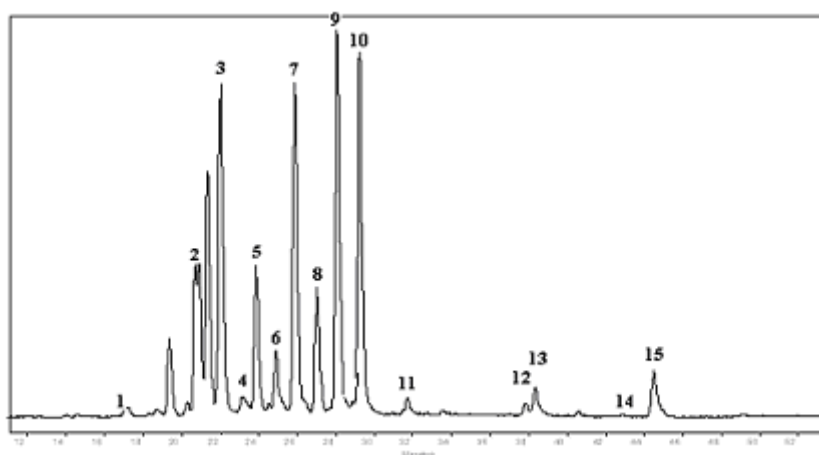
Išanalizavus gautus duomenis matyti, kad mažiausiai veiklių junginių išekstraguoja 90 % (V/V) etanolis. 50 % (V/V) etanolis išekstraguoja 1,17 karto daugiau orientino, 1,2 karto daugiau viteksino ir izoviteksino bei 1,77 karto daugiau rutino lyginant su 70 % (V/V). Tačiau 70 % (V/V) etanolio liuteolino išekstraguojama 1,5 karto daugiau, apigenino – 2,7 karto, kemferolio – 2,5 karto, kvercetino – 1,48 karto daugiau, nei su 50 % (V/V). Remiantis šiais duomenimis tolimesnei žaliavos ekstrakcijai pasirinktas 70 % (V/V) etanolis.

Nustačius ekstrakcijos sąlygas, buvo tirta veiklių junginių kaupimosi dinamika kanadinės jakšūnės žolėje ir atskiruose organuose vegetacijos proceso eigoje. Gauti rezultatai pateikti 8-12 lentelėse.

8 lentelė. Veikliųjų junginių kiekis butonizacijos fazėje

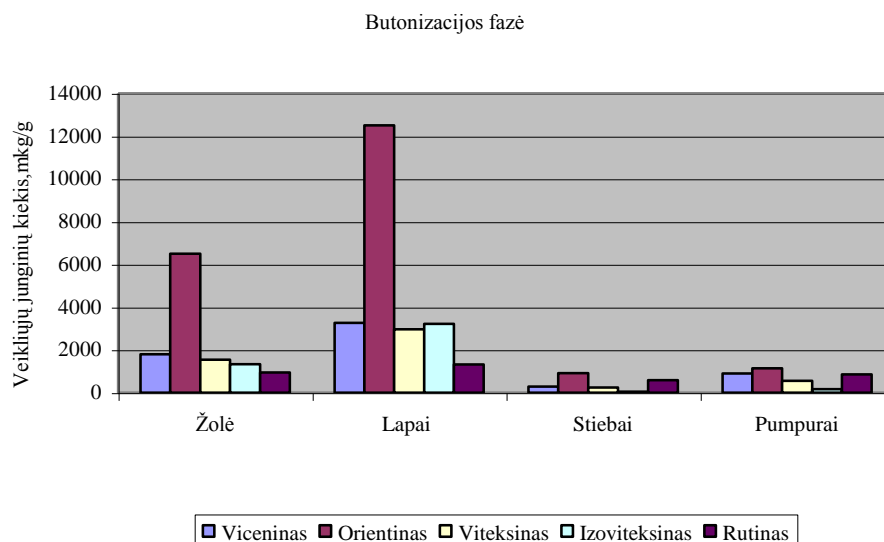
Nr.	Pavadinimas	Veikliųjų junginių kiekis, µg/g			
		Žolėje ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Lapuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Stiebuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Pumpuruose ( $\bar{X} \pm S_x$ )
1	Chlorogeno rūgštis	24,24±9,69	18,52±7,42	29,61±11,28	31,64±12,43
2	Kavos rūgštis	246,02±21,17	390,81±59,56	15,25±1,17	88,45±18,02
3	Viceninas	1803,87±21,48	3271,05±414,85	284,65±18,08	892,27±102,82
4	Orientinas	6493,76±309,06	12497,00±1640,08	913,71±32,45	1143,67±200,03
5	Viteksino ramnozidas	99,75±52,86	373,69±92,48	13,95±9,97	82,78±17,78
6	Viteksinas	1544,86±75,24	2970,78±445,81	241,96±21,94	548,02±74,03
7	Izoviteksinas	1334,92±85,75	3219,37±493,28	50,24±8,71	157,55±38,72
8	Rutinas	938,09±7,11	1323,69±441,04	586,07±67,99	858,85±36,82
9	Hiperozidas	73,28±3,69	23,64±7,06	102,97±14,43	137,95±8,97
10	Apigenin 7 glikozidas	195,76±7,27	104,51±17,96	40,62±6,44	295,30±37,22
11	Astragalinas	65,31±19,15	13,11±4,45	47,25±27,67	96,48±24,63
12	Kvercitrinas	21,38±7,78	47,19±1,98	3,49±2,39	34,00±12,51
13	Liuteolinas	10,01±1,04	8,72±0,97	4,96±1,23	24,36±3,79
14	Kvercetas	34,46±5,02	26,94±0,71	9,79±1,04	70,03±3,74
15	Apigeninas	21,82±6,54	30,57±4,79	7,69±20,2	27,23±4,51
16	Kemferolis	28,87±4,45	48,94±15,57	10,38±0,17	33,13±5,93

Pastaba:  $\bar{X} \pm S_x$  – aritmetinis vidurkis ± vidutinis kvadratinis nuokrypis.

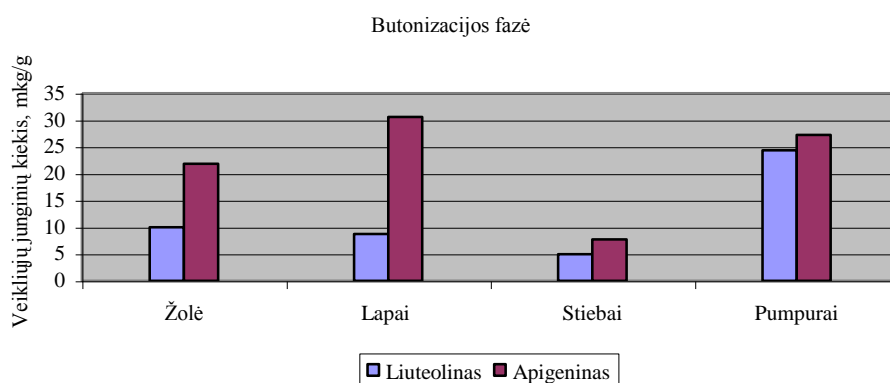


29 pav. Pumpurų chromatograma: 1-kavos rūgštis, 2-viceninas, 3-orientinas, 4-viteksino ramnozidas, 5-viteksinas, 6-izoviteksinas, 7-rutinas, 8-hiperozidas, 9-apigenin7glikozidas, 10-astragalinas, 11-kvercitrinas, 12-liuteolinas, 13-kvercetas, 14-apigeninas, 15-kemferolis

Daugiausia flavonoidų ir fenolinių rūgščių butonizacijos metu sukaupia lapai ir žolė. Mažiausiai veikliųjų junginių rasta stiebuose. Lapuose ypač gausu orientino, viteksino, izoviteksino (30 pav). Orientino lapuose sukaupia 1,9 kartus daugiau nei žolėje, 10 kartų daugiau nei pumpuruose ir net 13,67 karto daugiau nei stiebuose. Izoviteksino iš lapų išskirta 2,4 karto daugiau nei iš žolės, 20,43 karto daugiau nei iš pumpurų ir 64,08 karto daugiau nei iš stiebų. Liuteolino ir apigenino daugiausia sukaupia pumpurai (31 pav.). Apigenino gausu ir lapuose bei žolėje. Pumpuruose liuteolino butonizacijos metu sukaupiamas 2,79 karto daugiau nei lapuose. Pumpurų chromatogramos pavyzdys pateiktas 29 paveiksle.

