

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMAKOLOGIJOS KATEDRA

JONAS CHOMENKA

**FLAVONOIDŲ IR FENOLINIŲ JUNGINIŲ KIEKIO BEI
ANTIOKSIDANTINIO AKTYVUMO ĮVAIRAVIMO *POLYGONUM
PERSICARIA* L. ŽOLĖJE TYRIMAS**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas

Prof. dr. Valdas Jakštas

KAUNAS, 2015

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMAKOLOGIJOS KATEDRA

TVIRTINU:

Farmacijos fakulteto dekanas prof. dr. Vitalis Briedis
Data

**FLAVONOIDŲ IR FENOLINIŲ JUNGINIŲ KIEKIO BEI
ANTIOKSIDANTINIO AKTYVUMO ĮVAIRAVIMO *POLYGONUM
PERSICARIA* L. ŽOLĖJE TYRIMAS**

Magistro baigiamasis darbas

Recenzentas

Darbo vadovas

Prof. dr. Valdas Jakštas

Darbą atliko:

Magistrantas

Jonas Chomenka

KAUNAS, 2015

TURINYS

SANTRAUKA	5
SUMMARY	6
SANTRUMPOS	7
ĮVADAS.....	8
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1 Rūgtinių (<i>Polygonaceae</i> L.) šeima	10
1.2 Dėmėtasis rūgtis (<i>Polygonum persicaria</i> L.).....	10
1.3 Fenoliniai junginiai.....	11
1.4 Flavonoidai	12
1.4.1 Antocianinai ir Antocianidinai.....	13
1.4.2 Flavonoliai	14
1.4.3 Flavanonai.....	15
1.4.4 Izoflavonoidai	15
1.5 Oksidacinis stresas.....	16
1.6 Literatūros apžvalgos apibendrinimas	17
2. TYRIMO METODIKA.....	18
2.1 Tiriamasis objektas	18
2.2 Naudota aparatūra.....	18
2.3 Naudoti reagentai.....	18
2.4 Tyrimo metodai	19
2.4.1 Tiriamųjų mėginių paruošimas	19
2.4.2 Bendras flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu	19
2.4.3 Suminis fenolinių junginių kiekio nustatymas.....	20
2.4.4 Antioksidantinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu	21
2.4.5 Antioksidantinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu	22
2.5 Tyrimo metu gautų duomenų statistinis vertinimas	23
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APIBENDRINIMAS.....	24
3.1 Ekstrakcijos sąlygų parinkimas	24
3.2 Flavonoidų kiekio įvairavimo tyrimas.....	26
3.3 Fenolinių junginių kiekio įvairavimo nustatymas	29
3.4 Antioksidantinio aktyvumo nustatymas	32

3.4.1 DPPH metods	32
3.4.2 ABTS metods	35
4. IŠVADOS	39
5. PRAKTINĒS REKOMENDACIJOS	40
6. LITERATŪROS SĀRAŠAS	41

SANTRAUKA

J. Chomenkos magistro baigiamasis darbas/ darbo vadovas V. Jakštas; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Farmacijos fakulteto, Farmakognozijos katedra – Kaunas.

Pavadinimas: Flavonoidų ir fenolinių junginių kiekio bei antioksidantinio aktyvumo įvairavimo *Polygonum persicaria* L. žolėje tyrimas.

Darbo tikslas: ištirti flavonoidų ir fenolinių junginių kiekio bei antioksidantinio aktyvumo įvairavimą vegetacijos laikotarpiu natūraliai augančių dėmėtųjų rūgčių (*Polygonum persicaria* L.) žolės, lapų bei stiebų mėginiuose bei šių parametrų įvairavimą skirtinguose Lietuvos regionuose surinktuose mėginiuose.

Darbo uždaviniai: Parinkti optimalias ekstrakcijos sąlygas flavonoidų ir suminio fenolinių junginių kiekio nustatymui dėmėtųjų rūgčių mėginiuose; nustatyti flavonoidų kiekio įvairavimą dėmėtųjų rūgčių žolės, lapų ir stiebų mėginiuose vegetacijos laikotarpiu bei skirtinguose Lietuvos regionuose; įvertinti bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimą dėmėtųjų rūgčių žolės, lapų ir stiebų mėginiuose; nustatyti dėmėtųjų rūgčių mėginių antioksidantinį aktyvumą DPPH ir ABTS metodais ir įvertinti šio rodiklio įvairavimą skirtinguose augalo organuose.

Tyrimo metodai: Bendras flavonoidų bei fenolinių junginių skaičius nustatytas spektrofotometrinio metodu. Antioksidantinis aktyvumas nustatytas DPPH ir ABTS metodais, spektrofotometriškai.

Tyrimo rezultatai: Bendras flavonoidų kiekis žolės mėginiuose iš skirtingų Lietuvos regionų įvairavo nuo 0,36 proc. iki 1,00 proc., lapų mėginiuose nuo 0,46 proc. iki 1,13 proc. stiebų mėginiuose nuo 0,08 proc. iki 0,20 proc. Vegetacijos laikotarpiu žolės mėginiuose flavonoidų kiekis įvairavo nuo 0,36 proc. iki 1,03 proc. Bendras fenolinių junginių kiekis žolės mėginiuose įvairavo nuo 32,12 mg/g iki 85,63 mg/g, lapų mėginiuose nuo 37,84 mg/g iki 99,98 mg/g, stiebų mėginiuose nuo 18,30 mg/g iki 59,71 mg/g. Vegetacijos laikotarpiu žolės mėginiuose fenolinių junginių kiekis įvairavo nuo 48,80 mg/g iki 70,34 mg/g. Antioksidantinis aktyvumas žolės mėginiuose iš skirtingų Lietuvos regionų nustatytas DPPH metodu įvairavo nuo 36,85 proc. iki 81,93 proc., lapų mėginiuose nuo 58,29 proc. iki 87,74 proc., stiebų mėginiuose nuo 22,61 proc. iki 77,26 proc. Vegetacijos laikotarpiu žolės mėginiuose antioksidantinis aktyvumas įvairavo nuo 55,16 proc. iki 84,59 proc. Antioksidantinis aktyvumas žolės mėginiuose nustatytas ABTS metodu įvairavo nuo 23,07 mg/g iki 81,92 mg/g, lapų mėginiuose nuo 32,53 mg/g iki 88,48 mg/g, stiebų mėginiuose nuo 11,60 mg/g iki 59,45 mg/g.

Tyrimo išvados: Optimalios ekstrakcijos sąlygos flavonoidų kiekio nustatymui: tirpiklis - 80% (V/V) etanolis, ekstrakcijos trukmė – 20 min. Didžiausias flavonoidų ir fenolinių junginių kiekiai, bei antioksidantinis aktyvumas nustatytas lapų mėginiuose. Nustatyta reikšminga stipri koreliacija tarp antioksidantinio aktyvumo ir flavonoidų bei fenolinių junginių kiekio ($p < 0,01$).

SUMMARY

The master thesis by Jonas Chomenka. The supervisor is prof. Dr. Valdas Jakštas; Lithuanian University of Health Sciences, Academy of Medicine, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Kaunas.

The topic of the master thesis: The analysis of variability of flavonoids, phenolic compounds quantities and antioxidant activity in herb of *Polygonum persicaria* L.

The aim of the research: to examine the variety of antioxidant activity, flavonoids and phenolic compounds quantity during vegetation in herb, leaves and stems samples of naturally growing lady's thumb (*Polygonum persicaria* L.) and variety of these parameters in samples selected from different regions of Lithuania.

The objectives of the research: to select optimal conditions for extraction of flavonoids and total phenolic compounds quantity evaluation in samples of lady's thumb; to evaluate the variety of total flavonoids quantity during vegetation in samples of lady's thumb herb, leaves and stems and variety of these parameters in samples collected from different Lithuania regions; to evaluate variety of total phenolic compounds quantity in samples of lady's thumb herb, leaves and stems; to analyse the antioxidant activity of lady's thumb samples using DPPH and ABTS methods.

The methods of the research: the method of spectrophotometry was used to evaluate the total amount of flavonoids and phenolic compounds. The antioxidant activity was established using DPPH, ABTS and spectrophotometry methods.

The results of the research: the total amount of flavonoids in herb samples varied from 0.36 to 1.00 %, in leaves samples: 0.46 - 1.13 %, in stems samples: 0.08 - 0.20 %. During vegetation the amount of flavonoids in herb samples varied from 0.36 to 1.03 %. Total amount of phenolic compounds in herb samples varied from 32.12 mg/g to 85.63 mg/g, in leaves samples: 37.84 mg/g - 99.98 mg/g, in stems samples: 18.30 mg/g - 59.71 mg/g. During vegetation the amount of phenolic compounds in herb samples varied: 48.80 mg/g - 70.34 mg/g. Antioxidant activity established using DPPH method in herb samples varied from 36.85 to 81.93 %, in leaves samples: 58.29 - 87.74 %, in stems samples: 22.61 - 77.26 %. During vegetation antioxidant activity in herb samples varied: 55.16 - 84.59 %. Antioxidant activity established using ABTS method in herb samples varied from 23.07 mg/g to 81.92 mg/g, in leaves samples: 32.53 mg/g - 88.48 mg/g, in stems samples: 11.60 mg/g - 59.45 mg/g. During vegetation antioxidant activity in herb differed: 62.27 mg/g - 82.24 mg/g.

The conclusions: optimal conditions for extraction of flavonoids: solvent - 80 % (V/V) ethanol, extraction time – 20 min. The greatest quantity of flavonoids, phenolic compounds and antioxidant activity was measured in leaves samples. Meaningful strong correlation was established among antioxidant activity and flavonoids and phenolic compounds quantity ($p < 0.01$).

SANTRUMPOS

ABTS	2,2-azino-bis-3-etilbenztiazolin-6-sulfono rūgšties radikalas
DNR	deoksiribonukleininė rūgštis
DPPH	2,2-difenil-1-pikrihidrazilo radikalas
GAE	galo rūgšties ekvivalentas
NADPH	nikotinamido adenino dinukleotido fosfato redukuota forma
p	reikšmingumo lygmuo
RE	rutino ekvivalentas
RNS	reaktyvios azoto formos
ROS	reaktyvios deguonies formos
SSN(%)	santykinis procentinis standartinis nuokrypis
TE	trolokso ekvivalentas

IVADAS

Dėmėtasis rūgtis (*Polygonum persicaria* L.) yra vienmetis žolinis augalas, priklausantis rūgtinių (*Polygonaceae* L.) augalų šeimai. Dėmėtųjų rūgčių žaliava yra antžeminė dalis (žolė). Žaliava renkama augalo žydėjimo metu. Dėmėtųjų rūgčių žolėje yra kaupiami flavonoidai ir fenoliniai junginiai [3]. Augalas yra paplitęs visoje Lietuvoje.

Vis dažniau flavonoidai tampa medicininių tyrimų objektu. Yra nustatyta, kad jie pasižymi: antiuždegiminiu, osteogeniniu, enzimus inhibuojančiu, antimikrobinu, antialerginiu, vaskuliniu bei citotoksiniu priešvėžiniu, antiepileptiniu aktyvumu [14, 11]. Plačiausiai ištirtas yra fenolinių junginių ir flavonoidų antioksidantinis poveikis. Šis poveikis yra labai svarbus apsaugai nuo oksidacinio streso. Oksidacinį stresą gali sukelti ypač padidėjusi reaktyvaus deguonies rūšių (ROS): hidroksilo radikalų ($\text{HO}\bullet$), superoksido anjonų radikalų ($\text{O}_2\bullet$), vandenilio peroksido (H_2O_2), peroksilo radikalų ($\text{HOO}\bullet$) ir didelių azoto oksido ($\text{NO}\bullet$) kiekių gamyba [16, 48]. Oksidacinis stresas yra labiausiai žinomas mechanizmas epilepsijos vystymesi ir progresavime bei kitose ligose, įskaitant Alzheimerio ligą, lėtines degeneracines ligas, insultą, reumatoidinį artritą, cukrinį diabetą ir vėžį [48].

Dėmėtųjų rūgčių vaistinės augalinės žaliavos fitocheminė sudėtis (flavonoidų bei fenolinių junginių kiekis) yra siejama su jų antioksidantiniu poveikiu ir galimu panaudojimu ligų gydymui ar jų prevencijai, kaip profilaktinė priemonė. Todėl yra svarbu nustatyti šių junginių įvairavimą bei ryšį tarp jų ir antioksidantinio aktyvumo.

Darbo naujumas: Pirmą kartą Lietuvoje tirtas dėmėtųjų rūgčių (*Polygonum persicaria* L.) žolės flavonoidų, suminio fenolinių junginių kiekių ir antioksidantinio aktyvumo įvairavimas vegetacijos laikotarpiu bei šių rodiklių įvairavimas skirtinguose Lietuvos regionuose surinktuose mėginiuose. Taip pat nustatytas šių rodiklių įvairavimas skirtinguose augalo organų (žolės, lapų, stiebų) mėginiuose. Įvertintas antioksidantinio aktyvumo ir flavonoidų bei suminio fenolinių junginių kiekio koreliacijos ryšys.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: ištirti flavonoidų ir fenolinių junginių kiekio bei antioksidantinio aktyvumo įvairavimą vegetacijos laikotarpiu natūraliai augančių dėmėtųjų rūgčių (*Polygonum persicaria* L.) žolės, lapų bei stiebų mėginiuose bei šių parametrų įvairavimą skirtinguose Lietuvos regionuose surinktuose mėginiuose.

Darbo uždaviniai:

1. Parinkti optimalias ekstrakcijos sąlygas flavonoidų ir suminio fenolinių junginių kiekio nustatymui dėmėtųjų rūgčių mėginiuose.
2. Nustatyti suminio flavonoidų kiekio įvairavimą dėmėtųjų rūgčių žolės, lapų ir stiebų mėginiuose vegetacijos laikotarpiu bei šių junginių kiekio įvairavimą skirtinguose Lietuvos regionuose surinktuose mėginiuose.
3. Įvertinti bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimą dėmėtųjų rūgčių žolės, lapų ir stiebų mėginiuose.
4. Nustatyti dėmėtųjų rūgčių mėginių antioksidantinį aktyvumą DPPH ir ABTS metodais ir įvertinti šio rodiklio įvairavimą skirtinguose augalo organuose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Rūgtinių (*Polygonaceae* L.) šeima

Rūgtinių šeimai priklauso apie 1200 rūšių [36]. Jos priskiriamos maždaug 50 genčių. Didžiausios gentys yra Pūkvijų (*Eriogonum* L., 240 rūšių), Rūgštynių (*Rumex* L., 200 rūšių), Pajūrenių (*Coccoloba* L., 120 rūšių), Rūgčių (*Persicaria* L., 100 rūšių) ir Džuzgūnų (*Calligonum* L., 80 rūšių) [20]. Šiai šeimai priklausančios augalai auga visame pasaulyje.

1.2 Dėmėtasis rūgtis (*Polygonum persicaria* L.)

Morfologiniai požymiai. Dėmėtasis rūgtis (*Polygonum persicaria* L.) yra vienmetis 20-80 cm aukščio žolinis augalas, priklausančias rūgtinių (*Polygonaceae* L.) augalų šeimai [3].

Augalo šaknis siūliška, išsišakojusi. Neturi šakniastiebio. Stiebas dažniausiai šiek tiek rausvas, kylantis arba status, su bambliais, lygus arba šakotas, plikas. Lapai lacentiški arba linijiškai lacentiški, 3-15 cm ilgio, 0,5-3 cm pločio, nusmailėjusiomis viršūnėmis, bekočiai, stiebą apgaubę makštimis. Jų viršutinė pusė išmarginta raudonai rudomis dėmėmis. Senesni lapai dažniausiai šiek tiek plaukuoti. Žiedai sukrauti tankiuose, gana storuose bei stačiuose, netikros varpos žiedynuose, kurie gali būti susitelkę stiebų ir šakų viršūnėse ar lapų pažastyse. Apyžiedis būna 2,5-3 mm ilgio, paprastas, sudarytas iš penkių vainiklapių, rožinės ar rečiau baltos spalvos, giliai suskaldytas. Žydi nuo liepos iki spalio mėnesio. Vaisius yra lėšio formos, 1,8-2,7 mm ilgio beveik juodas, blizgus riešutėlis lygiu ar grūdėtu paviršiumi. Augalas dauginasi sėklomis. Viena augale gali subręsti 200-800 sėklų, kurios daigios dirvožemyje išbūna nuo 20 iki 30 metų [3, 17].

Žaliavos ruošimas ir laikymas. Dėmėtųjų rūgčių žaliava yra žolė - antžeminė dalis. Žaliava renkama augalo žydėjimo metu. Pjaunama viršutinė augalų dalis su žiedais, kuri turėtų būti 40 cm ilgio, o kieti, turintys mažai lapų stiebai paliekami. Iš surinktos žolės išrenkamos priemaišos – kitų augalų dalys, pageltusios ar pažeistos šakos. Žaliava ruošiama gerai vėdinamoje patalpoje ar pavėsyje paskleidžiant ją plonu sluoksniu ir džiovinant 40-45 °C. Laikoma sausoje vietoje, sudėta į popierinius maišus. Geriausia žaliavą vartoti iki 2 metų [3].