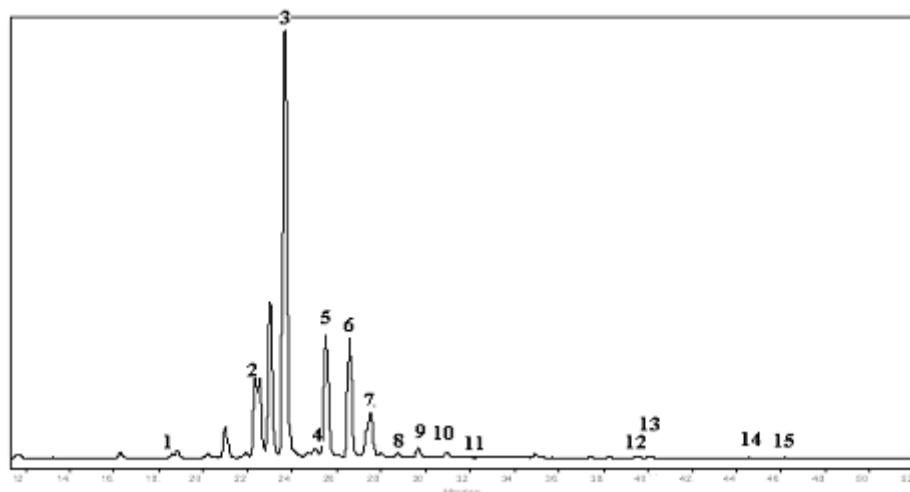


**30 pav. Veikliųjų junginių pasiskirstymas butonizacijos fazėje skirtinguose augalo organuose.**



**31 pav. Veikliųjų junginių kiekiai skirtinguose augalo organuose butonizacijos fazėje**

Žydėjimo pradžioje kaip ir butonizacijos fazėje veikliųjų junginių gausiausia lapuose ir žolėje, mažiausia – stiebuose (33-34 pav.). Apigenino daugiausia sukaupia besiskleidžiantys žiedai, lapai bei žolė, kur jo kiekis svyruoja apie 29  $\mu\text{g/g}$ . Liuteolino daugiausia rasta žieduose – 29,06  $\mu\text{g/g}$ , tai yra 2 kartus daugiau nei lapuose ir žolėje. Lapai, žolė ir stiebai daugiausia sukaupia orientino, vicenino, izoviteksino, o besiskleidžiantys žiedai – rutino ir orientino. Žolėje ir lapuose rutino rasta dvigubai mažiau nei žieduose. Orientino lapuose sukaupta 1,67 karto daugiau nei žolėje ir 6,78 karto – nei žieduose. Izoviteksino lapuose rasta 3069,29  $\mu\text{g/g}$ , tai yra 45,78 karto daugiau nei stiebuose. Žolės, stiebų bei lapų, rinktų žydėjimo pradžioje, chromatogramos pateiktos 32, 35 ir 36 paveiksluose.

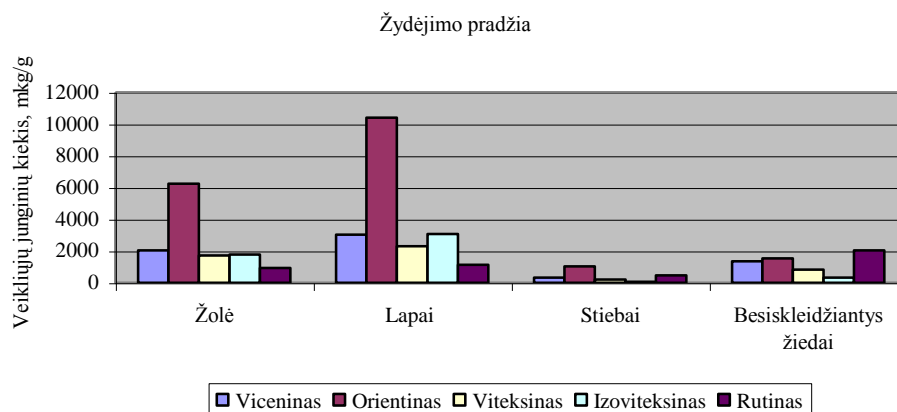


32 pav. Žolės, surinktos žydėjimo pradžioje, chromatograma: 1-kavos rūgštis, 2-viceninas, 3-orientinas, 4-viteksino ramnozidas, 5-viteksinas, 6-izoviteksinas, 7-rutinas, 8-hiperozidas, 9-apigenin7glikozidas, 10-astragalinas, 11-kvercitrinas, 12-liuteolinas, 13-kvercetas, 14-apigeninas, 15-kemferolis

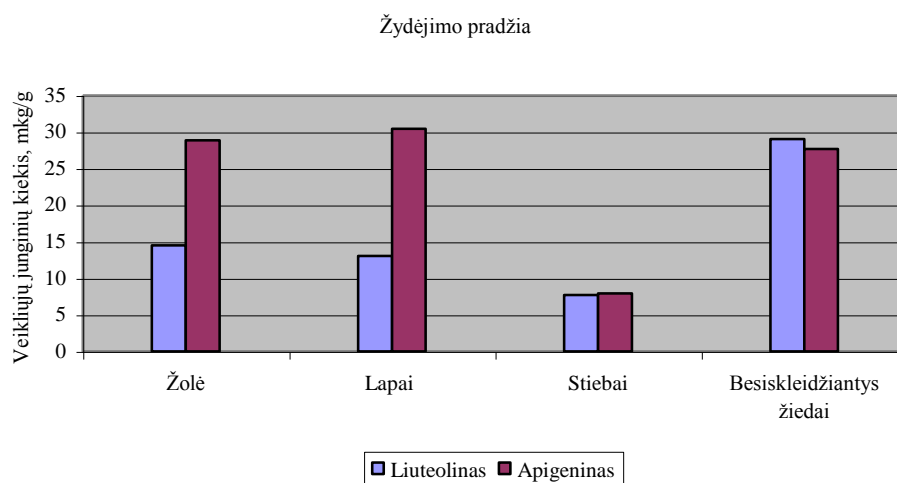
9 lentelė. Veikliųjų junginių kiekis žydėjimo pradžioje

Nr.	Pavadinimas	Veikliųjų junginių kiekis, $\mu\text{g/g}$			
		Žolėje ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Lapuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Stiebuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Besiskleidžiančiuose žieduose ( $\bar{X} \pm S_x$ )
1	Chlorogeno rūgštis	24,71±8,72	17,99±3,57	24,74±8,96	34,84±18,42
2	Kavos rūgštis	233,57±8,23	320,04±44,32	21,08±2,32	97,21±67,31
3	Viceninas	2040,25±123,09	3022,16±65,77	317,76±59,05	1353,04±58,65
4	Orientinas	6236,24±477,17	10400,78±168,27	1034,28±151,49	1533,95±189,10
5	Viteksino ramnozidas	65,16±0,75	362,73±24,98	9,95±2,88	170,71±77,94
6	Viteksinas	1717,12±125,61	2303,48±51,91	204,50±22,38	823,36±65,22
7	Izoviteksinas	1767,82±165,05	3069,29±123,86	67,05±7,37	332,73±72,86
8	Rutinas	925,72±104,43	1126,26±336,06	473,39±65,59	2043,64±280,89
9	Hiperozidas	112,81±15,97	40,56±14,13	50,02±3,92	684,38±65,74
10	Apigenin 7 glikozidas	311,65±35,31	119,69±4,77	49,52±12,35	465,21±294,10
11	Astragalinas	237,96±27,02	132,87±6,91	14,68±4,93	234,96±145,45
12	Kvercitrinas	43,92±5,35	40,96±29,22	8,92±1,44	138,72±6,20
13	Liuteolinas	14,50±1,44	13,04±5,27	7,70±3,34	29,06±5,32
14	Kvercetas	33,98±4,43	27,13±3,11	5,89±3,26	116,47±12,76
15	Apigeninas	28,87±2,79	30,46±1,23	7,91±0,97	27,70±15,63
16	Kemferolis	37,829±2,66	70,564±2,47	10,46±0,41	210,06±32,01