Paplitimas. Dėmėtasis rūgtis yra labai plačiai pasaulyje paplitęs augalas. Jis randamas Europoje, Rusijoje, Kaukaze, netropinėje Azijoje, Šiaurės ir Pietų Afrikoje. Šiaurės ir Pietų Amerikoje bei Australijoje atgabentas iš kitų vietovių. Lietuvoje šis augalas randamas labai dažnai, nes yra paplitęs visoje šalyje [3]. Auga paupiuose, pievose, drėgnose ir molingose dirvose, dirvonuose, pakelėse, daržuose, griovių krantuose, daugiausia derlinguose dirvožemiuose. Gali ištvirti ir sausros periodus. Netoleruoja rūgštaus dirvožemio [51].

Fitocheminė sudėtis. Skirtingi autoriai, nurodo skirtingus flavonoidus, kuriuos kaupia dėmėtasis rūgtis. *Polygonum persicaria* L. žolėje yra daug flavonoidų: kvercetino darinių, kurių kiekis siekia 2,5-3,0%, avikuliarino, hiperozido, kvercitrino [3]. Kiti autoriai nurodo, jog yra: taksifolino, luteolino, isorhamnetino, kvercetino, kempferolio ir ramnetino [52]. A.V. Kurkina ir kiti (2013) dėmėtųjų rūgčių antžeminės dalies tyrimo metu nustatė šiuos flavonoidus: pinostrobiną, poligochalkoną, astragaliną (kempferolio glikozidas), izokvercitriną, kvercitriną (kvercetino glikozidas) ir persikochalkoną. Taip pat yra duomenų jog sudėtyje rasta ir rutino [32]. Nustatytos kitos medžiagos: 1,5-3,0% raugų, B grupės vitaminų, askorbo rūgšties, vitamino K, eterinio aliejaus, flobafenų, acto rūgšties, sviesto rūgšties, mineralinių medžiagų [3].

Medicininis panaudojimas. Gimdos, tiesiosios žarnos, hemorojinius kraujavimus stabdanti priemonė. Taip pat naudojama širdies bei kraujagyslių sistemos ligoms, priešgrybelinėms infekcijoms, inkstų ligoms gydyti. Pasižymi skausmą mažinančiomis ir priešuždegiminėmis savybėmis [3, 15, 32].

1.3 Fenoliniai junginiai

Fenoliniai junginiai yra augalų metabolitai ir yra plačiai paplitę augalų tarpe. Juos taip pat sintetina kai kurios grybų, dumblių, bakterijų rūšys. Šie junginiai yra labai svarbūs augalų augimui bei reprodukcijai. Pažeidus augalus, pakeitus aplinkos sąlygas, jie pradeda sintezuoti fenolinius junginius, kaip atsaką į nepalankias sąlygas ar patogenus, norėdami apsaugoti. Jie kaip cheminiai signalai dalyvauja ląsteliniuose ir tarpląsteliniuose procesuose. Taip pat yra svarbūs priviliojant vabzdžius, kurie apdulkina augalus. Taip pat yra žinoma, kad polifenoliniai junginiai apsaugo augalus nuo patogeninių mikroorganizmų, kenksmingo ultravioletinių saulės spindulių poveikio ir galimo oksidacinio streso [6].

Dauguma fenolinių junginių yra fenolinių glikozidų arba fenolinių esterių formoje. Tai žinoti yra svarbu, norint ekstrahuoti fenolinius junginius iš augalo. Pagrindinis fenolinių junginių struktūros bruožas yra aromatinis žiedas, galintis turėti vieną ar kelias hidroksilo grupes. Yra įvairių fenolinių junginių klasifikacijų, pavyzdžiui: atsižvelgiant į anglies atomų skaičių molekulėje; atsižvelgiant į hidroksilo grupių skaičių klasifikuojami į paprastus fenolinius junginius ir į polifenolius. Augaluose randami fenoliniai junginiai skirstomi į paprastus fenolinius junginius, fenolines rūgštis ir fenolinius aldehydus, acetofenonus, kumarinus, flavonoidus, benzofenonus, ksantonus, stilbenus, benzokvinonus, antrakinonus, naftakinonus, betacianinus, hidrolizuojamus, kompleksinius ir kondensuotus taninus, ligninus bei lignanus, flobafenus [59].

Fenolinės rūgštys skirstomos į dvi klases: hidroksibenzenkarboksi rūgštys ir hidroksicinamono rūgštys. Pirmajai klasei būdinga C6-C1 struktūra, o individualius rūgščių skirtumus lemia aromatinio žiedo hidroksilo ir metoksi grupių pakaitai. Hidroksicinamono rūgštys turi

charakteringą C6-C3 struktūrą su trijų anglies atomų šonine grandine. Pagal benzeno žiedo hidroksilo ir metoksi grupes skiriamos p-kumaro, kavos, ferulo, sinapo rūgštys. Chlorogeno rūgštis yra kavos rūgšties esteris. Ji viena dažniausiai sutinkamų hidroksicinamono rūgščių augaluose [34].

Fenolinių junginių gausu vaisiuose, daržovėse ir kituose augalinės kilmės maisto produktuose. Polifenoliai laikomi nemaistiniaisiais bioaktyviais mitybos komponentais, kurie pasižymi priešuždegiminiu, antialerginiu, antibakteriniu, priešvirusiniu, antioksidantiniu, antitrombogeniniu, priešvėžiniu (antimutageniniu ir antikancerogeniniu), kardioprotekcinu ir vazoprotekcinu poveikiais. Atliktais tyrimais įrodyta, kad didelis fenolinių junginių kiekis žmogaus mityboje mažina riziką susirgti lėtinėmis ligomis, nes jie pasižymi antioksidantinėmis savybėmis ir taip apsaugo ląsteles oksidacinio streso metu, neutralizuodami žalingą laisvųjų radikalų poveikį [24, 34]. Daugelio fenolinių junginių antioksidantinis aktyvumas yra daug didesnis nei gerai žinomų antioksidantų, tokių kaip askorbo rūgštis ar vitaminas E [1].

1.4 Flavonoidai

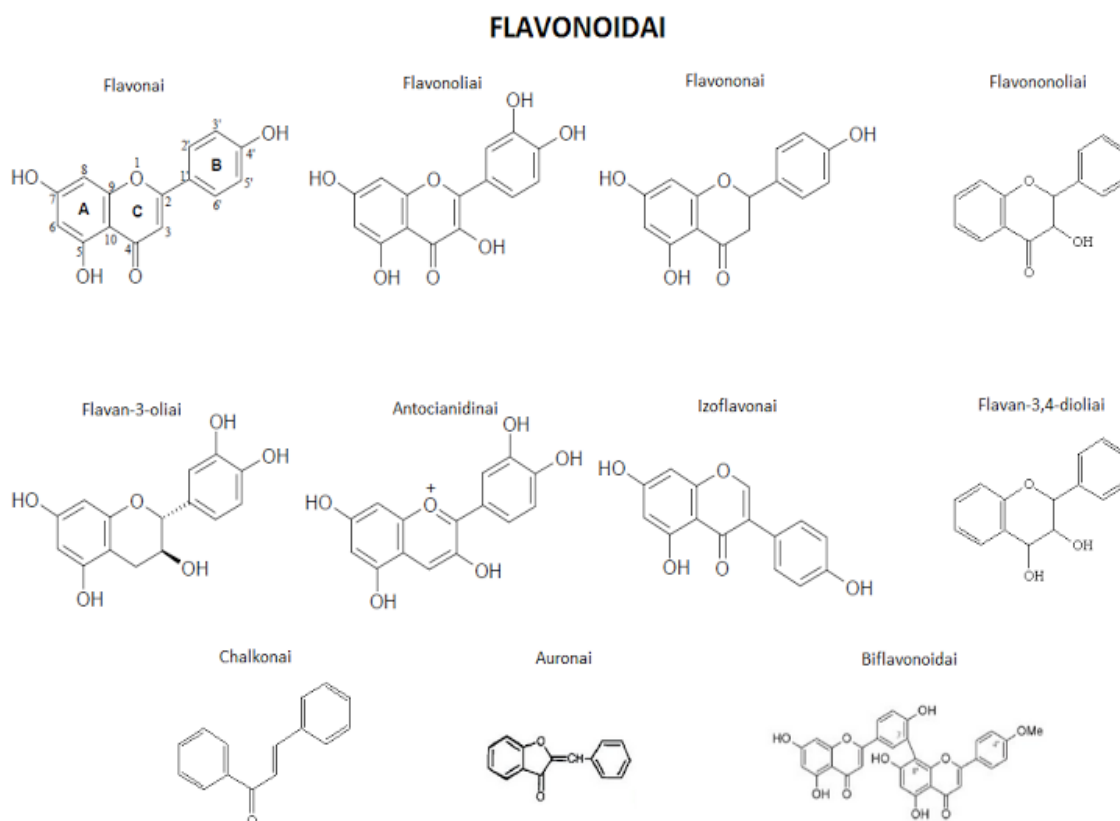
Flavonoidai yra fenolinių junginių grupė pasižyminti antioksidantiniu poveikiu. Yra nustatyta daugiau nei 4000 atskirų flavonoidų. Dažniausiai jie turi bendrinę struktūrą, kuri yra sudaryta iš dviejų aromatinų žiedų (A ir B žiedai) sujungtų trimis anglies atomais, kurie yra oksiduoto heterociklo žiede (C žiedas). Atsižvelgiant į struktūrinius pokyčius C žiede flavonoidai yra skirstomi į šias grupes: flavonoliai (rutinas, miricetas, kemferolis, kvercetas), flavanonoliai (taksifolinas, pinobaksinas), flavonai (luteolinas, apigeninas), izoflavonoidai (genistas), flavan-3-oliai (katechinas) ir antocianidinai (antocianas, malvidinas), flavanonai (likviritinas, likveritigeninas), chalkonai (chalkonas, izolikviritinas), auronai (auronas, 3,4-dihidroksiauronas), biflavonoidai ir flavan-3-4dioliai (1pav) [34, 54].

Gamtoje dažniausiai aptinkami glikozilintoje arba esterifikuotoje formose, bet gali pasitaikyti ir aglikonai. Gamtoje gali būti rasta daug įvairių glikozidų, daugiau nei 80 įvairių cukrų buvo rasta prisijungusių prie flavonoidų [34, 54]. Dažniausiai flavonoidai būna O-glikozidų forma, rečiau – C-glikozidų forma. Flavonoidų glikozidų įvairovė priklauso nuo kelių faktorių: flavonoido struktūros ir skirtingo prisijungusių cukrų molekulių kiekio, kuris gali būti prijungiami glikozidavimo metu. Pagrindiniai monosacharidai yra: gliukozė, galaktozė, ramnozė, arabinozė [8].

Atliekant flavonoidų ekstrakciją yra patartina naudoti išdžiovintus, liofilizuotus arba užšaldytus mėginius. Naudojant sausus mėginius dažniausiai jie yra susmulkinami į miltelius arba smulkias daleles. Norint užtikrinti, kad visos dalelės yra reikiamo dydžio, susmulkinta žaliava gali būti siojama per pasirinkto dydžio sietus. Parenkant ekstrakcijos tirpiklį yra labai svarbus jo poliškumas. Mažiau poliniai flavonoidai ekstrahuojami šiais tirpikliais: chloroformu, dichlormetanu, dietil eteriu

arba etilacetatu. Flavonoidų glikozidai ir labiau poliniai anglikonai ekstrahuojami tokiais tirpikliais kaip alkoholis arba alkoholio-vandens mišiniu. Paruoštos ištraukos yra išvalomos, perfiltruojamos. Flavonoidai identifikuojami efektyviosios skysčių chromatografijos, spektrofotometriniais, plonasluoksnės chromatografijos metodais. Kiekybiniam nustatymui dažniausiai taikomas aukšto slėgio skysčių chromatografijos metodas, bet taip pat gali būti nustatinėjama potenciometriškai, spektrofotometriškai, branduolių magnetiniu rezonansu ir kitais būdais [4].

Flavonoidai pasižymi antioksidantiniu poveikiu. Klinikinis poveikis: antiaterosklerotinis, priešušdegiminis, priešvėžinis, antitrombogeninis, antiosteoporotinis, priešvirusinis [43].



1 pav. Flavonoidų grupės

1.4.1 Antocianinai ir Antocianidinai

Antocianinai nuo antocianidinų skiriasi tuo, jog turi cukrinę dalį. Antocianidinai yra pati reikšmingiausia grupė iš dažančių medžiagų augaluose. Šie junginiai nulemia daugumą rožinių, raudonų, violetinių, mėlynų spalvų augalų vainiklapiuose, lapuose, vaisiuose. Jie gaunami hidratuojant, dehidratuojant, metilinant ir glikozilinant cianidiną. Dauguma pastaraisiais metais surinktų įrodymų apie antocianidinų poveikį yra paremti tyrimų *in vitro* ir tyrimų su gyvūnais rezultatais. Po truputį daugėja ir papildomų duomenų iš atliktų klinikinių tyrimų su žmonėmis.

Biomedicininis poveikis, kuris priskiriamas tiek gryniems antocianinams, tiek antocianinus kaupiančioms uogoms ar ekstraktams, nurodo didelę žmogaus organizmui naudingų poveikių įvairovę: regėjimo pagerėjimui, pažinimo funkcijai, nutukimui, apsaugai nuo opų susidarymo, širdies ir kraujagyslių sistemos ligų rizikai bei vėžio prevencijai [35].

Buvo nustatyta, kad iš mėlynių išgauti antocianidiniai stipriai pagerina žmogaus naktinio regėjimo prisitaikymą [39]. Taip pat atliktas klinikinis tyrimas su trumparegiais žmonėmis parodė akivaizdų naktinės regos pagerėjimą vartojant pakartotines dideles išgryninto antocianozido oligomerų dozes [33]. Kelių atliktų tyrimų su gyvūnais metu, buvo nustatyta, kad antocianinai ir uogų ekstraktai gali pagerinti pažinimo funkcijas ir apsaugoti smegenis sumažinant oksidacinę išeminę žalą bei pagerinant atmintį [27].

Antocianidinų kaip ir kitų flavonoidų apsauginis poveikis nuo širdies bei kraujagyslių ligų yra susietas su apsauga nuo oksidacinio streso. Taip pat antocianinų vartojimas yra siejamas su skirtingu širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksnių mažinimu. Atlikus tyrimus su žiurkėmis, kurioms nustatyta hiperlipidemija, aronijos sulčių, kuriose yra antocianinų, vartojimas sumažino suminį plazmos cholesterolio lygį ir mažo tankio lipoproteinų kiekį [57]. Remiantis Xia ir kt. (2003) atliktu tyrimu nustatyta, kad antocianiniais praturtinti juodųjų ryžių ekstraktai taip pat sumažino trigliceridų, bendrojo cholesterolio lygį serume ir sumažino aterosklerozinių plokštelių plotą apolipoproteinino E stokojančiose pelėse [61]. Neseniai taip pat buvo įrodyta, kad standartizuoti jamaikinės kinrožės (*Hibiscus sabdariffa* L.) žoliniai produktai, sudėtyje turintys didelius antocianinų kiekius, ženkliai sumažino kraujo spaudimą ir plazmos angiotenziną konvertuojančio enzimo aktyvumą pacientams, sergantiems hipertenzija [21].

Polifenolių, tame tarpe ir antocianinų chemopreventines savybes yra sudėtinga pademonstruoti ir daugelis sukaupų įrodymų yra daugiausiai pagrįsti tyrimais *in vitro* ir gyvūnų modeliuose [19]. Tyrimuose *in vitro* bei *in vivo* buvo nustatyta, kad antocianidiniai gali sumažinti vėžinių ląstelių proliferaciją ir slopinti auglio formavimąsi [22, 26, 30]. Chemopreventinis uogų ar išskirtų ekstraktų poveikis taip pat buvo nustatytas tiriant gyvūnų virškinamojo trakto vėžio modelį. Mėlynių ekstraktų, kuriuose yra daug antocianinų vartojimas sumažino žarnų adenomų skaičių pelių modelyje [12]. Kito tyrimo metu buvo tiriami vaisių ekstraktai ir buvo įrodyta, kad jie yra veiksmingi prieš įvairias vėžio formavimosi stadijas, tačiau buvo tirtas ne individualus antocianidinų vaidmuo, bet viso vaisių ekstrakto poveikis [9].

1.4.2 Flavonoliai

Flavonoliai, ypač kvercetas, buvo plačiai tyrinėjami daugiausiai dėl to, kad jie itin paplitę maistiniuose augaluose. Buvo nustatyta, kad flavonolių paros dozė svyruoja tarp 20-35 mg/d. Iširta,

jog kvercetino gliukozidai žmogaus organizme buvo efektyviau absorbuoti už patį kvercetiną, tuo tarpu rutinas buvo absorbuojamas dar lėčiau [38]. Flavonoliai mažina riziką susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis. Šis poveikis gali pasireikšti dėl jų antioksidantinių savybių. Taip pat antioksidantinės flavonolių savybės padeda išvengti oksidacinės žalos ląstelėms, lipidams, DNR ir išvengti ląstelių žūties. Flavonoliai taip pat siejami su vėžio ar insulto rizikos mažinimu.