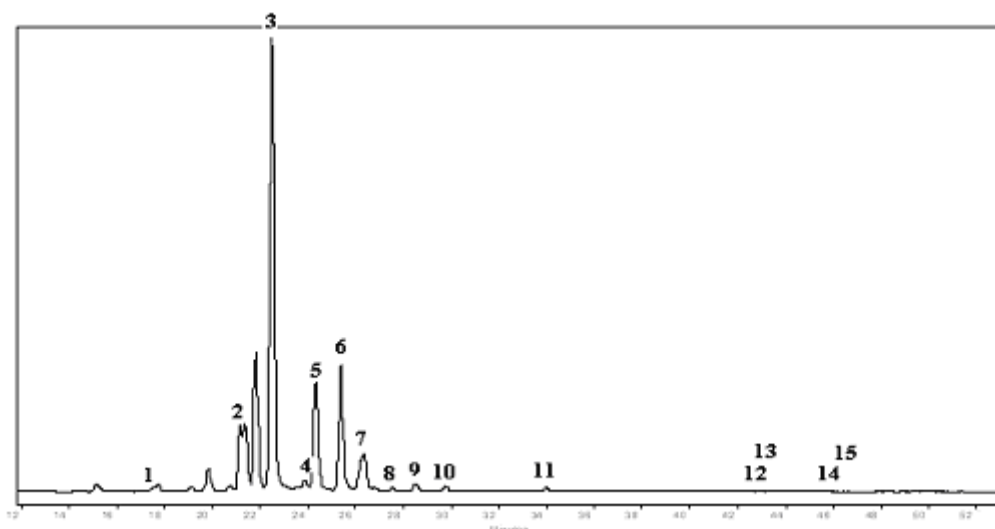
Pastaba:  $\bar{X} \pm S_x$  – aritmetinis vidurkis  $\pm$  vidutinis kvadratinis nuokrypis.



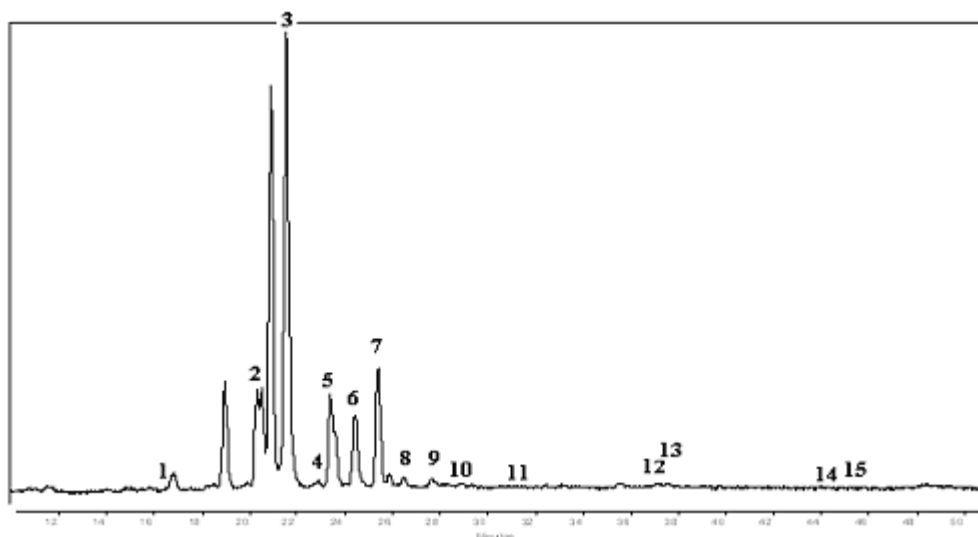
33 pav. Veikliųjų junginių pasiskirstymas kanadinėje jakšūnėje žydėjimo pradžioje



34 pav. Veikliųjų junginių kiekiai skirtinguose augalo organuose žydėjimo pradžioje



35 pav. Lapų, surinktų žydėjimo pradžioje, chromatograma: 1-kavos rūgštis, 2-viceninas, 3-orientinas, 4-viteksino ramnozidas, 5-viteksinas, 6-izoviteksinas, 7-rutinas, 8-hiperozidas, 9-apigenin7glikozidas, 10-astragalinas, 11-kvercitrinas, 12-liuteolinas, 13-kvercetas, 14-apigeninas, 15-kemferolis



36 pav. Stiebų, surinktų žydėjimo pradžioje, chromatograma: 1-kavos rūgštis, 2-viceninas, 3-orientinas, 4-viteksino ramnozidas, 5-viteksinas, 6-izoviteksinas, 7-rutinas, 8-hiperozidas, 9-apigenin 7 glikozidas, 10-astragalinas, 11-kvercitrinas, 12-liuteolinas, 13-kvercetas, 14-apigeninas, 15-kemferolis

Kanadinės jakšūnės žydėjimo fazėje flavonoidų ir fenolkarboksirūgščių daugiausia susikaupia lapuose, žolėje, mažiausia – stiebuose (38-39 pav.). Orientino iš lapų išskirta 2,55 karto daugiau nei iš žolės ir 6,96 karto daugiau nei iš žiedų. Lapuose gausiausia ir viteksino, izoviteksino, vicenino. Žieduose daugiausia rasta rutino – 34,36,19 µg/g, tai yra 1,85 karto daugiau nei lapuose ir 2,1 karto daugiau nei žolėje. Liuteolino žydėjimo fazėje daugiausia išskirta iš žiedų – 48,67 µg/g, kai tuo tarpu iš žolės – 15,17 µg/g, o iš lapų – tik 7,36 µg/g. Apigenino taip pat gausiausia žieduose – 19,96 µg/g. Žolėje ir stiebuose jo rasta dvigubai mažiau, mažiausia lapuose – tik 6,63 µg/g. Žiedų chromatograma pateikta 37 pav.

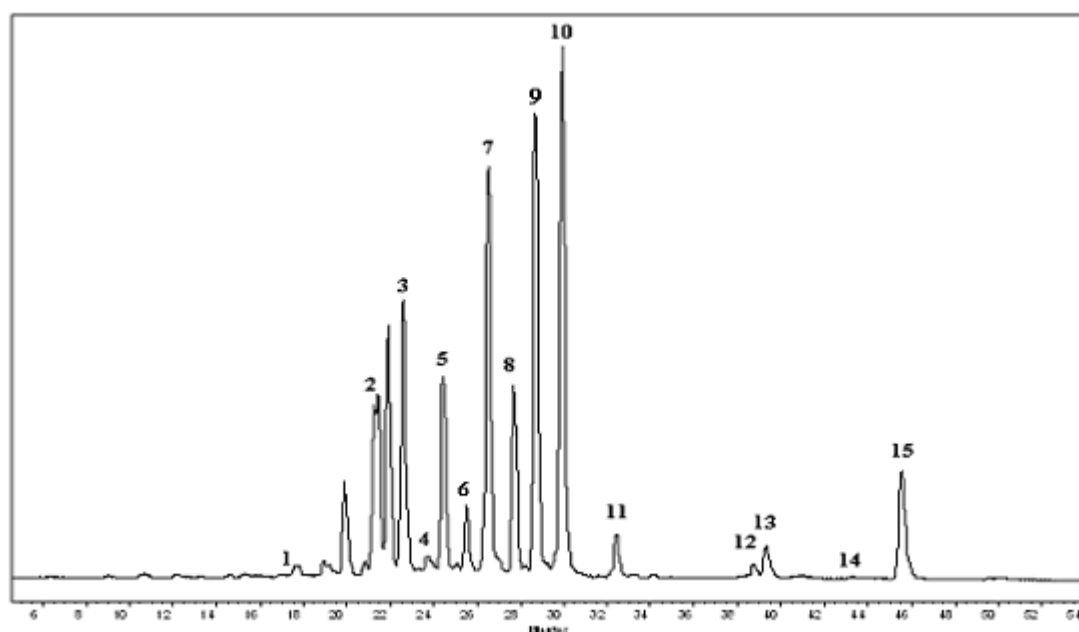
10 lentelė. Veikliųjų junginių kiekis žydėjimo fazėje

Nr.	Pavadinimas	Veikliųjų junginių kiekis, µg/g			
		Žolėje ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Lapuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Stiebuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Žieduose ( $\bar{X} \pm S_x$ )
1	Chlorogeno rūgštis	33,83±7,93	31,95±18,11	14,70±5,02	57,23±20,32
2	Kavos rūgštis	122,74±23,86	172,61±25,27	24,22±4,59	122,03±27,27
3	Viceninas	1607,30±38,14	3266,02±163,34	288,27±28,59	1759,78±128,79
4	Orientinas	4524,48±95,41	11545,27±445,65	779,57±43,03	1659,79±53,13
5	Viteksino ramnozidas	122,46±37,18	465,91±29,83	13,97±2,28	201,25±124,64
6	Viteksinas	1512,96±65,24	3287,74±128,67	233,68±13,36	1337,57±76,87
7	Izoviteksinas	1111,69±38,72	3417,96±139,51	47,18±3,14	462,68±33,19
8	Rutinas	1629,88±42,69	1860,34±85,60	426,84±55,71	3436,19±191,53
9	Hiperozidas	313,36±2,29	84,79±16,78	64,44±3,07	1351,66±104,84
10	Apigenin 7 glikozidas	658,54±9,87	138,74±117,86	62,60±18,01	3317,19±321,77
11	Astragalinas	887,47±21,42	144,18±10,02	90,58±8,83	500,22±527,99

10 lentelės tęsinys.

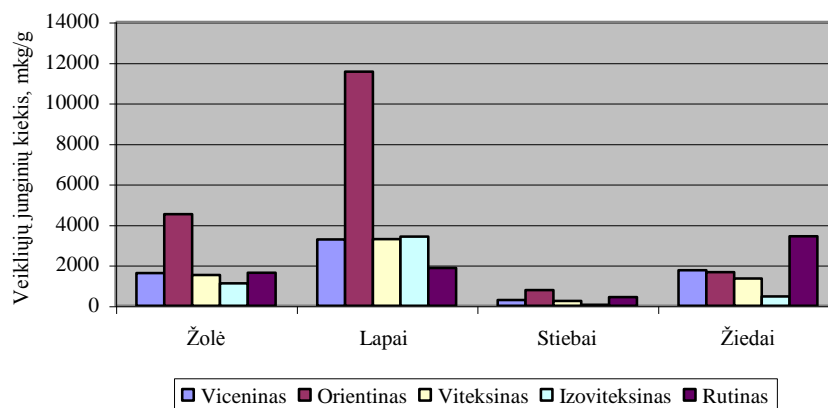
Nr.	Pavadinimas	Veikliųjų junginių kiekis, µg/g			
		Žolėje ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Lapuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Stiebuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Žieduose ( $\bar{X} \pm S_x$ )
12	Kvercitrinas	45,31±34,51	19,53±4,81	3,91±1,21	409,96±45,72
13	Liuteolinas	15,17±2,23	7,36±0,83	1,66±0,21	48,67±4,82
14	Kvercetas	57,43±7,36	21,58±2,89	10,71±0,91	181,21±16,15
15	Apigeninas	9,17±3,28	6,63±1,44	8,81±2,84	19,96±1,47
16	Kemferolis	89,94±6,64	24,24±2,07	23,34±2,95	540,04±74,70

Pastaba:  $\bar{X} \pm S_x$  – aritmetinis vidurkis ± vidutinis kvadratinis nuokrypis.

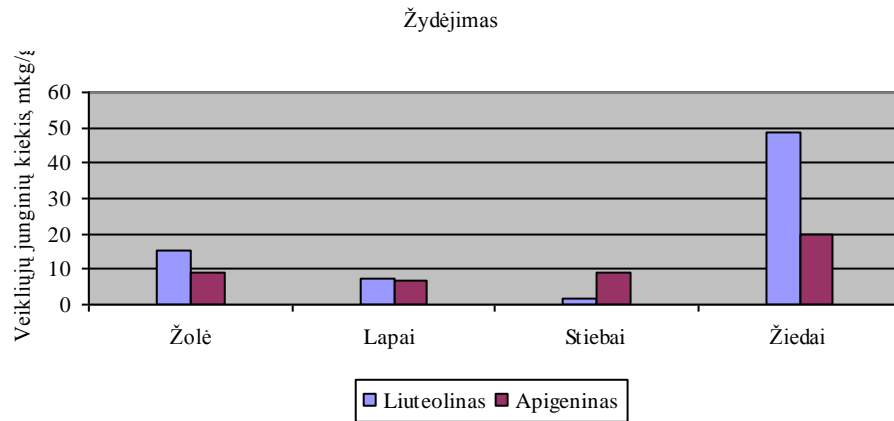


37 pav. Žiedų chromatograma: 1-kavos rūgštis, 2-vicenas, 3-orientinas, 4-viteksino ramnozidas, 5-viteksinas, 6-izoviteksinas, 7-rutinas, 8-hiperozidas, 9-apigenin7glikozidas, 10-astragalinas, 11-kvercitrinas, 12-liuteolinas, 13-kvercetas, 14-apigeninas, 15-kemferolis

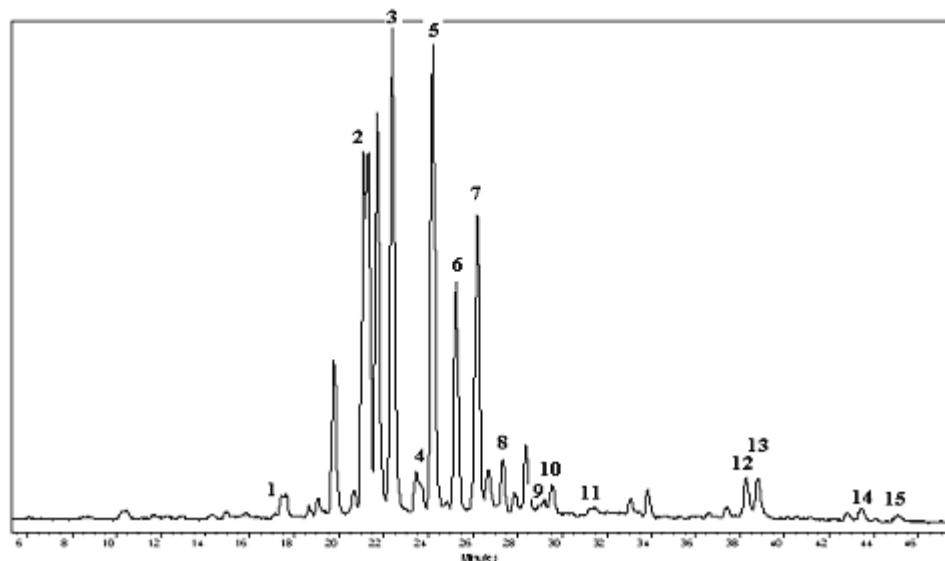
Žydėjimas



38 pav. Veikliųjų junginių pasiskirstymas *Desmodium canadense* (L.) DC. žydėjimo fazėje



39 pav. Veikliųjų junginių pasiskirstymas skirtinguose augalo organuose žydėjimo fazėje



40 pav. Vaisių chromatograma: 1-kavos rūgštis, 2-viceninas, 3-orientinas, 4-viteksino ramnozidas, 5-viteksinas, 6-izoviteksinas, 7-rutinas, 8-hiperozidas, 9-apigenin7glikozidas, 10-astragalinas, 11-kvercitrinas, 12-liuteolinas, 13-kvercetas, 14-apigeninas, 15-kemferolis

11 lentelė. Veikliųjų junginių kiekis vaisių brandos pradžioje

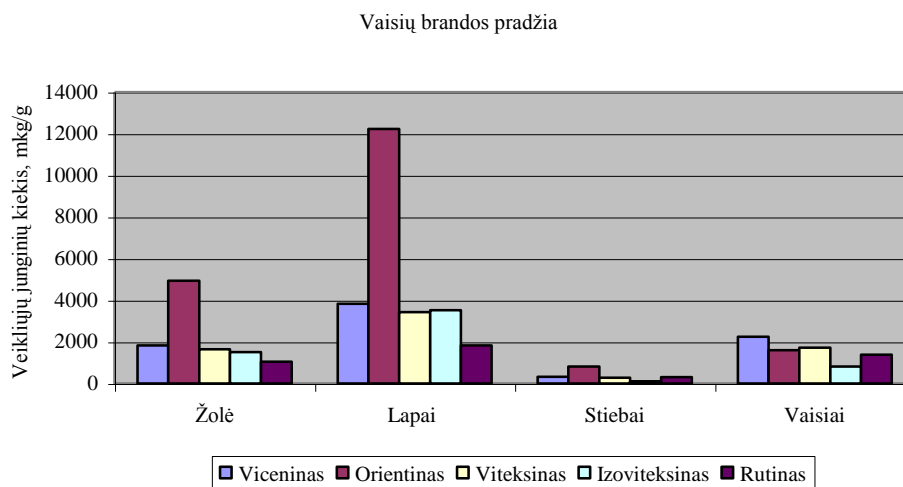
Nr.	Pavadinimas	Veikliųjų junginių kiekis, $\mu\text{g/g}$			
		Žolėje ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Lapuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Stiebuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Vaisiuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )
1	Chlorogeno rūgštis	37,33±12,71	25,24±7,46	42,38±17,67	56,91±28,74
2	Kavos rūgštis	231,81±57,92	225,01±0,74	96,09±6,89	135,83±6,95
3	Viceninas	1824,30±180,46	3835,79±98,18	317,06±62,41	2239,48±34,26
4	Orientinas	4944,90±528,33	12228,42±264,03	814,97±247,83	1601,84±44,04
5	Viteksino ramnozidas	187,59±76,09	286,16±201,52	14,86±8,28	393,04±33,04
6	Viteksinas	1646,16±29,42	3426,11±60,95	269,98±55,13	1729,17±25,72
7	Izoviteksinas	1507,89±166,14	3519,47±81,24	112,86±71,64	808,35±28,50
8	Rutinas	1041,80±221,83	1824,84±27,86	302,13±40,73	1379,94±7,41
9	Hiperozidas	82,41±11,31	69,70±21,12	34,86±8,39	232,26±19,57
10	Apigenin 7 glikozidas	193,09±44,37	122,75±82,34	1,32±0,02	41,61±17,31
11	Astragalinas	125,70±91,81	94,48±10,71	4,64±0,52	162,40±9,72

11 lentelės tęsinys.