1.4.3 Flavanonai

Keliuose eksperimentuose su gyvūnais ir tyrimuose *in vitro* yra pranešama, kad šios medžiagos pasižymi plataus spektro biologiniu ir farmakologiniu aktyvumu: antioksidantiniu, mažinančiu cholesterolio kiekį, apsaugančiu nuo kaulų retėjimo bei poveikiu prieš auglius. Tai parodo, kad jie gali pasižymėti naudingu poveikiu žmonėms, sergantiems tokiais ligomis kaip širdies ir kraujagyslių ligos, cukrinis diabetas, osteoporozė ar vėžys [19]. Žiurkių, turinčių miokardo infarktą, modeliuose kelių naringino dozių vartojimas per burną 56 dienas nuslopino lipidų peroksidaciją ir pagerino antioksidantinę būseną [47]. Peles maitinant maistu, į kurio sudėtį įtrauktas naringeninas, 21 dieną, buvo nustatyta kepenyse padidėjusi riebalų rūgščių oksidacija, tarpininkaujant keletą kepenų enzymų reguliacijai, ir sumažėjęs kraujo serumo trigliceridų, cholesterolio, fosfolipidų bei riebalų rūgščių kiekis [19]. Nustatyta, kad hesperidinas ir naringeninas eksperimentiniuose gyvūnuose taip pat skatina apsaugines funkcijas prieš padidėjusią kepenų intoksikaciją [44]. Iširta, jog vandenyje tirpius hesperidino darinius dozuojuant 500 mg per dieną 24 savaites, tyrimo subjektuose pastebėtas reikšmingas trigliceridų kiekio sumažėjimas kraujo serume. Taip pat ir kelių apolipoproteinų kiekio bei labai mažo tankio lipoproteinų ir mažo tankio lipoproteinų santykio sumažėjimas [40]. *In vitro* tyrimų metu buvo nustatyta, kad sintetiniai chalkonai, flavanonai ir flavonai pasižymėjo aktyvumu prieš kai kurias vėžines ląsteles ir dėl to yra tikslinga atlikti tolimesnius *in vivo* tyrimus [10]. Flavanonų antikancerogeninės ir antiproliferatinės savybės yra nustatytos tik kelių tyrimų metu, kaip tiriamąjį objektą naudojant gyvūnus [23].

1.4.4 Izoflavonoidai

Izoflavonoidai yra flavonoidų grupė, kuri priskiriama taip vadinamiems fitoestrogenams [19]. Įvairūs atlikti tyrimai rodo priešingus rezultatus. Kai kurių iš jų metu buvo nustatyti teigiami izoflavonų efektai, tokie kaip karščio pylimo sumažėjimas esant menopauzei [28, 60], gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžio bei krūtų vėžio rizikos sumažėjimas [13, 58] ir imuninės funkcijos pagerėjimas [50]. Kituose tyrimuose yra pranešimų apie labai mažą ar nedidelį šių junginių poveikį [55]. Taip pat yra atliktų tyrimų, kurių metu nenustatytas reikšmingas izoflavonoidų poveikis esant tam tikriems organizmo sutrikimams. Atlikto tyrimo rezultatai parodė, kad vartojant sojų baltymus su izoflavonais

ar vienus izoflavonus atitinkamomis dozėmis nenustatyta jokio reikšmingo poveikio matuojamiems širdies ir kraujagyslių ligų rizikos faktoriams kinietėms moterims, sergančioms ankstyvąja hiperglikemija, kurioms buvo pasireiškusi menopauzė [35]. Kito tyrimo metu nerasta jokių įrodymų dėl izoflavonų poveikio pacientams. Nenustatytas svarbus cholesterolio kiekio sumažėjimas hipercholesterolemija sergantiems žmonėms. Tačiau buvo pabrėžta, jog šio tyrimo rezultatus derėtų vertinti atsargiai dėl galimų netikslumų ir mažo tyrime dalyvavusių žmonių skaičiaus [45].

1.5 Oksidacinis stresas

Žalingas reaktyvių deguonies formų (ROS) ir reaktyvių azoto formų (RNS) radikalų poveikis, kuris gali sukelti biologinę žalą atitinkamai apibūdinamas kaip oksidacinis stresas [46]. Oksidacinis stresas pasireiškia, kai organizme padidėja ROS arba RNS gamyba, arba, kai atsiranda fermentinių bei nefermentinių antioksidantų trūkumas. Oksidacinis stresas yra sudėtinis procesas. Jo įtaka organizmui priklauso nuo oksidantų tipo, jų gamybos vietos ir intensyvumo, įvairių antioksidantų sudėties ir aktyvumo bei galimybės atstatyti sistemas [18].

ROS apima visus nestabilius molekulinio deguonies (O_2) metabolitus, kurie turi didesnę reaktyvumą nei deguonies molekulė: hidroksilo radikalai ($HO\bullet$), superoksido anijonų radikalai ($O_2\bullet$), vandenilio peroksidas (H_2O_2), peroksilo radikalai ($HOO\bullet$) ir azoto oksido ($NO\bullet$) radikalai. Šie ROS susidaro kaip normalaus aerobinio metabolizmo bioproduktai, tačiau jų kiekiai didėja esant oksidaciniam stresui, kas sukelia pagrindinį sveikatos pavojų [16, 48].

Oksidacinį stresą ląstelėse gali sukelti įvairūs veiksniai, tokie kaip: jonizuojanti radiacija, ultravioletiniai spinduliai, tabako dūmai, patogeninės infekcijos, toksinis ir herbicidų ar insekticidų poveikiai [5]. Mitochondrijos, membranos plazma, endoplazminis tinklas ir peroksisomos yra pagrindinės ląstelių organelės, atsakingos už ROS gamybą [5, 46]. Mitochondrijos sintetina adenzintrifosfatą per oksidacinio fosforilinimo procesų seką. Esant šiam procesui gali atsirasti vieno ar dviejų elektronų redukcija vietoj keturių elektronų redukcijos deguonies molekulėje, ko pasekoje susidaro vandenilio peroksidas ir jis gali būti paverstas kitomis ROS rūšimis. Kiti ROS šaltiniai gali būti reakcijos, į kurias įtrauktos peroksisomų oksidazės, citochromo P-450 fermentai, NAD(P)H oksidazės ar ksantino oksidazės [46].

Viena dažniausių ROS yra hidroksilo radikalas, kuris gali sukelti oksidacinį stresą. Jis yra mažas, labai mobilus, vandenyje tirpus ir chemiškai reaktyviausias tarp ROS. Jis gali būti sintezuojamas iš deguonies, ląstelės metabolizmo metu ir esant anksčiau minėtiems oksidacinį stresą sukeliantiems veiksniams [5].

Padidėjusi laisvųjų radikalų gamyba gali pažeisti tokias biomolekules kaip lipidai, baltymai, DNR [56]. DNR bazės yra labai jautrios ROS oksidacijai. Šios oksidacinės modifikacijos veda prie

funkcinių įvairių tipų baltymų (fermentinių ir struktūrinių) pokyčių, kas gali turėti esminę fiziologinę įtaką [46]. Galiausiai šie pažeidimai gali sukelti tokias ligas, kaip aterosklerozę, vėžį, diabetą, reumatoidinį artritą, miokardo infarktą, širdies ir kraujagyslių sistemos ligas, lėtinius uždegimus, insultą, senėjimą ir kitas degeneracines ligas (Parkinsono, Alzheimerio ir kt.) [56].

1.6 Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Dėmėtųjų rūgčių (*Polygonum persicaria* L.) žolėje yra kaupiami fenoliniai junginiai, tame tarpe ir flavonoidai. Šie junginiai pastaruoju metu dažnai tampa įvairių tyrimų objektais. Svarbiausia šių junginių savybė yra antioksidantinis poveikis.

Oksidacinio streso metu padaugėja ROS ir taip gali būti pažeidžiamos organizmo ląstelės. Tai turi įtakos įvairių lėtinių ligų, širdies ir kraujagyslių sistemos ligų, uždegiminių ir degeneracinių ligų, aterosklerozės, įvairių vėžio formų ir organizmo senėjimo patogenezei. Antioksidantiniu aktyvumu pasižyminčios medžiagos gali būti naudojamos šių ligų prevencijai ar gydymui. Dėl šių priežasčių yra svarbu nustatyti fenolinių junginių, flavonoidų kiekio bei antioksidantinio aktyvumo įvairavimą dėmėtųjų rūgčių žaliavoje. Taip pat svarbu įvertinti antioksidantinio aktyvumo priklausomybę nuo fenolinių junginių bei flavonoidų kiekio.

2. TYRIMO METODIKA

2.1 Tiriamasis objektas

Buvo tirta dėmėtųjų rūgčių (*Polygonum persicaria* L.) žolė, surinkta iš 15 skirtingų Lietuvos regionų 2013 metais liepos ir rugpjūčio mėnesiais. Taip pat žaliava rinkta 2014 metais nuo liepos 5 dienos iki rugpjūčio 30 dienos Šakių mieste, renkant vaistinę augalinę žaliavą kas savaitę. Žaliava buvo renkama žydėjimo metu, džiovinama kambario temperatūroje, gerai vėdinamoje patalpoje, apsaugota nuo tiesioginių saulės spindulių. Išdžiovinta žaliava buvo sudėta į popierinius maišelius ir juose laikoma taip pat gerai vėdinamoje, sausoje vietoje.

Lietuvos regionas (Rinkimo data). Kaunas (2013-08-13); Utena (2013-08-25); Stelmužė (2013-08-25); Šakiai (2013-08-09); Telšiai (2013-08-23); Panevėžys (2013-08-29); Kelmė (2013-07-27); Šiauliai (2013-07-26); Palūšė (2013-08-25); Vievis (2013-07-20); Anykščiai (2013-07-23); Leipalingis (2013-07-29); Marijampolė (2013-07-29); Klaipėda (2013-07-28); Rietavas (2013-08-04); Šakiai (2014-07-05); Šakiai (2014-07-12); Šakiai (2014-07-19); Šakiai (2014-07-26); Šakiai (2014-08-02); Šakiai (2014-08-09); Šakiai (2014-08-16); Šakiai (2014-08-23); Šakiai (2014-08-30).

2.2 Naudota aparatūra

Vaistinės augalinės žaliavos svėrimui buvo naudotos elektroninės svarstyklės „Sartorius AG“ (Götingen, Vokietija).

Ekstrakcijos buvo atliktos ultragarso bangų vonelėje „Elmasonic P“ (Elma, Vokietija).

Spektrofotometriniams tyrimams kaip: bendro flavonoidų kiekio, fenolinių junginių kiekio bei antioksidantinio aktyvumo DPPH ir ABTS metodais nustatymams buvo naudojamas spektrofotometras BECKMAN DU®-70 (Kalifornija, JAV).

2.3 Naudoti reagentai

Aliuminio chlorido heksahidratas įsigytas iš „Sigma-Aldrich Chemie GmbH“ (Steinheim, Vokietija). Rutinas iš „Roth“ (Karlsruhe, Vokietija).

Heksametilentetraminas iš „Sigma-Aldrich“ (Rusija).

Troloksas iš „Sigma-Aldrich Chemie GmbH“ (Danija).

2,2 – difenil–1–pikril-hidrazilas (DPPH) „Sigma – Aldrich Chemie GmbH“ (Steinheim, Vokietija).

ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninė rūgštis) iš „Alfa Aesar“ (Masačiusetasas, JAV).

Folin & Ciocalteu reagentas iš „Sigma-Aldrich“ (Buchs, Šveicarija).

Natrio karbonatas iš „Sigma-Aldrich“ (JAV)

Kalio persulfatas iš „Sigma-Aldrich Chemie GmbH“ (Steinheim, Vokietija).

Galo rūgšties monohidratas iš „Sigma-Aldrich“ (Honkongas, Kinija).

96,3 proc. V/V etanolis iš AB „Stumbras“ (Kaunas, Lietuva) ir iš AB „Vilniaus degtinė“ (Vilnius, Lietuva).

Koncentruota druskos rūgštis iš „Sigma-Aldrich Chemie GmbH“ (Steinheim, Vokietija).

Naudotas išgrynintas vanduo.

2.4 Tyrimo metodai

2.4.1 Tiriamųjų mėginių paruošimas

Dėmėtųjų rūgčių (*Polygonum persicaria* L.) žolė, lapai ir stiebai buvo susmulkinami elektriniu smulkintuvu. Apskaičiuojamas augalinės žaliavos nuodžiūvis. Ekstraktai paruošti sveriant 0,1 g susmulkintos augalinės žaliavos ir užpilant 8 ml ekstrakcijos tirpiklio. Bandymų būdu vaistinei augalinei žaliai parinkta ekstrakcijos tirpiklio koncentracija ir ekstrakcijos trukmė ultragarso bangų vonelėje. Gauti ekstraktai buvo perfiltruoti per vatą į 10 ml matavimo kolbutę, žaliava piltuvėlyje buvo perplauta vieną kartą 2 ml ekstrakcijos tirpiklio, neviršinant kolbutėje esančio matavimo brūkšnio. Gauti ekstraktai buvo laikomi sandariai užsuktuose tamsaus stiklo buteliukuose, nuo tiesioginių saulės spindulių apsaugotoje vietoje.

2.4.2 Bendras flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu

Paruoštuose dėmėtųjų rūgčių ekstraktuose buvo nustatomas suminis flavonoidų kiekis, išreikštas rutino ekvivalentu.

Aluminio chlorido tirpalas ruošiamas 18,106 g aluminio chlorido heksahidrato tirpinant distiliuotame vandenyje 100 ml kolbutėje iki žymės.

Heksametilentetramino tirpalas ruošiamas 5 g heksametilnetetramino tirpinant 100 ml kolbutėje distiliuotame vandenyje iki žymės. Tirpalas yra tinkamas naudojimui tol, kol išlieka skaidrus.

Tiriamasis tirpalas buvo ruošiamas į 25 ml matavimo kolbutę įpylus 1 ml vaistinės augalinės žaliavos etanolinio ekstrakto, 10 ml 96 proc. (V/V) etanolio, 0,5 ml 30 proc. druskos rūgšties tirpalo, 1,5 ml 10 proc. aluminio chlorido tirpalo ir 2 ml 5 proc. heksametilnetetramino tirpalo. Gautą tirpalą praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki atžymos ir tada 30 min. laikomas visiškoje tamsoje, apsaugant jį nuo tiesioginių saulės spindulių.

Palyginamasis tirpalas ruošiamas į 25 ml kolbutę įpylus 1 ml vaistinės augalinės žaliavos ekstrakto, 10 ml 96 proc. (V/V) etanolio, 0,5 ml 30 proc. druskos rūgšties tirpalo ir skiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės.

Spektrofotometru matuojamas tiriamųjų tirpalų absorbcijos dydis naudojant palyginamąjį tirpalą ir esant 407 nm bangos ilgiui.

Rutino tirpalų paruošimas. Pirmiausiai paruošiamas etaloninis rutino tirpalas: 50 ml matavimo kolboje 80 proc. (V/V) etanolyje tirpinama 0,025 g išdžiovinto rutino. Po to paruošiami tiriamasis ir palyginamasis rutino tirpalai. Jie gaminami tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip ir vaistinės augalinės žaliavos tirpalai, tik vietoje 1 ml vaistinės žaliavos ekstrakto imama 1 ml rutino tirpalo. Išmatuojamas rutino tirpalo absorbcijos dydis.

Suminis flavonoidų kiekis procentais, išreikštas rutino ekvivalentu, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{V_{VAŽ} \times m_R \times D_{VAŽ} \times 100}{m_{VAŽ} \times D_R \times 50}$$

$m_{(R)}$ – rutino masė, kuri buvo reikalinga rutino tirpalui paruošti, g;

$V_{(važ)}$ – visas paruoštas vaistinės augalinės žaliavos ekstrakto tūris, ml;

$D_{(važ)}$ – paruošto vaistinės augalinės žaliavos ekstrakto tiriamojo tirpalo absorbcijos dydis;

$m_{(važ)}$ – vaistinės augalinės žaliavos masė sunaudota ekstraktui ruošti, g;

$D_{(R)}$ – tiriamojo rutino tirpalo absorbcijos dydis.

2.4.3 Suminis fenolinių junginių kiekio nustatymas

Suminiam fenolinių junginių kiekio nustatymui buvo naudojamas Folin-Ciocalteu metodas.

Paruošiamas 7,5% natrio karbonato tirpalas. 100 ml matavimo kolboje distiliuotame vandenyje ištirpinama 7,5 g natrio karbonato. Gautas tirpalas praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki atžymos.

Darbinio Folin-Ciocalteu reagento paruošimas. Folin-Ciocalteu reagentas buvo praskiedžiamas distiliuotu vandeniu santykiu 1: 9.

Tiriamojo tirpalo paruošimas. Buvo paimta 0,5 ml tiriamo ekstrakto, sumaišyta su 2,5 ml darbinio Folin-Ciocalteu reagentu ir pridėta 2 ml natrio karbonato tirpalo. Gautas mišinys laikomas tamsoje, kambario temperatūroje 1 val. Spektrofotometru buvo išmatuota mišinio absorbcija esant 765 nm bangos ilgiui. Esant didesnei absorbcijai nei etaloninių galo rūgšties tirpalų kalibracinio grafiko absorbcijos reikšmėms, ekstraktai yra skiedžiami.

Palyginamasis tirpalas ruošiamas taip pat, tačiau vietoje tiriamo ekstrakto dedama parinktos koncentracijos etanolio.

Etaloninis galo rūgšties tirpalas ruošiamas 0,025 g tirpinant 25 ml kolbutėje parinktos koncentracijos etanolyje iki žymės.