Nr.	Pavadinimas	Veikliųjų junginių kiekis, µg/g			
		Žolėje ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Lapuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Stiebuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Vaisiuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )
12	Kvercitrinas	34,78±14,91	29,04±4,13	1,43±0,97	36,89±6,51
13	Liuteolinas	15,63±1,83	10,86±0,78	3,81±1,72	73,54±14,88
14	Kvercetas	24,42±5,62	5,36±2,28	11,59±0,89	123,38±21,26
15	Apigeninas	12,73±2,03	8,42±0,42	10,25±0,43	43,56±6,94
16	Kemferolis	25,36±3,02	11,31±0,26	11,01±0,73	26,77±4,91

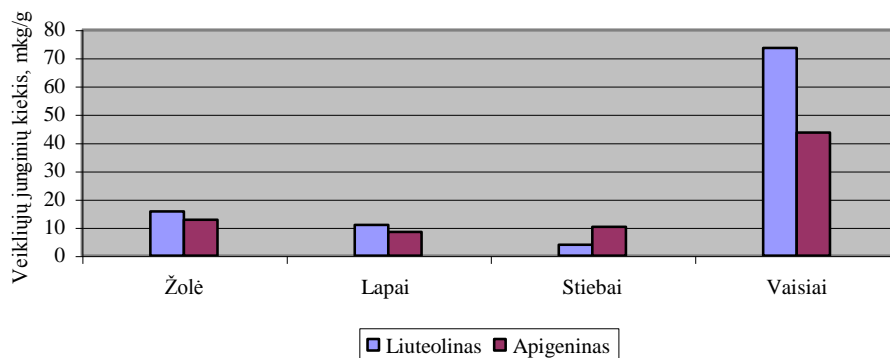
Pastaba:  $\bar{X} \pm S_x$  – aritmetinis vidurkis ± vidutinis kvadratinis nuokrypis.

*Desmodium canadense* (L.) DC. vaisių brandos pradžioje nustatytas analogiškas veikliųjų junginių pasiskirstymas lyginant su žydėjimo fazėje atliktais tyrimais. Gausiausiai veikliųjų junginių rasta lapuose, žolėje, vaisiuose, mažiausia – stiebuose (41-42 pav.). Lapuose daugiausia orientino, net 15 kartų daugiau nei stiebuose. Izoviteksino iš lapų išskirta 3519,47 µg/g, kai iš žolės 2,33 karto mažiau, žiedų – 4,35 karto, stiebų – 31,18 karto mažiau. Liuteolino ypač gausu vaisiuose – 73,54 µg/g. Vaisiai liuteolino sukaupia daugiausia lyginant su kitomis augalo dalimis visomis vegetacijos fazėmis. Vaisių vedimo laikotarpiu apigenino daugiausia randama vaisiuose – 3 kartus mažiau nei žolėje ir stiebuose ir 5,2 karto mažiau nei lapuose. Vaisių chromatograma pavaizduota 40 pav.



41 pav. Kanadinės jakšūnės veikliųjų junginių pasiskirstymas vaisių brandos pradžioje

Vaisių brandos pradžia



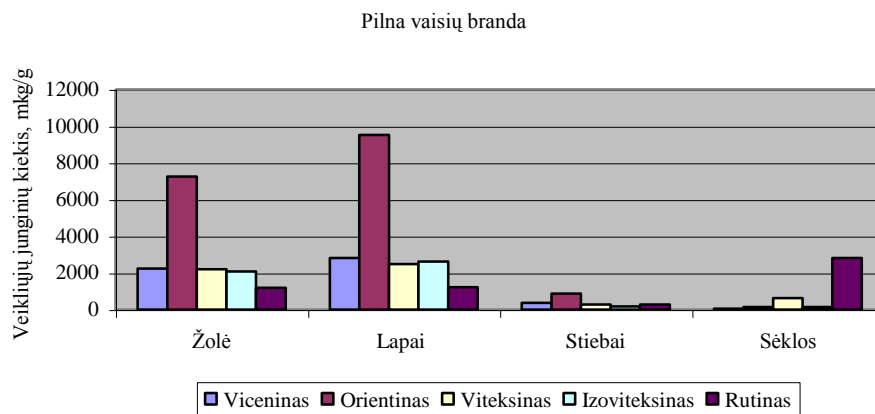
42 pav. Veikliųjų junginių pasiskirstymas vaisių brandos pradžioje

12 lentelė. Veikliųjų junginių kiekis pilnos vaisių brandos metu

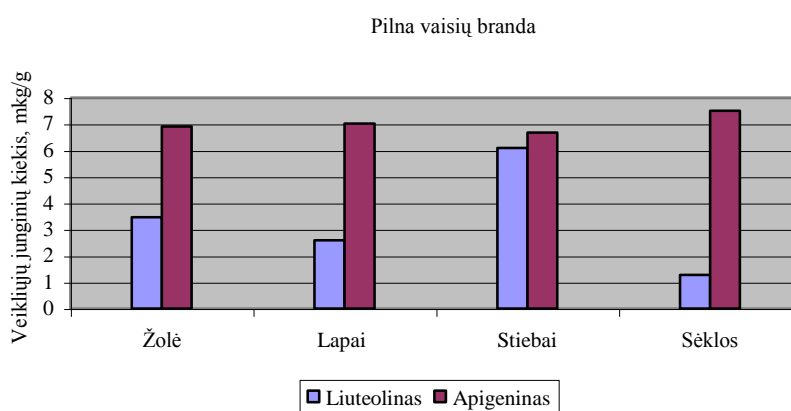
Nr.	Pavadinimas	Veikliųjų junginių kiekis, $\mu\text{g/g}$			
		Žolėje ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Lapuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Stiebuose ( $\bar{X} \pm S_x$ )	Sėklose ( $\bar{X} \pm S_x$ )
1	Chlorogeno rūgštis	18,04±9,17	13,82±3,07	23,84±1,95	40,84±2,27
2	Kavos rūgštis	447,66±32,75	544,54±50,163	127,36±17,05	18,84±2,99
3	Viceninas	2234,80±141,39	2806,68±2,21	375,32±38,47	46,96±38,67
4	Orientinas	7256,15±512,14	9523,90±513,33	875,66±122,79	144,01±75,13
5	Viteksino ramnozidas	402,26±69,43	463,57±10,19	7,39±1,52	46,51±19,24
6	Viteksinas	2201,54±189,67	2474,29±123,41	282,24±31,59	623,95±67,41
7	Izoviteksinas	2085,65±194,99	2618,57±118,82	176,96±9,63	133,12±16,21
8	Rutinas	1192,70±115,28	1227,84±43,71	280,07±34,26	2810,82±254,81
9	Hiperozidas	162,36±84,13	26,69±12,17	28,38±1,35	76,60±9,39
10	Apigenin 7 glikozidas	45,20±24,17	30,48±6,55	6,20±1,32	28,03±14,81
11	Astragalinas	93,59±30,02	75,36±0,63	6,80±1,29	227,39±27,38
12	Kvercitrinas	14,15±10,47	3,32±2,28	1,52±0,45	100,95±37,01
13	Liuteolinas	3,46±1,78	2,59±1,36	6,09±2,59	1,28±0,14
14	Kvercetasinas	21,38±4,38	12,46±2,62	8,34±0,35	12,05±3,83
15	Apigeninas	6,91±0,19	7,02±0,54	6,68±0,98	7,50±0,13
16	Kemferolis	10,91±1,11	10,69±0,67	10,83±0,49	11,27±1,07

Pastaba:  $\bar{X} \pm S_x$  – aritmetinis vidurkis  $\pm$  vidutinis kvadratinis nuokrypis.

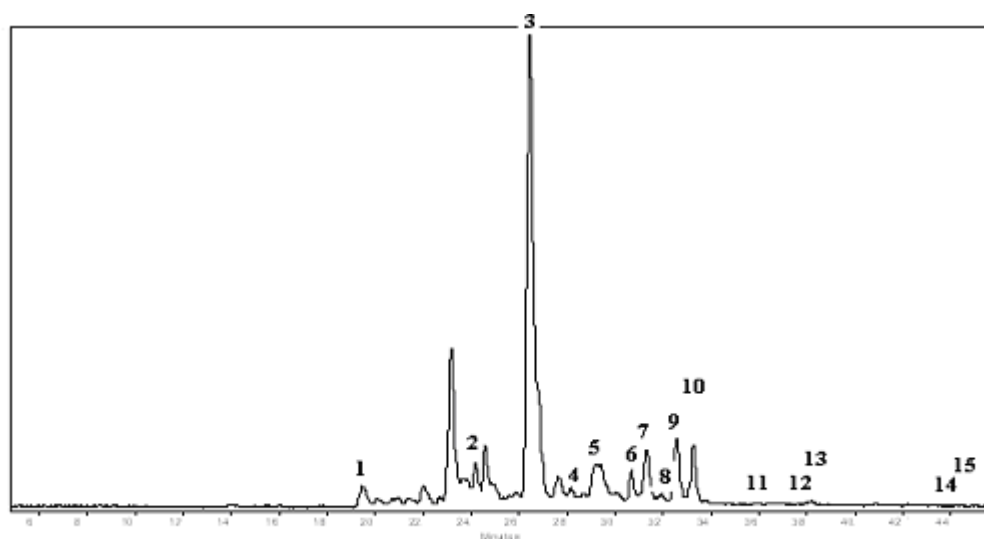
Pilnos vaisių brandos laikotarpiu flavonoidų ir fenolkarboksirūgščių daugiausia sukaupia lapai ir žolė, mažiausia – stiebai bei sėklos (43-44 pav). Iš lapų ir žolės daugiausia išekstraguota orientino, vicenino, viteksino, izoviteksino. Sėklose gausiausia rutino – 2,2 karto daugiau nei žolėje ir lapuose. Iš stiebų daugiausia išskirta orientino, bet 66,13 karto mažiau nei iš lapų. Pilnos sėklų brandos laikotarpiu žymiai sumažėja liuteolino ir apigenino. Apigenino kiekis visose augalo dalyse suvienodėja, jo rasta apie 7  $\mu\text{g/g}$ . Liuteolino gausiausia stiebuose – 6,09  $\mu\text{g/g}$ , o žolėje 1,7 karto mažiau, mažiausiai sėklose – tik 1,28  $\mu\text{g/g}$ . 45 pav. pavaizduota sėklų chromatograma.



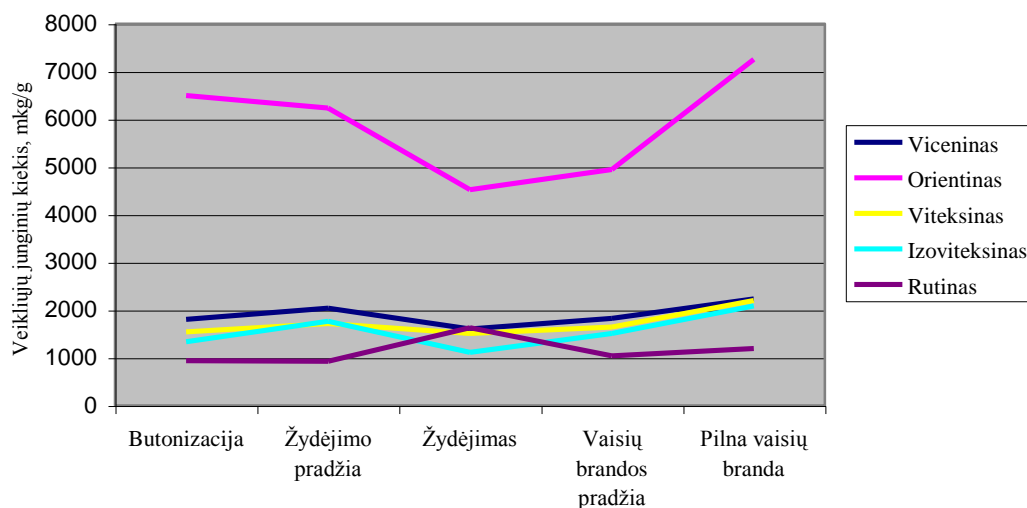
43 pav. Veikliųjų junginių pasiskirstymas pilnos vaisių brandos laikotarpiu



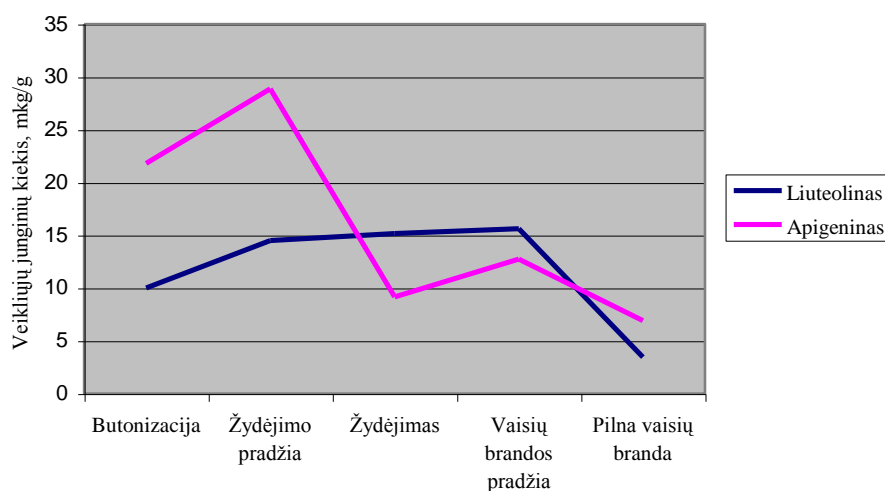
44 pav. Veikliųjų junginių išsidėstymas pilnos vaisių brandos metu



45 pav. Sėklų chromatograma: 1-kavos rūgštis, 2-viceninas, 3-orientinas, 4-viteksino ramnozidas, 5-viteksinas, 6-izoviteksinas, 7-rutinas, 8-hiperozidas, 9-apigenin7glikozidas, 10-astragalinas, 11-kvercitrinas, 12-liuteolinas, 13-kvercetinas, 14-apigeninas, 15-kemferolis



**46 pav. Veikliųjų junginių dinamika žolėje augalų vegetacijos metu**



**47 pav. Liuteolino ir apigenino dinamika žolėje augalų vegetacijos metu**

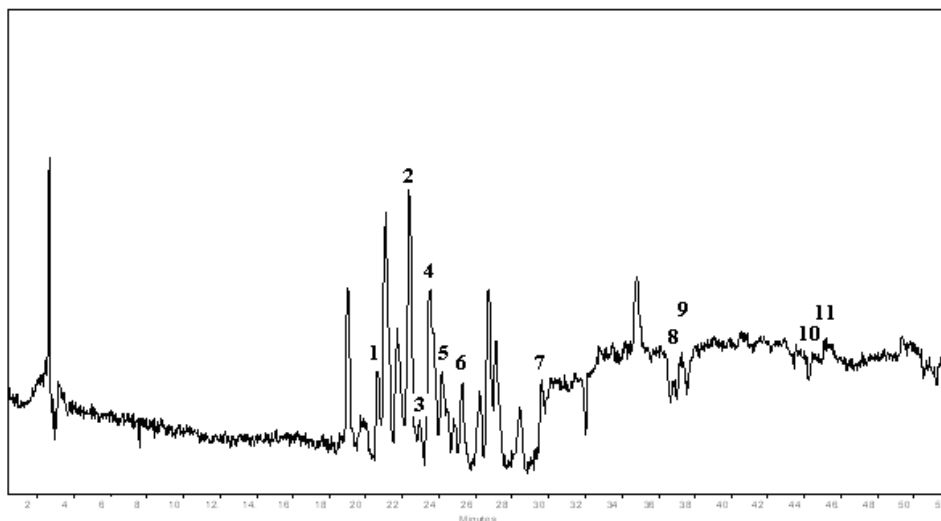
Išanalizavus veikliųjų junginių dinamiką penktųjų auginimo metų kanadinės jakšūnės žolėje matyti, kad daugiausia veikliųjų junginių susikaupia augalų žydėjimo pradžioje (46-47 pav.). Vicenino, orientino, viteksino, izoviteksino kiekis butonizacijos metu palaipsniui didėja ir žydėjimo pradžioje būna didžiausias, o žydėjimo fazėje mažėja iki minimalaus. Vaisių vedimo metu ir vaisių brandos fazėse šių junginių vėl padidėja. Rutino daugiausia susikaupia žydėjimo metu. Apigenino daugiausia būna žydėjimo pradžioje, o žydėjimo metu jo kiekis sumažėja 3,15 karto. Vaisių vedimo laikotarpiu apigenino kiekis padidėja nuo 9,17  $\mu\text{g/g}$  iki 12,73  $\mu\text{g/g}$ . Subrendus vaisiams apigenino žolėje būna mažiausiai. Liuteolino palaipsniui didėja iki žydėjimo pradžios, o žydėjimo metu būna gausiausia – 15,17  $\mu\text{g/g}$ . Vaisių vedimo fazėje liuteolino pradeda mažėti, o vaisių brandos metu jo kiekis tesiekia 3,46  $\mu\text{g/g}$ .