Ruošiami 5 galo rūgšties tirpalai 10 ml kolbutėse: 0,1 ml, 0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml, ir 1 ml etaloninio tirpalo ir praskiedžiama atitinkamos koncentracijos (V/V) etanolyje iki žymės;

Tiek tiriamasis, tiek ir palyginamasis galo rūgšties tirpalai buvo paruošti tomis pačiomis sąlygomis kaip ir tiriamojo augalinio ekstrakto tirpalas. Tik vietoje 0,5 ml tiriamojo ekstrakto imta 0,5 ml žinomos koncentracijos (0,01 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,075 mg/ml ir 0,1 mg/ml) galo rūgšties tirpalų. Išmatavus absorbciją, sudaroma galo rūgšties kalibracinė kreivė, kuri pavaizduota 2 pav.

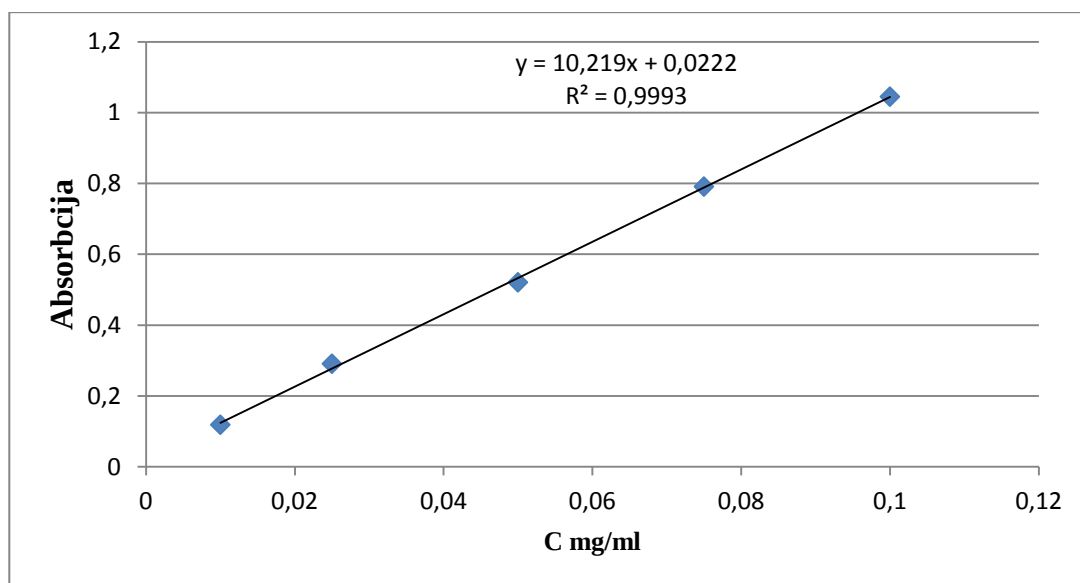
Suminis fenolinių junginių kiekis išreiškiamas GAE gramui žaliavos. Jis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{GAE} = c \times V / m, \text{ mg/g}$$

c – galo rūgšties koncentracija mg/ml nustatyta iš kalibracinės kreivės;

V – ekstrakto tūris ml;

m – atsvertas žaliavos kiekis, g.



2 pav. Galo rūgšties kalibracinė kreivė

2.4.4 Antioksidantinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu

Etaloninis DPPH tirpalas buvo paruoštas sveriant 0,0024 g DPPH radikalo (0,0001 g tikslumu), kuris ultragarso bangų pagalba buvo ištirpintas 80 proc. (V/V) etanolyje 100 ml tūrio matavimo kolboje iki atžymos. Paruošto tirpalo absorbcija buvo matuojama esant 515 nm bangos ilgiui. 80 proc. (V/V) etanolis panaudotas kaip palyginamasis tirpalas.

Tiriamasis tirpalas buvo ruošiamas paimant 60 µl tiriamojo ekstrakto, įpilant ir sumaišant su 3 ml etaloninio DPPH tirpalo. Palyginamajam tirpalui pagaminti panaudota 60 µl 80 proc. (V/V) etanolio ir 3 ml etaloninio DPPH tirpalo. Gauti mišiniai buvo laikomi visiškoje tamsoje pusę valandos. Praėjus šiam laikui, išmatuotas absorbcijos pokytis esant 515 nm bangos ilgiui.

Apskaičiuojamas tiriamųjų tirpalų inaktyvuoto DPPH radikalo kiekis proc.:

$$SAA = \frac{A(pal.) - A(tir.)}{A(pal.)} \times 100\%$$

A(tir.) – tiriamojo tirpalo absorbcijos reikšmė

A(pal.) – palyginamojo tirpalo absorbcijos reikšmė

2.4.5 Antioksidantinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu

Pradinio tirpalo paruošimas. Į tamsaus stiklo buteliuką suberiama 0,548 g atsvertų ABTS miltelių ir jie ištirpinami ultragarso bangų pagalba 50 ml distiliuoto vandens. Į gautą tirpalą įdedama 0,0095 g kalio persulfato. Indas užkemšamas, jame esantis tirpalas gerai sumaišomas ir paliekamas tamsoje 16 valandų.

Darbinio tirpalo paruošimas. Po 16 valandų pirminis ABTS tirpalas skiedžiamas distiliuotu vandeniu tol, kol nustatoma 0,800 absorbcijos reikšmė, esant 734 nm bangos ilgiui. Kaip palyginamasis tirpalas yra naudojamas distiliuotas vanduo.

Į mėgintuvėlį analizei imama 3 ml darbinio ABTS tirpalo ir įpilama 20 µl tiriamojo ekstrakto, gerai sumaišoma ir laikoma tamsoje valandą. Po to spektrofotometru išmatuojama absorbcija esant 734 nm bangos ilgiui.

Pirminio trolokso tirpalo gamyba. Atsveriami 25 mg trolokso miltelių ir juos ištirpiname 80 proc. etanolyje 25 ml kolbutėje. Pirminio tirpalo koncentracija yra lygi 1 mg/ml.

Gaminami 5 žinomų koncentracijų trolokso tirpalai. Imame 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml bei 5 ml pirminio trolokso tirpalo ir pilame 80 proc. (V/V) etanolio iki žymės 10 ml talpos kolbutėse.

Tyrimo metodika lygiai tokia pati kaip ir anksčiau, tik vietoje 20 µl ekstrakto imama 20 µl tam tikros koncentracijos trolokso tirpalo. Spektrofotometru išmatuojama absorbcija prie 734 nm bangos ilgio. Išmatavus absorbciją, brėžiama žinomų trolokso tirpalų koncentracijų (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml ir 0,5 mg/ml) kalibracinė kreivė, kuri parodyta 3 pav.

Laisvųjų radikalų surišimo geba išreiškiama antioksidanto trolokso ekvivalentais gramui žaliavos ir apskaičiuojama pagal formulę:

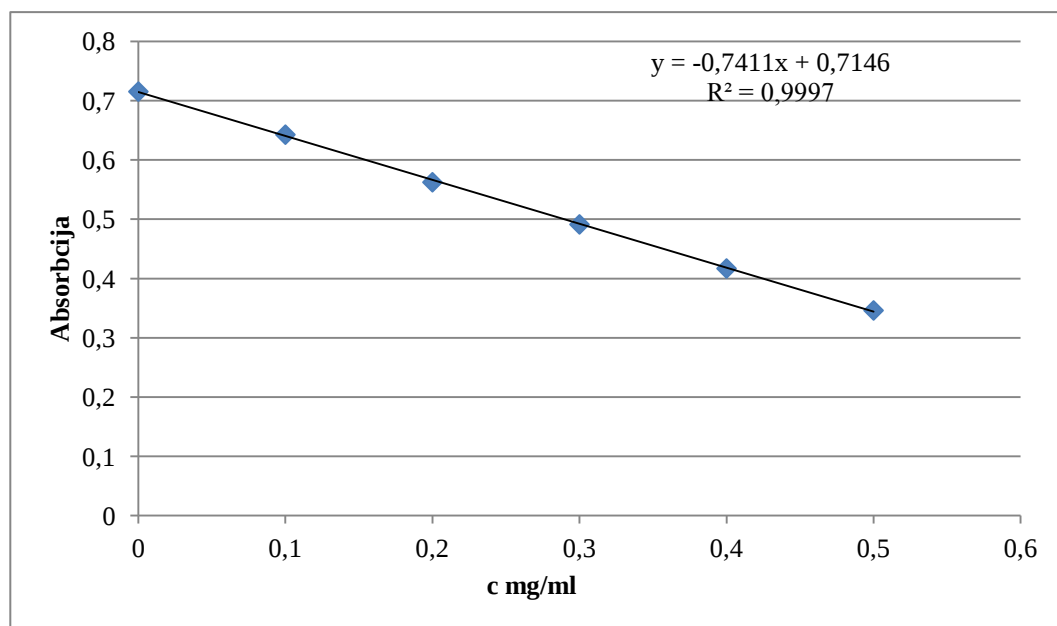
$$TE = c \times V/m$$

Čia:

c – trolokso koncentracija nustatyta iš kalibracinės kreivės mg/ml;

V – ekstrakto tūris ml;

m – tikslus atsvertas žaliavos kiekis g.



3 pav. Trolokso kalibracinis grafikas

2.5 Tyrimo metu gautų duomenų statistinis vertinimas

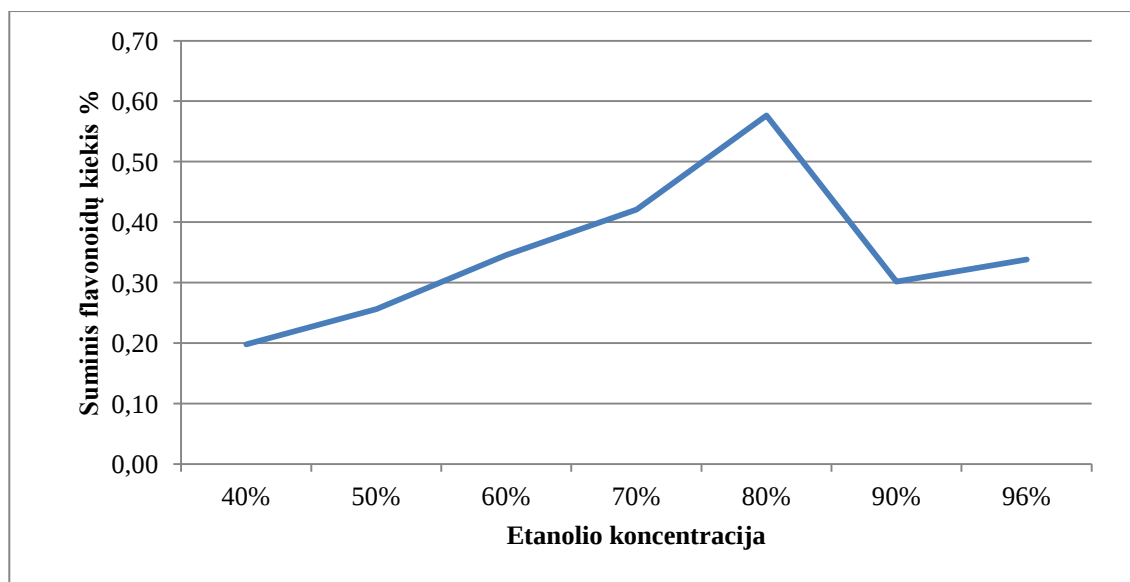
Statistinė duomenų analizė atlikta naudojantis „MS Excel 2007“ (Microsoft, JAV) ir SPSS 20.0 (SPSS Inc., JAV) programomis. Visi atlikti tyrimai pakartoti tris kartus ir išvestas gautų rezultatų matematinis vidurkis. Apskaičiuotas santykinis procentinis standartinis nuokrypis (SSN(%)). Taip pat apskaičiuoti Spirmeno koreliacijos koeficientai.

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APIBENDRINIMAS

3.1 Ekstrakcijos sąlygų parinkimas

Ekstrahuojant ultragarso pagalba, vonelėje yra gaminamos ultragarso bangos, kurios šalia mėginio audinių sukuria oro pūsleles. Joms sproguos suardomos ląstelių sienelės ir į tirpiklį išskiriamos medžiagos [29]. C. Kuo ir kt. (2014) tyrė trijų fenolinių junginių ekstrakcijos ultragarsu sąlygų įtaką ekstrakcijos išeigai. Buvo tirtos *Polygonacea* L. šeimos augalo *Polygonum cuspidatum* L. šaknys. Tirtas ryšys tarp ekstrakcijos išeigos ir ekstrakcijos veiksnių, tokių kaip ekstrakcijos temperatūros, tirpiklio koncentracijos ir ultragarso galios. Buvo nustatyta, jog ekstrakcijos tirpiklio ir temperatūros parinkimas turėjo reikšmingos įtakos visų trijų fenolinių junginių ekstrakcijos išeigai. Ultragarso galios parinkimas turėjo reikšmingos įtakos tik resviratolio ekstrakcijos išeigai [31].

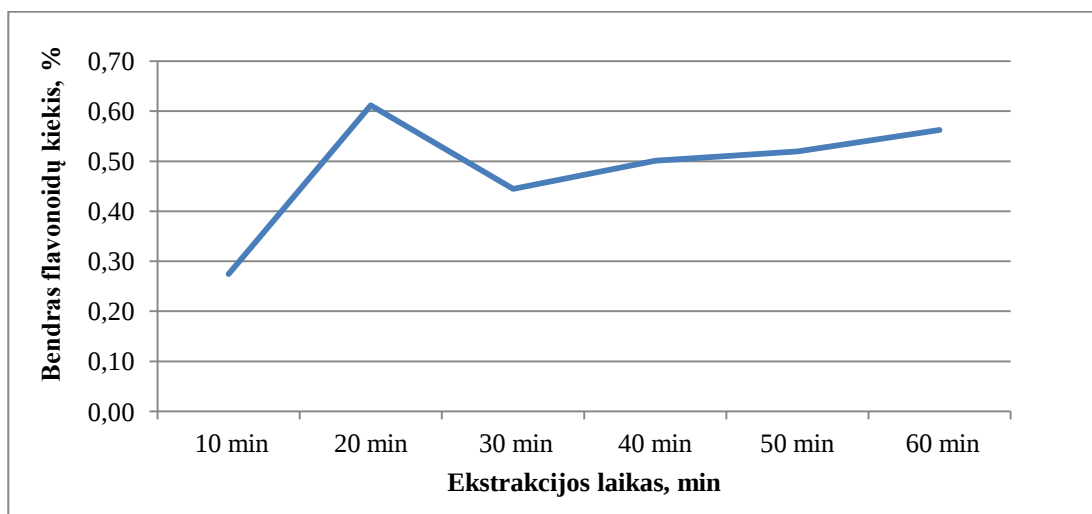
Ekstrakcijos tirpiklio koncentracijos parinkimas bendram flavonoidų kiekio nustatymui. Sąlygų parinkimui naudota iš Šakių miesto 2013-08-09 surinkta dėmėtųjų rūgčių žolė. Vaistinei augalinei žaliavai ekstrahuoti buvo naudotas įvairių koncentracijų (40, 50, 60, 70, 80, 90 ir 96 proc.) (V/V) etanolis. Ekstrakcijos laiko trukmė - 20 min. Flavonoidų kiekis apskaičiuotas pagal anksčiau aprašytą metodiką. Bandymas kartotas 3 kartus. Palyginus nustatytą flavonoidų kiekį, gauta, jog daugiausiai jų išekstrahuojama 80 proc. (V/V) etanoliu (4 pav.).



4 pav. Ekstrakcijos tirpiklio koncentracijos parinkimas tiriant flavonoidų kiekį

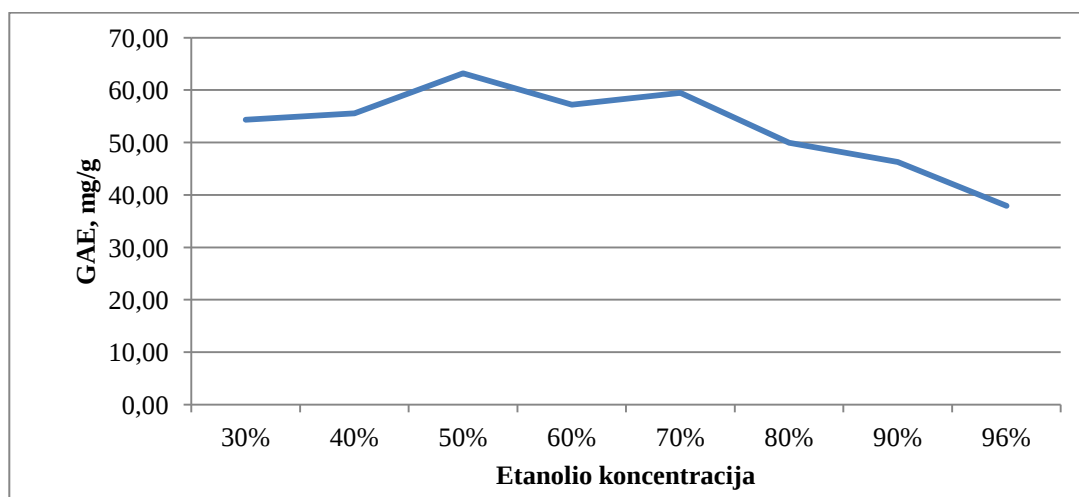
Ekstrakcijos laiko parinkimas tiriant suminį flavonoidų kiekį. Ultragarso vonelėje buvo tiriamas ekstrakcijos laikas norint sužinoti, kada išekstrahuojamas didžiausias suminis flavonoidų skaičius. Ekstrakcijos laiko trukmė - 60 min. Ekstraktų pavyzdžiai imti kas 10 min ir matuotas suminis

flavonoidų kiekis. Bandymas kartotas 3 kartus. Didžiausias flavonoidų kiekis nustatytas po 20 min. ekstrakcijos ultragarso vonelėje. (5 pav.).



5 pav. Ekstrakcijos laiko parinkimas, tiriant flavonoidų kiekį

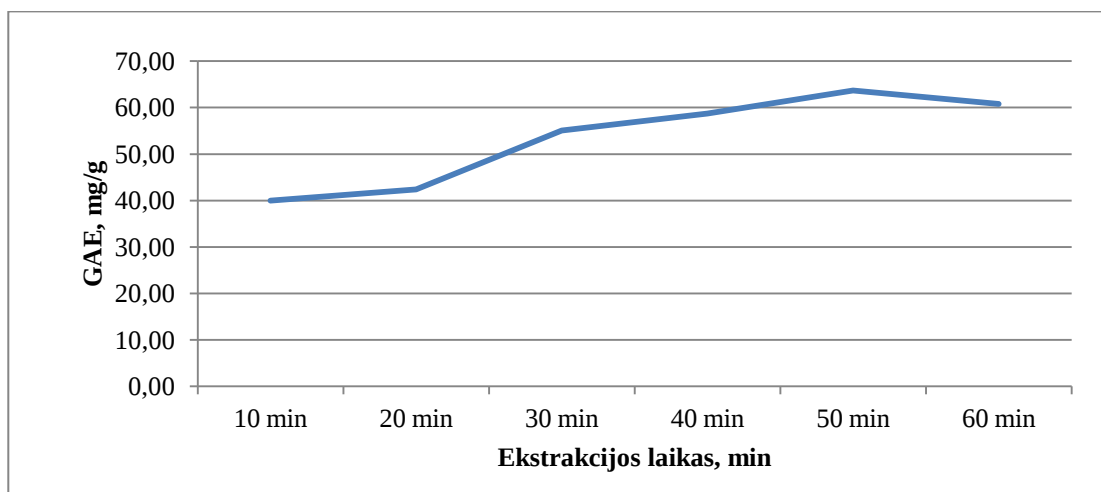
Ekstrakcijos tirpiklio koncentracijos parinkimas tiriant bendrą fenolinių junginių kiekį. Vaistinei augalinei žaliavai ekstrahuoti buvo naudojamas įvairių koncentracijų (40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ir 96%) etanolis. Ekstrakcijos laiko trukmė - 20 min. Fenolinių junginių kiekis tiriant ekstrakcijos sąlygas buvo nustatomas veikiant ekstraktus darbiniu Folin-Ciocalteu tirpalu ir natrio karbonatu, o gauti rezultatai apskaičiuojami remiantis galo rūgšties kalibracine kreive. Bandymas kartotas 3 kartus. Nustačius bendrą fenolių kiekį gauta, jog daugiausiai jų buvo išekstrahuota 50% etanoliu (6 pav.).



6 pav. Ekstrakcijos tirpiklio koncentracijos parinkimas tiriant fenolinių junginių kiekį

Ekstrakcijos laiko parinkimas tiriant suminį fenolinių junginių kiekį. Ultragarso bangų vonelėje buvo tiriamas ekstrakcijos laikas, norint sužinoti, kada išekstrahuojamas didžiausias fenolinių junginių kiekis pagal GAE miligramais viename grame vaistinės augalinės žaliavos. Ekstrakcija buvo

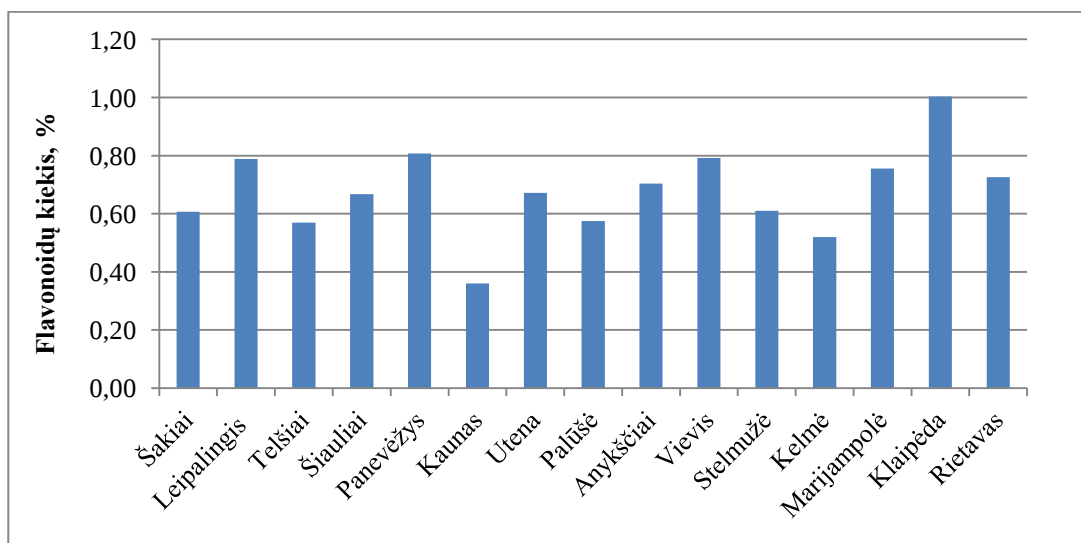
vykdytą vieną valandą, ėminiai imti kas 10 min. Bandymas kartotas 3 kartus. Gauta, jog didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis išekstrahuojamas po 50 min. (7pav.).



7 pav. Ekstrakcijos laiko parinkimas, tiriant fenolinių junginių kieki

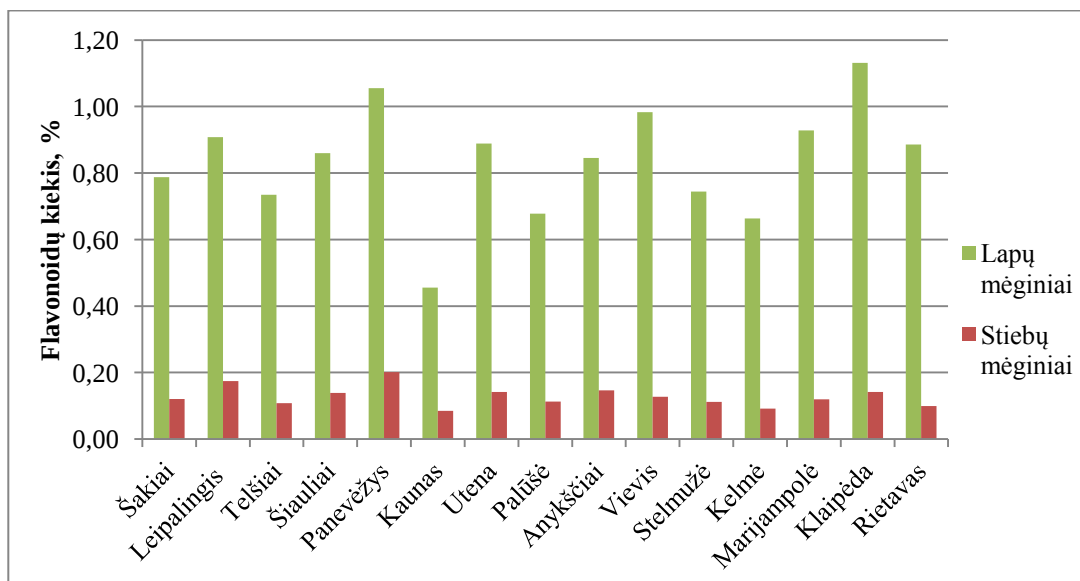
3.2 Flavonoidų kiekio įvairavimo tyrimas

Flavonoidų kiekio įvairavimas *Polygonum persicaria* L. žolės mėginiuose, surinktuose iš įvairių Lietuvos regionų. Didžiausias suminis flavonoidų kiekis lygus 1,00 proc. (SSN(%) = 2,67) buvo nustatytas Klaipėdos mieste, liepos pabaigoje, žydėjimo metu surinktoje žaliavoje. Taip pat gana didelis kiekis nustatytas Panevėžyje 0,81 proc. (SSN(%) = 3,86), Leipalingyje 0,79 proc. (SSN(%) = 2,59) ir Vievyje 0,79 proc. (SSN(%) = 3,57). Mažiausias nustatytas suminis flavonoidų kiekis buvo 0,36 proc. (SSN(%) = 3,16) Kaune. Taip pat mažas kiekis nustatytas Kelmėje 0,52 proc. (SSN(%) = 1,80), Telšiuose 0,57 proc. (SSN(%) = 4,45) ir Palūšėje 0,58 (SSN(%) = 4,98). Flavonoidų kiekis rastas dėmėtųjų rūgčių žolės mėginiuose visuose tirtuose Lietuvos regionuose pavaizduotas 8 pav.



8 pav. Flavonoidų kiekio įvairavimas dėmėtųjų rūgčių žolės mėginiuose iš įvairių Lietuvos regionų

Flavonoidų kiekio įvairavimas *Polygonum persicaria* L. lapų ir stiebų mėginiuose, surinktuose iš įvairių Lietuvos regionų. Didžiausias bendras flavonoidų kiekis lapų mėginiuose nustatytas Klaipėdoje rinktoje žaliavoje - 1,13 proc. (SSN(%) = 2,42) , stiebų mėginiuose – 0,20 proc. (SSN(%) = 5,11) Panevėžyje rinktoje žaliavoje. Mažiausias kiekis lapų ir stiebų mėginiuose buvo nustatytas Kaune rinktoje žaliavoje, atitinkamai 0,46 proc. (SSN(%) = 3,84) ir 0,08 proc. (SSN(%) = 2,78). Nustatytas flavonoidų kiekis dėmėtųjų rūgčių lapų ir stiebų mėginiuose visuose tirtuose Lietuvos regionuose pavaizduotas 9 pav.

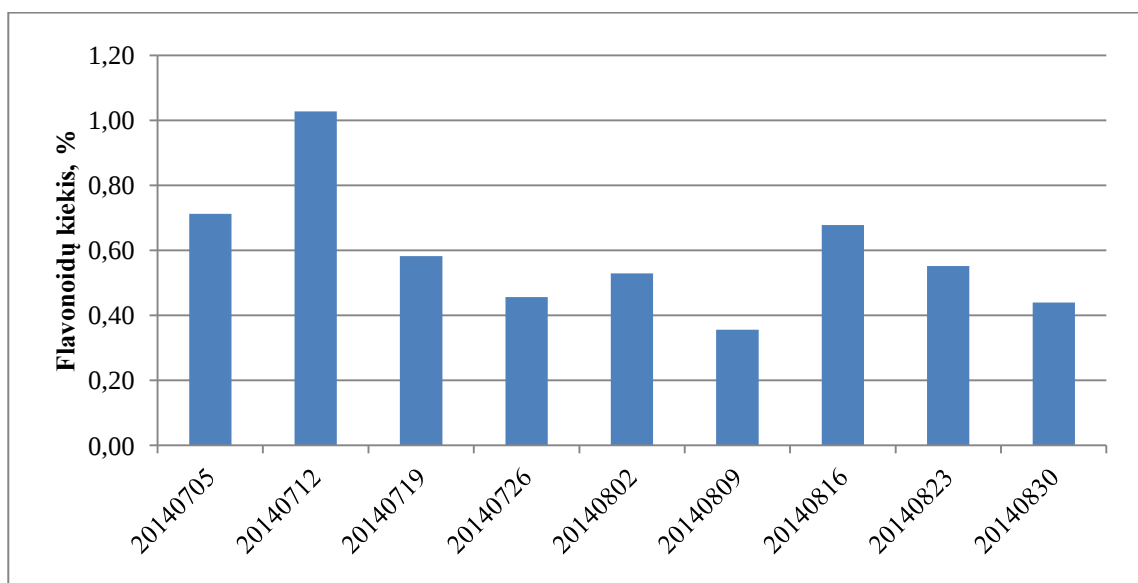


9 pav. Flavonoidų kiekio įvairavimas dėmėtųjų rūgčių lapų ir stiebų mėginiuose iš įvairiuose Lietuvos regionų

Vidutinis suminis flavonoidų kiekis iš įvairių Lietuvos regionų 2013 m. vasarą surinktuose *Polygonum persicaria* L. žolės mėginiuose buvo 0,68 proc., lapų mėginiuose – 0,84 proc., o stiebų mėginiuose – 0,13 proc. Nors dėmėtųjų rūgčių žaliava yra laikoma žolė, tačiau šio tyrimo metu nustatyta, jog joje yra 1,24 karto mažesnis flavonoidų kiekis, nei lapuose. Mažiausiu flavonoidų kiekiu pasižymi stiebai. Juose flavonoidų buvo 5,23 karto mažiau nei žolėje ir 6,46 karto mažiau nei lapuose. Xinyu J. ir kt. (2009) atlikto *Persicaria* L. genties augalo *Polygonum orientale* L. tyrimo metu taip pat nustatytas flavonoidų kiekio skirtumas tarp augalo dalių. Šio tyrimo metu taip pat gauta, jog augalo lapuose yra didesnis flavonoidų kiekis nei stiebuose, tačiau šis skirtumas buvo ženkliai mažesnis. Buvo nustatyta, jog *Polygonum orientale* L. stiebuose flavonoidų skaičius buvo 1,63 karto mažesnis nei lapuose [25].

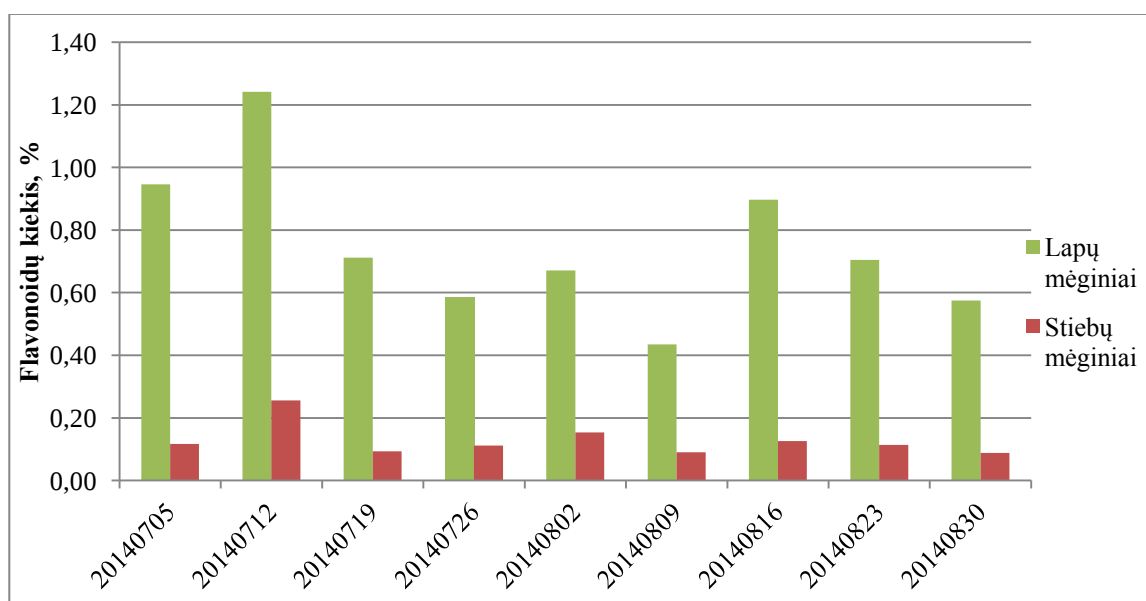
Flavonoidų kiekio įvairavimas vegetacijos laikotarpiu *Polygonum persicaria* L. žolės mėginiuose. Didžiausias flavonoidų skaičius buvo nustatytas 2014 m. liepos 12 d. Šakių mieste surinktoje žaliavoje - 1,03 proc. (SSN(%) = 4,7). Taip pat didelis kiekis nustatytas liepos 5 d. ir rugpjūčio 16 d. rinktoje žaliavoje, atitinkamai 0,71 proc. (SSN(%) = 4,22) ir 0,68 proc. (SSN(%) = 3,71). Mažiausias bendras flavonoidų skaičius - 0,36 proc. (SSN(%) = 3,67) buvo nustatytas rugpjūčio

9 d. Mažas kiekis nustatytas ir rugpjūčio 30 d. bei liepos 26 d. rinktoje žaliavoje, 0,44 proc. (SSN(%) = 5,05) ir 0,46 proc. (SSN(%) = 4,81). Rastas flavonoidų kiekio įvairavimas vegetacijos laikotarpiu dėmėtųjų rūgčių žolėje pavaizduotas 10 pav.



10 pav. Flavonoidų kiekio įvairavimas vegetacijos laikotarpiu dėmėtųjų rūgčių žolės mėginiuose

Flavonoidų kiekio įvairavimas vegetacijos laikotarpiu *Polygonum persicaria* L. lapų ir stiebų mėginiuose. Didžiausias flavonoidų skaičius lapuose yra 1,24 proc. (SSN(%) = 5,40) o stiebuose – 0,26 proc. (SSN(%) = 3,07) liepos mėnesio 12 d. rinktoje vaistinėje augalinėje žaliavoje. Mažiausias kiekis lapuose 0,43 proc. (SSN(%) = 4,29) rugpjūčio 9 d. rinktoje žaliavoje, o stiebuose – 0,09 proc. (SSN(%) = 5,65; 4,52; 4,27) liepos 19, rugpjūčio 9 ir 30 dienomis. Flavonoidų kiekis rastas dėmėtųjų rūgčių lapuose ir stiebuose vegetacijos laikotarpiu pavaizduotas 11 pav.