13 lentelė. Veikliųjų junginių kiekis šaknyse

Nr.	Pavadinimas	Veikliųjų junginių kiekis, µg/g	
		4-ieji vegetacijos metai ( $\bar{X} \pm S_x$ )	5-ieji vegetacijos metai ( $\bar{X} \pm S_x$ )
1	Viceninas	340,24±53,34	312,37±33,61
2	Orientinas	153,52±11,92	75,03±4,35
3	Viteksino ramnozidas	240,14±37,89	67,57±81,06
4	Viteksinas	106,61±37,45	80,89±58,50
5	Izoviteksinas	51,29±21,63	16,83±4,89
6	Hiperozidas	73,54±16,10	50,07±18,95
7	Kvercitrinas	8,29±5,56	6,101±6,89
8	Liuteolinas	3,41±1,01	1,79±0,63
9	Kvercetas	9,10±0,63	9,08±0,42
10	Apigeninas	9,24±2,49	7,38±0,84
11	Kemferolis	13,89±3,51	12,78±2,87

Pastaba:  $\bar{X} \pm S_x$  – aritmetinis vidurkis ± vidutinis kvadratinis nuokrypis.

Ištyrus ekstraktus, ruoštus iš ketvirtųjų ir penktųjų vegetacijos metų rudenį kastų šaknų aptikti maži kiekiai veikliųjų junginių (13 lentelė). Paaiškėjo, kad ketvirtaisiais vegetacijos metais flavonoidų buvo sukaupta daugiau nei penktaisiais: orientino 2 kartus, viteksino 1,32 karto, izoviteksino –3,1 karto, liuteolino 1,9 karto, o apigenino 1,25 karto. Šaknų, kastų ketvirtųjų vegetacijos metų pabaigoje, chromatograma pateikta 48 pav.



48 pav. Šaknų chromatograma: 1-viceninas, 2-orientinas, 3-viteksino ramnozidas, 4-viteksinas, 5-izoviteksinas, 6-hiperozidas, 7-kvercitrinas, 8-liuteolinas, 9-kvercetas, 10-apigeninas, 11-kemferolis

**Išvados:**

1. Didžiausias flavonoidų ir fenolinių junginių kiekis iš kanadinės jakšūnės žaliavos išsiekstraguoja naudojant 70 % (V/V) etanolį.
2. Daugiausia veikliųjų junginių penktaisiais vegetacijos metais visuose vegetacijos tarpsniuose *Desmodium canadense* (L.) DC. susikaupia lapuose ir žolėje, mažiausia – stiebuose.
3. Gausiausia veikliųjų junginių būna žydėjimo pradžioje, todėl žaliavą rekomenduojama rinkti šiuo laikotarpiu. Žolėje žydėjimo pradžioje penktaisiais vegetacijos metais susikaupia 1,38% flavonoidų ir fenolkarboksirūgščių, t.y. 1,07 karto daugiau nei butonizacijos periodu, 1,09 karto daugiau nei žydėjimo metu ir 1,16 karto daugiau nei vaisių brandos pradžioje.
4. Daugiausia rasta orientino, viteksino, izoviteksino, rutino. Žydėjimo pradžioje rinktoje kanadinės jakšūnės žolėje orientinas sudaro 45,08% visų veikliųjų junginių, izoviteksinas – 12,77%, viteksinas – 12,41%, rutinas – 6,69%, apigeninas – 0,21%, o liuteolinas tik –0,1%.
5. Šaknyse aptikti maži kiekiai veikliųjų junginių. Ketvirtųjų vegetacijos metų šaknyse flavonoidų rasta 1,14 karto daugiau nei penktųjų vegetacijos metų.

## 5. Išvados

1. Tiriant kanadinės jakšūnės (*Desmodium canadense* (L.) DC.) antžeminės dalies augimo ypatumus ketvirtaisiais - penktaisiais auginimo metais nustatyta, kad penktaisiais vegetacijos metais kanadinė jakšūnė išaugo vidutiniškai iki 1,45 m aukščio, t. y. 1,12 karto aukštesnė, užaugino 49-50 stiebų, t. y. 46 % daugiau, o augalo santykinis projekcinis plotas buvo 2 m<sup>2</sup>, t. y. 112 % didesnis nei ketvirtaisiais vegetacijos metais.
2. Penktaisiais vegetacijos metais kanadinės jakšūnės žaliavos derlingumas padidėjo 2,7 karto, o sėklų 2,2 karto lyginant su ketvirtaisiais metais.
3. Kanadinės jakšūnės šaknų sistema šakotinė. Penktaisiais vegetacijos metais šaknis vidutiniškai išauga iki 49 cm ilgio ir 81 cm pločio, t. y. 128,57% didesnė lyginant su ketvirtaisiais metais. Žymiai padidėja šoninių šaknų skaičius.
4. Laboratorinėmis sąlygomis skarifikavimas kanadinės jakšūnės sėklų daigumą pagerina 10,98 karto, stratifikavimas – 4,5 karto, skarifikavimas-stratifikavimas net 11,33 karto lyginant su kontrolinėmis.
5. Dirvožemyje skarifikuotos (koncentruota sulfato rūgštimi paveiktos) sėklos pradėjo dygti dvigubai greičiau. Skarifikuotų sėklų sudygo 9,44 karto daugiau nei stratifikuotų.
6. Skarifikavimas yra greičiausias ir efektyviausias metodas kanadinės jakšūnės sėklų daigumui pagerinti, tiek laboratorinėmis sąlygomis, tiek dirvožemyje, todėl ir rekomenduotinas.
7. Flavonoidų ir fenolkarboksirūgščių ekstrakcijai tinkamiausias 70 % (V/V) etanolis. 70 % (V/V) etanolio liuteolino išekstraguojama 1,5 karto daugiau, apigenino – 2,7 karto daugiau nei su 50 % (V/V) etanolio.
8. Daugiausia veiklių junginių penktaisiais vegetacijos metais susikaupia žydėjimo pradžioje, todėl rinkti žaliavą rekomenduotina šiuo laikotarpiu. Žolėje žydėjimo pradžioje penktaisiais vegetacijos metais susikaupia 1,38% flavonoidų ir fenolkarboksirūgščių, t.y. 1,07 karto daugiau nei butonizacijos periodu, 1,09 karto daugiau nei žydėjimo metu ir 1,16 karto daugiau nei vaisių brandos pradžioje.
9. Visuose *Desmodium canadense* (L.) DC. vegetacijos tarpsniuose daugiausia orientino, viteksino, izoviteksino, vicenino, rutino susikaupia kanadinės jakšūnės žolėje ir lapuose. Liuteolino ir apigenino daugiausiai susikaupia žieduose ir vaisiuose.

10. Žydėjimo pradžioje rinktoje kanadinės jakšūnės žolėje orientinas sudaro 45,08% visų veikliųjų junginių, izoviteksinas – 12,77%, viteksinas – 12,41%, rutinas – 6,69%, apigeninas – 0,21%, o liuteolinas tik –0,1%.
11. Gausiausia veikliųjų junginių rasta lapuose ir žolėje, todėl kaip žaliavą rekomenduotina rinkti žolę ar lapus. Žydėjimo pradžioje veikliųjų junginių lapuose yra 1,5 karto daugiau nei žolėje, 2,5 karto daugiau nei besiskleidžiančiuose žieduose ir net 9 kartus daugiau nei stiebuose.