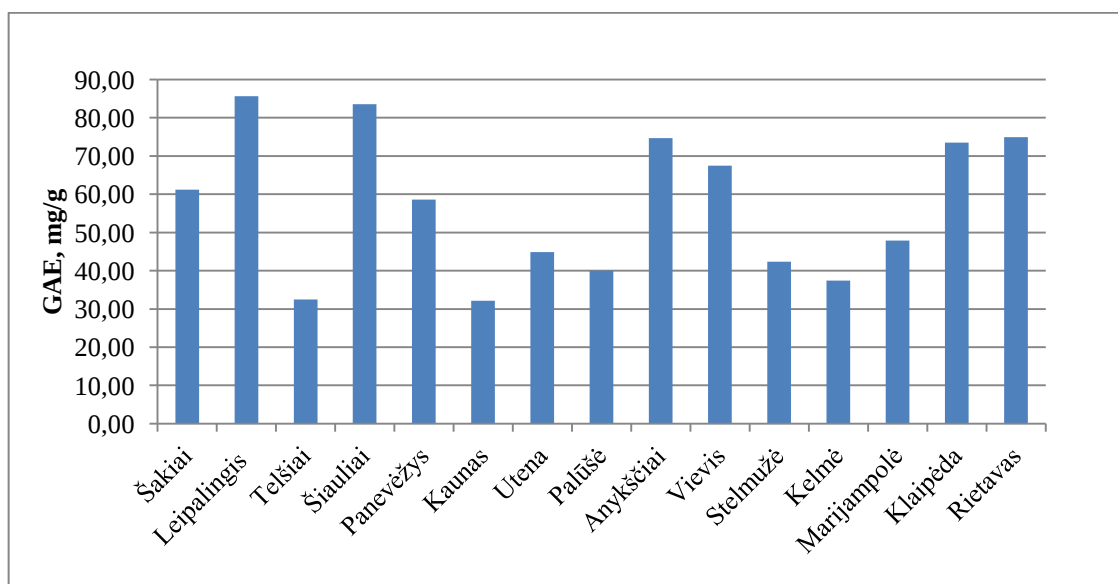


11 pav. Flavonoidų kiekio įvairavimas vegetacijos laikotarpiu dėmėtųjų rūgčių lapų ir stiebų mėginiuose

Vidutinis suminis flavonoidų kiekis 2014 m. liepos ir rugpjūčio mėnesiais surinktoje *Polygonum persicaria* L. žolėje buvo 0,59 proc., stiebuose – 0,13 proc., bei lapuose – 0,75 proc. Didžiausias flavonoidų kiekis nustatytas lapuose, kuris buvo 1,27 karto didesnis už žolėje ir 5,77 karto didesnis už stiebuose esančius kiekius. Visose trijose augalo dalyse nustatytas vidutinis suminis flavonoidų kiekis buvo didesnis liepos mėnesį, tai yra lapuose – 0,87 proc., stiebuose – 0,14 proc. ir žolėje – 0,69 proc. Rugpjūčio mėnesį atitinkamai 0,66 proc., 0,11 proc. ir 0,51 proc.

3.3 Fenolinių junginių kiekio įvairavimo nustatymas

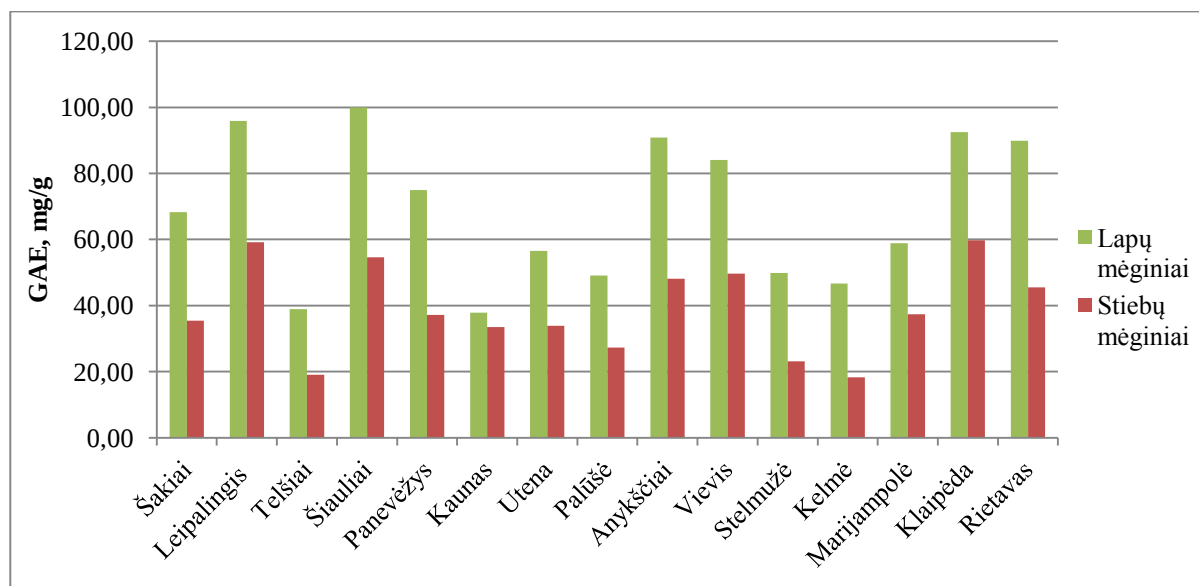
Fenolinių junginių kiekio įvairavimas dėmėtųjų rūgčių žolės mėginiuose, surinktuose iš įvairių Lietuvos regionų. Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas Leipalingyje ir Šiauliuose surinktoje augalinėje vaistinėje žaliavoje, tai yra 85,63 mg/g (SSN(%) = 2,54) ir 83,56 mg/g (SSN(%) = 1,42). Mažiausias kiekis buvo 32,12 mg/g (SSN(%) = 1,98) ir 32,48 mg/g (SSN(%) = 3,41) Kaune bei Telšiuose surinktoje žaliavoje. Fenolinių junginių kiekis augalo žolėje pavaizduotas 12 pav.



12 pav. Fenolinių junginių kiekio įvairavimas dėmėtųjų rūgčių žolės mėginiuose, surinktuose iš įvairių Lietuvos regionų

Fenolinių junginių kiekio įvairavimas dėmėtųjų rūgčių lapų ir stiebų mėginiuose, surinktuose įvairiuose Lietuvos regionuose. Didžiausias fenolinių junginių kiekis stiebuose nustatytas Klaipėdoje ir Leipalingyje rinktoje žaliavoje. Jis buvo lygus 59,71 mg/g (SSN(%) = 4,36) ir 59,14 mg/g (SSN(%) = 4,42). Mažiausias kiekis rastas Kelmėje ir Telšiuose rinktuose stiebuose, buvo 18,30 mg/g (SSN(%) = 2,51) ir 19,02 mg/g (SSN(%) = 4,56). Didžiausias fenolinių junginių kiekis lapuose nustatytas Šiauliuose ir Leipalingyje rinktoje žaliavoje, atitinkamai 99,98 mg/g (SSN(%) = 1,94) ir 95,86 mg/g (SSN(%) = 2,60). Mažiausias – Kaune ir Telšiuose rinktoje žaliavoje, atitinkamai

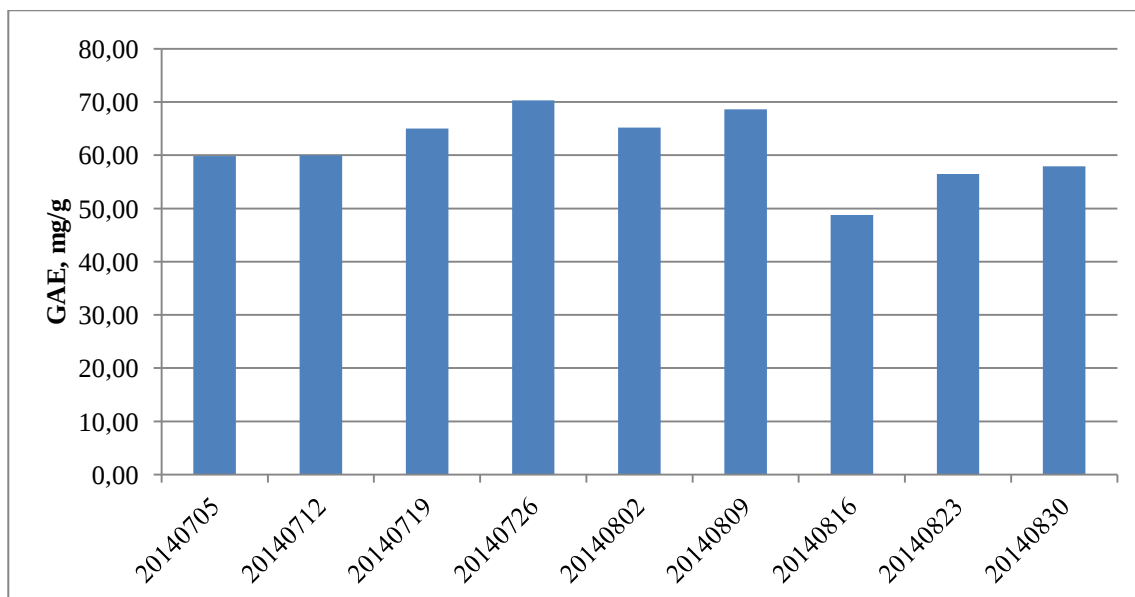
37,84 mg/g (SSN(%) = 3,24) ir 38,91 mg/g (SSN(%) = 5,05). Fenolinių junginių kiekis stiebuose ir lapuose pavaizduotas 13 pav.



13 pav. Fenolinių junginių kiekio įvairavimas dėmėtųjų rūgčių lapų ir stiebų mėginiuose, surinktuose įvairiuose Lietuvos regionuose

Vidutinis fenolinių junginių kiekis išreikštas GAE viename grame žaliavos įvairiuose Lietuvos regionuose rinktoje žolėje buvo 57,12 mg/g, lapuose – 68,94 mg/g ir stiebuose – 38,78 mg/g. Taigi didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas lapuose. Jis yra 20,69 proc. ir 77,77 proc. didesnis už žolėje ir stiebuose nustatytą kiekį. Kitų tyrimų metu taip pat buvo nustatyta, jog lapuose yra kaupiamas didžiausias fenolinių junginių skaičius. D. Meškauskaitė (2014) nustatė paprastosios sukatžolės (*Leonurus cardiaca* L.) fenolinių junginių kiekį augalo žolėje, lapuose ir stiebuose. Lapuose buvo nustatyta 71,69 RE mg/g, žolėje – 61,92 RE mg/g, o stiebuose – 20,42 RE mg/g [2]. M. S. Stankovic (2012) tyrė *Teucrium polium* L. augalo ir jo skirtingų dalių suminį fenolinių junginių kiekį. Šio tyrimo metu buvo nustatyta, jog naudojant metanolį arba etilo acetatą kaip ekstrahentus, daugiausiai fenolinių junginių yra lapų, o mažiausiai – stiebų ekstraktuose [53].

Fenolinių junginių kiekio įvairavimas vegetacijos laikotarpiu dėmėtųjų rūgčių žolės mėginiuose. Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas liepos 26 d. surinktoje žaliavoje – 70,34 mg/g (SSN(%) = 1,08). Mažiausiai jų nustatyta rugpjūčio 16 ir 23 dienomis, atitinkamai 48,80 mg/g (SSN(%) = 5,82) ir 56,46 mg/g (SSN(%) = 3,64) (14 pav.).



14 pav. Fenolinių junginių kiekio įvairavimas vegetacijos laikotarpiu dėmėtųjų rūgčių žolės mėginiuose

Fenolinių junginių kiekio įvairavimas vegetacijos laikotarpiu dėmėtųjų rūgčių lapų ir stiebų mėginiuose. Lapuose daugiausiai fenolinių junginių taip pat nustatyta liepos 26 d. rinktoje žaliavoje – 85,76 mg/g (SSN(%) = 0,21), o stiebuose rugpjūčio 2 d. – 38,50 mg/g (SSN(%) = 1,35). Mažiausias fenolinių junginių kiekis lapuose ir stiebuose nustatytas rugpjūčio 16 d. atitinkamai 62,94 mg/g (SSN(%) = 0,33) ir 24,26 mg/g (SSN(%) = 0,08) (15 pav.).



15 pav. Fenolinių junginių kiekio įvairavimas vegetacijos laikotarpiu dėmėtųjų rūgčių lapų ir stiebų mėginiuose

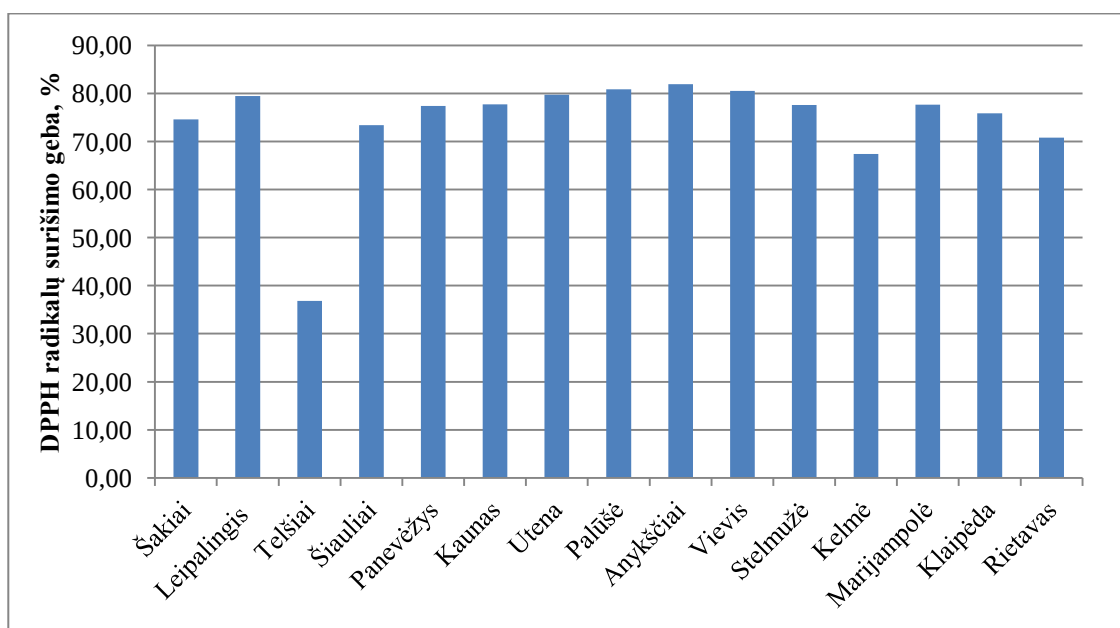
Vegetacijos laikotarpiu rinktoje augalo žolėje buvo nustatytas vidutinis fenolinių junginių kiekis - 61,36 mg/g, lapuose – 73,42 mg/g, o stiebuose – 30,87 mg/g. Lapuose nustatytas didžiausias vidutinis fenolinių junginių kiekis, kuris buvo 19,65 proc. didesnis nei žolėje ir 2,38 karto didesnis nei

stiebuose. Didesnis vidutinis fenolinių junginių kiekis lapuose ir žolėje nustatytas liepos mėnesį rinktoje žaliavoje, atitinkamai – 75,19 mg/g ir 63,80 mg/g. Liepą rinktuose lapuose šių junginių nustatyta 4,41 proc. daugiau nei rugpjūtį rinktoje žaliavoje, o žolėje 7,39 proc. daugiau. Stiebuose fenolinių junginių nustatyta daugiau (2,53 proc.) rugpjūčio mėnesį nei liepą.

3.4 Antioksidantinio aktyvumo nustatymas

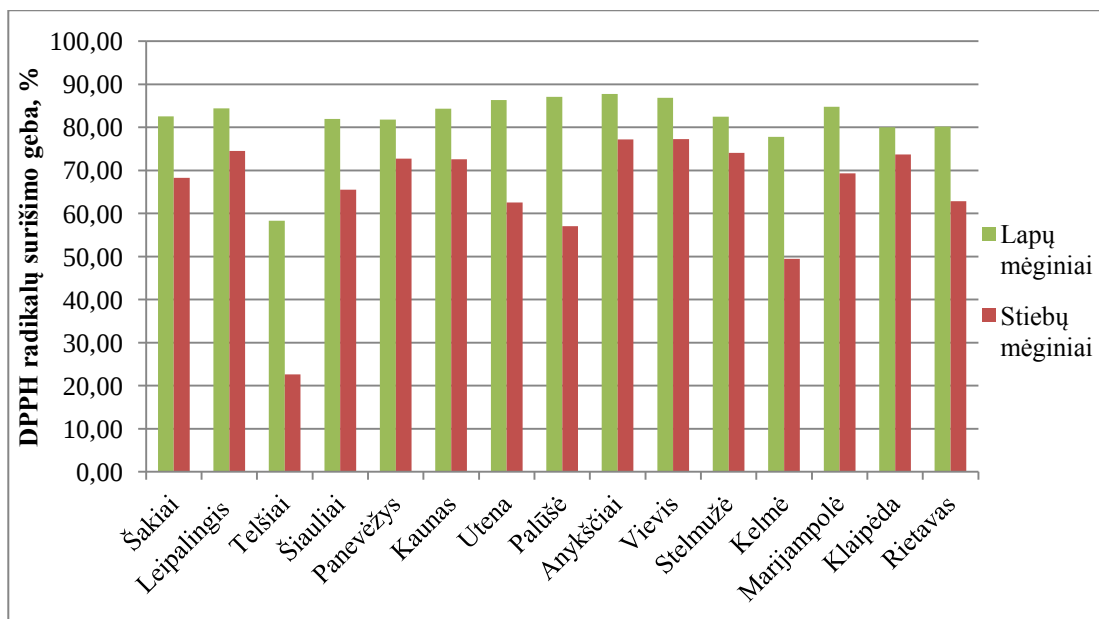
3.4.1 DPPH metodas

DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos nustatymas *Polygonum persicaria* L. žolėje, surinktoje įvairiuose Lietuvos regionuose. Didžiausias antioksidantinis aktyvumas nustatytas Anykščiuose, Palūšėje ir Vievėje rinktoje žaliavoje, atitinkamai 81,93 proc. (SSN(%) = 1,50), 80,84 proc. (SSN(%) = 2,07) ir 80,53 proc. (SSN(%) = 2,7). Mažiausias nustatytas antioksidantinis aktyvumas – 36,85 proc. (SSN(%) = 4,52) Telšiuose rinktoje vaistinėje augalinėje žaliavoje (16 pav.).



16 pav. DPPH laisvųjų radikalų surišimo geba *Polygonum persicaria* L. žolėje, surinktoje įvairiuose Lietuvos regionuose

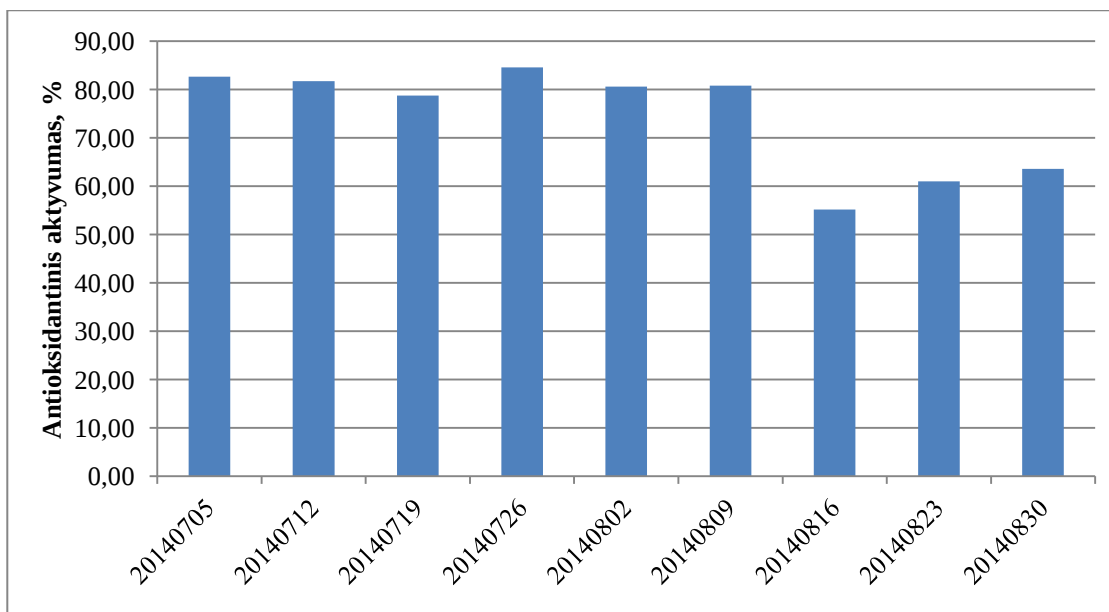
DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos nustatymas *Polygonum persicaria* L. lapuose ir stiebuose, surinktuose įvairiuose Lietuvos regionuose. Didžiausias antiradikalinis aktyvumas lapuose kaip ir žolėje nustatytas Anykščiuose, Palūšėje ir Vievėje, tai yra 87,74 proc. (SSN(%) = 0,77), 87,06 proc. (SSN(%) = 1,27), 86,85 proc. (SSN(%) = 1,59). Stiebuose didžiausias aktyvumas rastas Vievėje ir Anykščiuose surinktoje žaliavoje, atitinkamai 77,26 proc. (SSN(%) = 4,02), 77,22 proc. (SSN(%) = 3,47). Mažiausias antiradikalinis aktyvumas lapuose ir stiebuose nustatytas Telšiuose rinktoje žaliavoje atitinkamai 58,29 proc. (SSN(%) = 4,54) ir 22,61 proc. (SSN(%) = 4,95) (17 pav.).



17 pav. DPPH laisvųjų radikalų surišimo geba *Polygonum persicaria* L. lapuose ir stiebuose, surinktuose įvairiuose Lietuvos regionuose

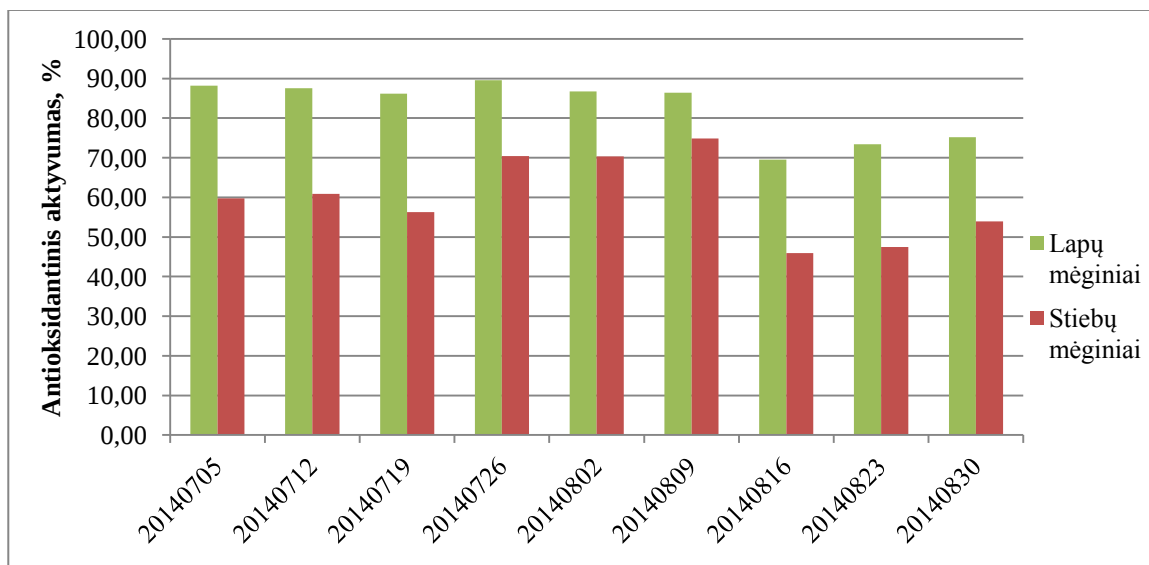
Vidutinė DPPH radikalų surišimo geba įvairiuose Lietuvos regionuose *Polygonum persicaria* L. žolėje buvo 74,11 proc., lapuose – 81,77 proc. ir stiebuose – 65,30 proc. Didžiausia radikalų surišimo geba buvo nustatyta lapuose. Ji buvo 1,25 karto didesnė nei stiebuose ir 1,10 karto didesnė nei žolėje. Tarp fenolinių junginių kiekio ir DPPH radikalų surišimo gebos gautas vidutinio stiprumo koreliacijos ryšys: Spirmeno koreliacijos koeficientas - 0,607. Šis ryšys yra statistiškai reikšmingas, nes p reikšmė yra mažesnė už 0,01. Tarp flavonoidų kiekio ir DPPH radikalų surišimo gebos gautas stiprus koreliacijos ryšys: Spirmeno koreliacijos koeficientas – 0,709. Gautas rezultatas yra statistiškai patikimas, nes p reikšmė taip pat mažesnė už 0,01. Gauta koreliacija yra šiek tiek silpnesnė, nei literatūros šaltiniuose gautuose rezultatuose. R. A. Mustafa (2010) nustatė stiprų koreliacijos ryšį tarp antioksidantinio aktyvumo ir flavonoidų kiekio (koreliacijos koeficientas 0,843) bei fenolinių junginių kiekio (koreliacijos koeficientas 0,8613) [41]. Gauti rezultatai galėjo skirtis dėl skirtingų tyrimo metodikų, bei skirtingo koreliacijos ryšio apskaičiavimo.

DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos nustatymas vegetacijos laikotarpiu *Polygonum persicaria* L. žolėje. Didžiausia DPPH radikalų surišimo geba nustatyta liepos 26 d. rinktoje žaliavoje - 84,59 proc. (SSN(%) = 2,03). Mažiausia – rugpjūčio 16 d. rinktoje žaliavoje – 55,16 proc. (SSN(%) = 1,90) (18 pav.).



18 pav. DPPH laisvųjų radikalų surišimo geba vegetacijos laikotarpiu *Polygonum persicaria L.* žolėje

DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos nustatymas vegetacijos laikotarpiu *Polygonum persicaria L.* lapuose ir stiebuose. Didžiausias antioksidantinis aktyvumas lapuose nustatytas liepos 26 d. – 89,54 proc. (SSN(%) = 1,34). Stiebuose – liepos 26 d. ir rugpjūčio 2 d. atitinkamai 70,41 proc. (SSN(%) = 2,69) ir 70,31 proc. (SSN(%) = 1,04). Mažiausias antiradikalinis aktyvumas lapuose bei stiebuose, kaip ir žolėje, nustatytas rugpjūčio 16 d. atitinkamai 69,57 proc. (SSN(%) = 1,06) ir 45,90 proc. (SSN(%) = 1,63) (19 pav.).



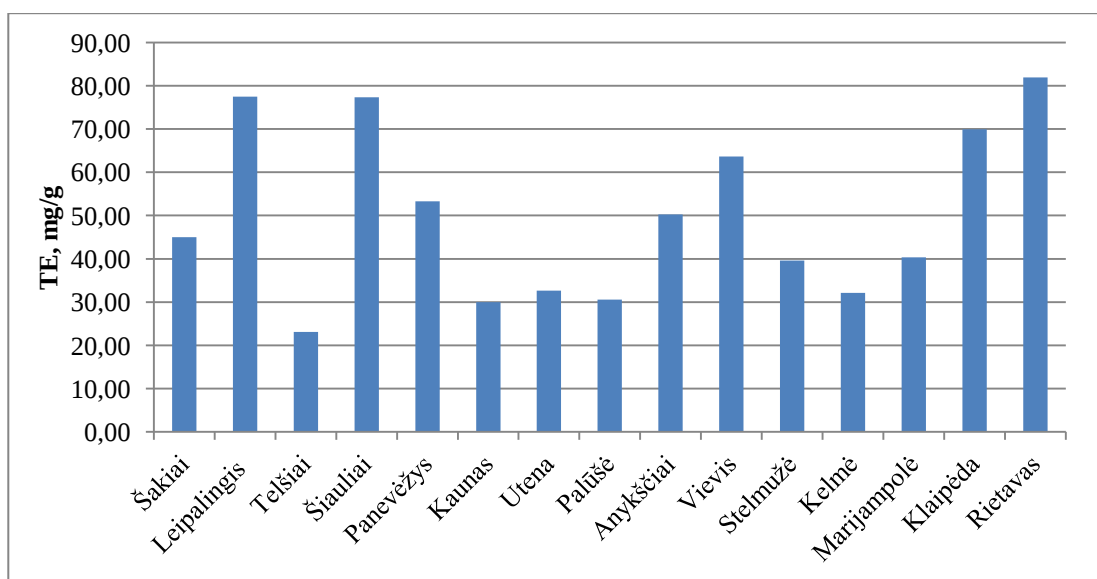
19 pav. DPPH laisvųjų radikalų surišimo geba vegetacijos laikotarpiu *Polygonum persicaria L.* lapuose ir stiebuose

Vegetacijos laikotarpiu surinktos dėmėtųjų rūgčių žolės mėginiuose vidutinė DPPH radikalų surišimo geba, buvo 74,33 proc., lapų – 82,54 proc., o stiebų - 59,98 proc. Palyginus nustatytą surišimo gebą stiebuose, lapuose ir žolėje liepos ir rugpjūčio mėnesiais, buvo gauta jog didesnis DPPH

radikalų kiekis buvo surištas liepos mėnesį rinktose žaliavose. Nustatytas stiprus koreliacijos ryšys tarp fenolinių junginių kiekio ir DPPH radikalų surišimo gebos. Spirmeno koreliacijos koeficientas – 0,879. Apskaičiuotas ryšio stiprumas yra reikšmingas, nes p reikšmė yra mažesnė už 0,01. Tarp flavonoidų kiekio ir DPPH radikalų surišimo gebos nustatyta vidutinio stiprumo koreliacija (koeficientas lygus 0,606), ($p < 0,01$). Šie rezultatai sutampa su literatūros šaltiniuose nurodytų tyrimų rezultatais. M. Maizura ir kt. (2011) tyrė 3 augalų ekstraktus ir jų mišinius. Vienas iš tiriamųjų augalų buvo *Polygonum minus* L. priklausantis tai pačiai genčiai, kaip ir *Polygonum persicaria* L. Šio tyrimo metu nustatyta stipri koreliacija tarp fenolinių junginių kiekio ir antioksidantinio aktyvumo (Pirsono koreliacijos koeficientas – 0,86) [37].

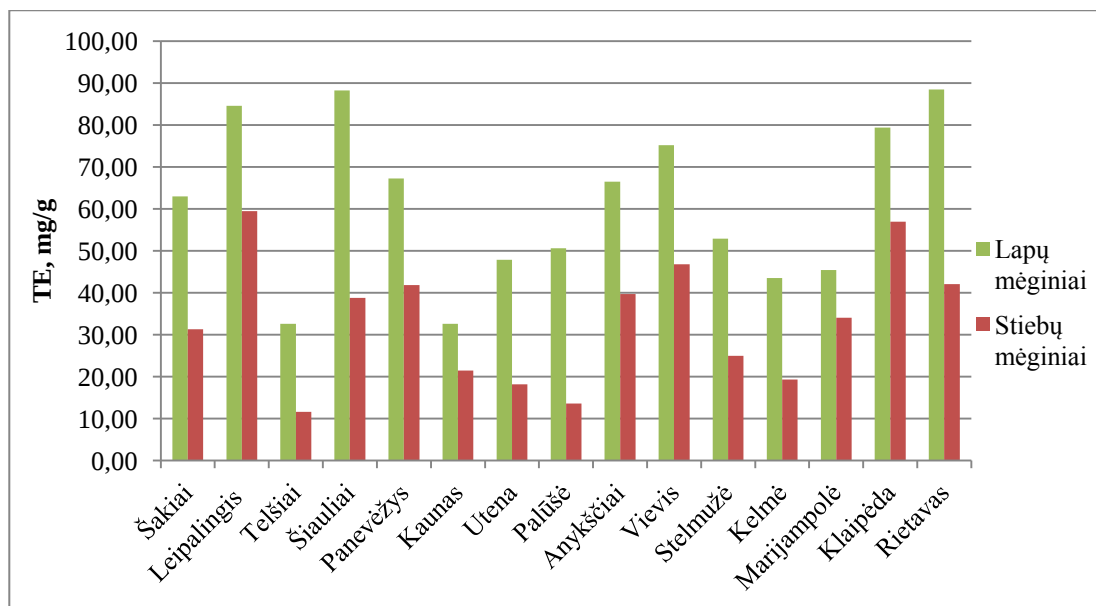
3.4.2 ABTS metodas

Antioksidantinis aktyvumas *Polygonum persicaria* L. žolėje, surinktoje įvairiuose Lietuvos regionuose. Didžiausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas Rietave rinktoje žaliavoje – 81,92 mg/g (SSN(%) = 1,09). Mažiausias aktyvumas - 23,07 mg/g (SSN(%) = 2,94) buvo nustatytas Telšiuose rinktoje žaliavoje (20 pav.).