## Summary

**Key words:** *Desmodium canadense* (L.) DC., Showy tick trefoil, biological features, phytochemical analysis, flavonoids.

Nowadays a lot of people use herbal drugs as immunity stimulating preparations, because they cause less side-effects and are safer in high doses. That's why they are superior to chemical drugs. Plants have many useful substances – and one of them are flavonoids with other phenolic compounds. One of possible sources of flavonoids and phenolic acids – Showy tick trefoil – *Desmodium canadense* (L.) DC.

The aim of work is to determine biological features of Showy tick trefoil of fourth and fifth vegetation year in Lithuanian climate conditions and to estimate dynamics of the active compounds in different phases of vegetation.

There were determined biological features of overground part of plant of fourth and fifth vegetation year. The underground part of *Desmodium canadense* (L.) was examined by visual analysis method. Seeds of Showy tick trefoil were investigated using scarification and stratification methods. Phytochemical analysis was done by using High pressure liquid chromatography (HPLC). There were determined flavonoids, phenolic acids and their amounts in plant material, collected in different phases of vegetation.

The most active compounds plant accumulates in the beginning of flowering. In this period in herb of *Desmodium canadense* (L.) was found 1,38% flavonoids and phenolic acids, while in leaves – 2,1%. The most important active compounds are apigenin, luteolin and their glycosides – orientin, vitexin, isovitexin, also rutin.

## 6. Naudota literatūra

1. ITIS – Bendrinio taksonominės informacijos tinklapio duomenų bazė. Prieiga per internetą: <http://www.itis.gov/>
2. USDA – JAV žemės ūkio augalų duomenų bazė. Prieiga per internetą: <http://plants.usda.gov/>
3. Galinis, V. Aukštesniųjų augalų sistematika. Vilnius, 1984. 17-18p.
4. JAV meteorologijos duomenų bazė. Prieiga per internetą: <http://www.metoffice.gov.uk/weather/namerica/namericapast.html>
5. Dagys, J. Augalų anatomija ir morfologija. Vilnius, 1985. 241p.
6. Illinois wildflowers duomenų bazė. Prieiga per internetą: [http://www.illinoiswildflowers.info/prairie/plantx/shw\\_trefoilx.htm](http://www.illinoiswildflowers.info/prairie/plantx/shw_trefoilx.htm)
7. Wisconsin State Herbarium. Prieiga per internetą: [http://www.fcps.edu/islandcreekes/ecology/showy\\_tick\\_trefoil.htm](http://www.fcps.edu/islandcreekes/ecology/showy_tick_trefoil.htm)
8. Germplasm A., *Desmodium canadense* L. Planting Guide. Prieiga per internetą: <http://plant-materials.nrcs.usda.gov/pubs/mopmcpग्deca7alex.pdf>
9. Tallgrass Ontario duomenų bazė. Prieiga per internetą: [http://www.tallgrassontario.org/IndSpecies\\_ShowyT.htm](http://www.tallgrassontario.org/IndSpecies_ShowyT.htm)
10. Enciklopedinio vaistinių augalų žodyno internetinė versija, Sankt-Peterburgo Valstybinė Chemijos-Farmacijos Akademija. Prieiga per internetą: <http://www.spcpa.ru/slr/preview>
11. Šimonienė, G. *Desmodium canadense* D.C. preparato Helefino D imunostimuliuojančių savybių eksperimentiniai tyrimai: daktaro disertacija: biomedicinos mokslai, biologija (01 B) / Genovaitė Šimonienė; Kauno medicinos universitetas. Kaunas 2000. 29-37 p.
12. Janulis, V. Naujas biologiškai aktyvių junginių, pasižyminčių priešvirusiniu ir hipozoteminiu veikimu, augalinis šaltinis - *Desmodium Canadense* D.C. : darbas habilituoto daktaro laipsniui įgyti / Valdimaras Janulis; Kauno medicinos universitetas. Kaunas, 1993. 9-76 p.
13. Lukošius, A. Antivirusinių y - pirono darinių akių lašų vaistinių formų sukūrimas : daktaro disertacija : medicinos mokslai, farmacija (5B) / A. Lukošius; Kauno medicinos universitetas. Kaunas, 1997. 29-45 p.
14. Dagys, J. Augalų fiziologija. Vilnius, 1974. 252-299 p.
15. Prieiga per internetą: <http://www.infectology.ru/ruk/herpes/trethment.aspx>
16. ACM (Association for computing Machinery) žurnalas. Prieiga per internetą: <http://www.acm.org/crossroads/xrds8-2/plantsim.html>

17. Room, P., Hanan, J. Virtual plants. Prieiga per internetą:  
<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/virtualplants/ipivp.html>
18. Schurr, U., Stitt, M. Time and space-resolved measurements of growth in plants. Prieiga per internetą:  
<http://klimt.iwr.uni-heidelberg.de/PublicFG/Publications/ProjectD/report97d.pdf>
19. Tennant, D. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *The Journal of Ecology*. Vol. 63, No. 3 (Nov., 1975), p. 995-1001. Prieiga per internetą:  
[http://links.jstor.org/sici?sici=0022-0477\(197511\)63%3A3%3C995%3AATOAML%3E2.0.CO%3B2-4](http://links.jstor.org/sici?sici=0022-0477(197511)63%3A3%3C995%3AATOAML%3E2.0.CO%3B2-4)
20. Ragažinskienė, O. Purpurinės ežiulės (*Echinaceae purpurea* (L.) Moench.) antžeminės ir požeminės dalių vystymasis// *Botanica Lithuanica*. 1997, Nr. 3(3), 251-271 p.
21. Bouma, J., Nielsen, K. Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. *Plant and Soil Journal*. Vol 218, January, 2000, p 185-196. Prieiga per internetą:  
<http://www.springerlink.com/content/h50414k78w038x81/>
22. Costa, C., Dwyer, L.M., Hamilton, R.I., Hamel, C., Nantais, L. and Smith D.L. A Sampling Method for Large Root Systems with Scanner-Based Image Analysis. *Agronomy Journal* no 92. 2000. p. 621-627. Prieiga per internetą:  
<http://agron.sci-journals.org/cgi/reprint/92/4/621>
23. University of Minnesota duomenų bazė. Prieiga per internetą:  
[https://wiki.umn.edu/twiki/bin/view/FR\\_3104\\_5104/Scarification](https://wiki.umn.edu/twiki/bin/view/FR_3104_5104/Scarification)
24. Prieiga per internetą: <http://www.djroger.com/stratification.htm>
25. University of Saskatchewan duomenų bazė. Prieiga per internetą:  
[http://www.gardenline.usask.ca/misc/seed\\_str.html](http://www.gardenline.usask.ca/misc/seed_str.html)
26. Wikipedia. The Free Encyclopedia duomenų bazė. Prieiga per internetą:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Stratification\\_\(botany\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Stratification_(botany))
27. Seed Germination duomenų bazė. Prieiga per internetą:  
<http://tomclothier.hort.net/page03.html>
28. Baranauskaitė, D., Remeikienė, I. *Farmakognozija*. Vilnius, 1983. 99-101p.
29. Friedli, F.L. Web Site. Prieiga per internetą:  
<http://www.friedli.com/herbs/phytochem/flavonoids.html>
30. VVKT prie SAM. *Farmakopėjos straipsnių rinkinys*. Vilnius, 2002. 6-7 p.
31. Maruška, A., Kornyšova, O., Machtejevas, E. *Efektyviosios skysčių chromatografijos pagrindai*. Kaunas, 2005. 9-18p., 55-158 p.

32. Sapagovas, J., Vilkauskas, L., Rašymas, A. Informatikos ir matematinės statistikos pradmenys. Kaunas, 2000.

## 7. Priedai

Statistinis duomenų apdorojimas atliktas naudojantis programa Statistika 5.0.

$\bar{X}$  -aritmetinis vidurkis - imties vidurkis (mean, average).

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i ; \quad (3)$$

Kur **n**- (sample size) imties tūris.

**Vidutinis kvadratinis nuokrypis  $\pm S$**  (standard deviation).

$$S_{\bar{X}} = t S_{\bar{X}} - m ; \quad (4)$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{(n-1)} (x_i - \bar{x})^2} ; \quad (5)$$

Kai imties tūris  $n < 30$ , vietoj  $n$  reikia rašyti  $(n-1)$ ;

**P** – pasikliautinis lygmuo, medicinoje 0,95 (95% Confidence limits of mean).