20 pav. Antioksidantinis aktyvumas *Polygonum persicaria* L. žolėje, surinktoje įvairiuose Lietuvos regionuose

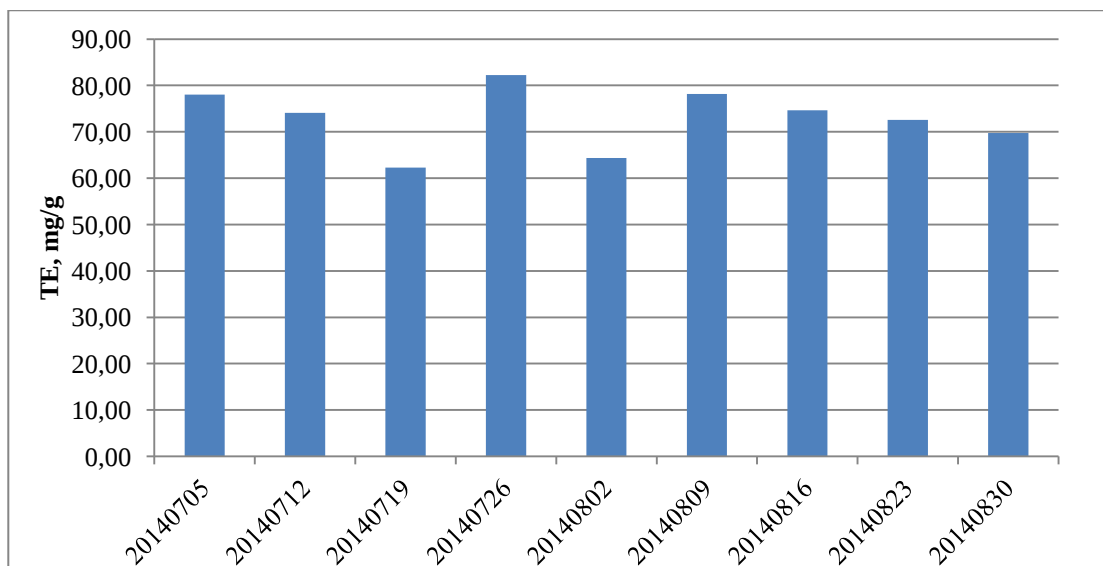
Antioksidantinis aktyvumas *Polygonum persicaria* L. lapuose ir stiebuose, surinktuose įvairiuose Lietuvos regionuose. Didžiausias antioksidantinis aktyvumas lapuose nustatytas Rietave ir Šiauliuose rinktoje žaliavoje, atitinkamai 88,48 mg/g (SSN(%) = 1,27) ir 88,21 mg/g (SSN(%) = 2,23). Stiebuose antioksidantinis aktyvumas buvo didžiausias Leipalingyje surinktoje žaliavoje – 59,45 mg/g (SSN(%) = 5,04). Mažiausias antiradikalinis aktyvumas lapuose ir stiebuose buvo nustatytas Telšiuose, atitinkamai 32,60 mg/g (SSN(%) = 2,67) ir 11,60 mg/g (SSN(%) = 2,56) (21 pav.).



21 pav. Antioksidantinis aktyvumas *Polygonum persicaria* L. lapuose ir stiebuose, surinktuose įvairiuose Lietuvos regionuose

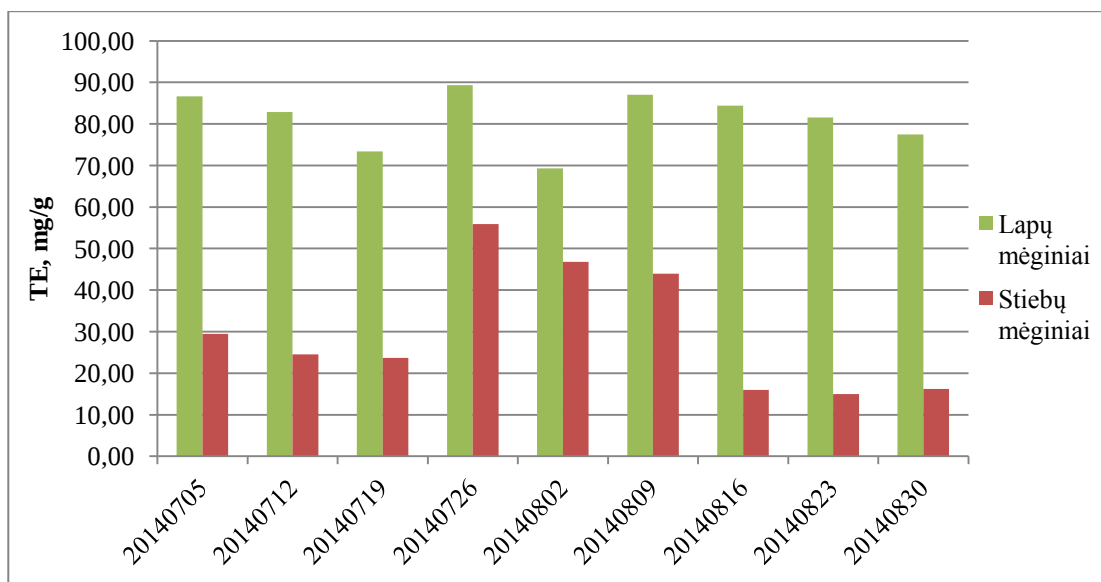
Vidutinis antiradikalinis aktyvumas, išreikštas trolokso ekvivalentais grame žaliavos ir nustatytas ABTS metodu, įvairiose Lietuvos augavietėse rinktoje *Polygonum persicaria* L. žolėje – 49,81 TE mg/g, lapuose – 61,20 mg/g ir stiebuose – 33,31 mg/g. Didžiausias antioksidantinis aktyvumas nustatytas lapų mėginiuose. Jis 22,87 proc. didesnis už žolės mėginiuose ir 83,73 proc. didesnis už stiebų mėginiuose nustatytus atiradikalinius aktyvumus. Nustatyta stipri koreliacija tarp flavonoidų kiekio ir antioksidantinio aktyvumo (Spirmeno koreliacijos koeficientas – 0,735). Ši koreliacija yra reikšminga, nes p yra mažesnis už 0,01. Tarp fenolinių junginių kiekio ir antiradikalinio aktyvumo nustatytas labai stiprus koreliacinis ryšys (koreliacijos koeficientas – 0,954). Šie duomenys yra statistiškai patikimi ($p < 0,01$). Gautus rezultatus patvirtina ir literatūros šaltiniuose nurodyti tyrimai. M.S. Bhoyar (2011) nustatė stiprią koreliaciją tarp antioksidantinio aktyvumo ir fenolinių junginių kiekio (koreliacijos koeficientas - 0,7418) bei flavonoidų kiekio (koreliacijos koeficientas - 0,703) [7].

Antioksidantinis aktyvumas vegetacijos laikotarpiu *Polygonum persicaria* L. žolėje. Didžiausias antioksidantinis aktyvumas žaliavoje buvo nustatytas liepos 26 d. – 82,24 mg/g (SSN(%) = 3,15). Mažiausias aktyvumas nustatytas liepos 19 d. – 62,27 mg/g (SSN(%) = 2,80) (22 pav.).



22 pav. Antioksidantinis aktyvumas vegetacijos laikotarpiu *Polygonum persicaria* L. žolėje

Antioksidantinis aktyvumas vegetacijos laikotarpiu *Polygonum persicaria* L. lapuose ir stiebuose. Didžiausias antiradikalinis aktyvumas lapuose ir stiebuose kaip ir žolėje nustatytas liepos 26 d. atitinkamai 89,32 mg/g (SSN(%) = 2,61) ir 55,86 mg/g (SSN(%) = 1,85). Mažiausias antioksidantinis aktyvumas lapuose nustatytas rugpjūčio 2 d. – 69,28 mg/g (SSN(%) = 3,30), o stiebuose rugpjūčio 23 d. – 14,99 mg/g (SSN(%) = 2,77) (23 pav.).



23 pav. Antioksidantinis aktyvumas vegetacijos laikotarpiu *Polygonum persicaria* L. lapuose ir stiebuose

Vidutinis antioksidantinis aktyvumas (nustatytas ABTS metodu) vegetacijos laikotarpiu rinktoje žolėje buvo 72,90 mg/g, lapuose – 81,33 mg/g ir stiebuose – 30,16 mg/g. Didžiausiu antiradikaliniu aktyvumu pasižymėjo lapų mėginiai. Didesnis vidutinis antioksidantinis aktyvumas nustatytas 2014 m. liepos mėnesį rinktoje vaistinėje augalinėje žaliavoje. Nustatytas stiprus

koreliacijos ryšys tarp antioksidantinio aktyvumo ir flavonoidų (koreliacijos koeficientas - 0,726) bei fenolinių junginių (koreliacijos koeficientas - 0,824). Gauti rezultatai yra statistiškai reikšmingi ($p < 0,01$).

Tiriant antioksidantinį aktyvumą ABTS ir DPPH metodais gauti skirtingi rezultatai. Tačiau literatūros šaltiniuose taip pat yra nurodoma, jog tyrimus atlikus šiais metodais, dažniausiai jų rezultatai skiriasi. E. Rodrigues ir kt. (2011) atlikto tyrimo metu nustatė skirtingas koreliacijas tarp suminio fenolinių junginių kiekio ir antioksidantinio aktyvumo tirtu ABTS metodu (koreliacijos koeficientas – 0,64) bei DPPH metodu (koreliacijos koeficientas – 0,77) [49].

4. IŠVADOS

1. Nustatytos optimalios ekstrakcijos sąlygos flavonoidų kiekio nustatymui dėmėtųjų rūgčių žolės mėginiuose: ekstrakcijos tirpiklis - 80 % (V/V) etanolis, ultragarso poveikio trukmė - 20 min. Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis mėginiuose nustatytas ekstrakcijos tirpikliu naudojant 50 % (V/V) etanolį ir vykdant ekstrakciją ultragarso aplinkoje 50 min.

2. Nustatyta, jog vidutinis flavonoidų kiekis skirtinguose Lietuvos regionuose 2013 m. vasarą surinktoje *Polygonum persicaria* L. žolėje įvairavo nuo 0,36 proc. iki 1,00 proc. Didžiausias šių junginių kiekis nustatytas Klaipėdos mieste rinktame mėginyje. Lapų mėginiuose flavonoidų nustatyta daugiau nei žolėje; stiebuose nustatytas mažiausias šių junginių kiekis. Įvertinus 2014 m. Šakių mieste vegetacijos laikotarpiu rinktus žolės mėginius, liepos mėnesį (12 d.) rinktos žaliavos mėginyje nustatytas didžiausias flavonoidų kiekis.

3. Spektrofotometrinio metodu nustatyta, kad vidutinis fenolinių junginių kiekis skirtinguose Lietuvos regionuose surinktuose dėmėtųjų rūgčių mėginiuose svyravo nuo 32,12 mg/g iki 85,63 mg/g. Didžiausias kiekis nustatytas Leipalingyje rinktame mėginyje. Nustatyta, kad daugiausiai fenolinių junginių sukaupė rūgčių lapai. Didžiausias fenolinių junginių skaičius vegetacijos laikotarpiu buvo nustatytas liepos 26 d. rinktoje žaliavoje. Vidutinis fenolinių junginių kiekis liepos mėnesį yra reikšmingai didesnis nei rugpjūčio mėnesį.

4. Didžiausiu radikalų surišimo gebos rodikliu (tiriant DPPH metodu) išsiskyrė Anykščių regiono žolės mėginys. Tuo tarpu didžiausiu antiradikalinio aktyvumu (apskaičiuotu ABTS metodu) pasižymėjo Rietave surinktos žaliavos mėginiai. Abejomis metodikomis (DPPH ir ABTS) nustatyta, jog lapai pasižymi didžiausia radikalų surišimo geba, o stiebai - mažiausia. Nustatyta, kad vidutinė radikalų surišimo geba yra didesnė liepos mėnesį surinktuose žaliavų mėginiuose. Nustatytas stiprus koreliacijos ryšys tarp radikalų surišimo gebos ir flavonoidų bei fenolinių junginių kiekio ($p < 0,01$).

5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Tolimesniuose tyrimuose būtų tikslinga nustatyti kitų veiksnių, tokių kaip ultragarso galios, ekstrakcijos temperatūros, naudojamų skirtingų tirpiklių įtaką flavonoidų bei fenolinių junginių kiekio nustatymui dėmėtųjų rūgčių mėginiuose.

Kadangi skirtinguose literatūros šaltiniuose yra nurodoma, kad dėmėtųjų rūgčių žolėje nustatyta skirtinga flavonoidų sudėtis, būtų tikslinga nustatyti Lietuvos regionuose augančių dėmėtųjų rūgčių flavonoidų sudėtį.

6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Liaudanskas M., Viškelis P., Janulis V. Polifenoliniai junginiai obuoliuose: cheminė sudėtis, struktūros ypatumai, biologinis poveikis (apžvalga). Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filialo sodininkystės ir daržininkystės instituto ir Aleksandro Stulginskio Universiteto mokslo darbai 2012; 31(1-2): 3-17.
2. Meškauskaitė D. Vaistinio augalo *Leonurus Cardiac* L. eterinių aliejų, fenolinių junginių ir antioksidacinio aktyvumo vertinimas. Magistro baigiamasis darbas, 2014.
3. Ragažinskienė O., Rimkienė S., Sasnauskas V. Vaistinių augalų enciklopedija 2005; p. 295-296.
4. Andersen O.M., Markham K.R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. 2006; p. 2-3.
5. Ayala, A., Muñoz, M., and Argüelles, S., "Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, Article ID 360438, 31 pages, 2014. doi:10.1155/2014/360438.
6. Balasundram N., Sundram K., Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006;99:191-203. doi:10.3989/gya.129708.
7. Bhoyas M.S., Mishra G.P., Naik P.K., Srivastava R.B. Estimation of Antioxidant Activity and Total Phenolics Among Natural Populations of Caper (*Capparis spinosa*) Leaves Collected from Cold Arid Desert of Trans-Himalayas. 2011; *AJCS*.5. p. 912-919.
8. Bohm, B.A. Introduction to Flavonoids. 1998. p.33.
9. Bomser J., Madhavi D.L., Singletary K., Smith M.A. In vitro anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Med.* 1996; 62:212-16.
10. Cabrera, M., Simoens, M., Falchi, G., Lavaggi, L., Piro, B., Castellano, E., Vidal, A., Azqueta, A., Monge, A., de Cera, A. L., Sagra, G., Seoane, G., Cerecetto, H., and Gonzalez, M., Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure–activity relationships *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (2007) p. 3356–3367.
11. Choudhary N., Bijjem K.R.V., Kalia A.N. "Antiepileptic potential of flavonoids fraction from the leaves of *Anisomeles malabarica*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 135, no. 2, 2011; p. 238–242.
12. Cooke, D., Schwarz, M., Boocock, D., Winterhalter, P., Steward, W.P., Gescher, A.J., Marczylo, T.H. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on

- adenoma development in the Apc^{Min} mouse model of intestinal carcinogenesis – relationship with tissue anthocyanin levels. *Int. J. Cancer* 119 (9), p. 2213–2220, 2006.
13. Cotterchio, M., Boucher, B.A., Manno, M., Gallinger, S., Okey, A., Harper, P., Dietary phytoestrogen intake is associated with reduced colorectal cancer risk. 2006; *J. Nutr.* 136, p. 3046 – 3053.
 14. Cushnie, T.P.T; Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2005; 26, 343-356.
 15. Derita M., Zacchino S. Validation of the ethnopharmacological use of *Polygonum persicaria* for its antifungal properties *Natural Product Communications*, 6 (2011), pp. 931–933.
 16. Diniz T.C., Silva J.C., de Lima-Saraiva S.R.G., et al., “The Role of Flavonoids on Oxidative Stress in Epilepsy,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2015, Article ID 171756, 9 pages, 2015. doi:10.1155/2015/171756.
 17. DiTomaso J.M., Kyser G.B., Oneto S.R., Wilson R.G., Orloff S.B., Anderson L.W., Wright S.D., Roncoroni J.A., Miller T.L., Prather T.S., Ransom C., Beck K.G., Duncan C., Wilson K.A. and Mann J.J. *Weed Control in Natural Areas of the Western United States*. Weed Research and Information Center, University of California, Davis, California; 2013.
 18. Durackova, Z., Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiol. Res.* 2010; 59: 459-469.
 19. Espín, J. C., García-Conesa, M. T., and Tomás-Barberán, F. A. “Nutraceuticals: facts and fiction,” *Phytochemistry*, vol. 68, 2007; p. 2986–3008.
 20. Felger R.S. *Flora of the Gran Desierto and R’o Colorado of Northwestern Mexico*. University of Arizona Press, 2000, p. 398.
 21. Herrera-Arellano, A., Miranda-Sanchez, J., Avila-Castro, P., Herrera-Alvarez, S., Jimenez-Ferrer, J.E., Zamilpa, A., Roman-Ramos, R., Ponce-Monter, H., Tortoriello, J., Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. *Planta Med.* 73 (1), p. 6–12, 2007.
 22. Hou D.X. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr Mol Med.* 2003.
 23. Hsiao, Y.C., Hsieh, Y.S., Kuo, W.H., Chiou, H.L., Yang, S.F., Chiang, W.L., Chu, S.C. The tumor-growth inhibitory activity of flavanone and 2’-OH flavanone in vitro and in vivo through induction of cell cycle arrest and suppression of cyclins and CDKs. *J. Biomed. Sci.* 14 (1), p. 107–119, 2007.
 24. Huang, W., Cai, Y., and Zhang, Y., *Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention, Nutrition and Cancer*, 2009; 62:1, 1-20, doi:10.1080/01635580903191585.

25. Jiang X., Chen X., Wei Y. Free Radical-Scavenging Activity and Flavonoid Contents of Polygonum Orientale Leaf, Stem, and Seed Extracts. Arch. Biol. Sci., Belgrade. 2009;61 (1), 79-83. doi:10.2298/ABS0901079J.
26. Kang S, Seeram N, Nair M, Bourquin L. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. Cancer Lett; 2003 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00583-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00583-9).
27. Kang, T.H., Hur, J.Y., Kim, H.B., Ryu, J.H., Kim, S.Y., Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O-beta-D-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia. Neurosci. Lett. 391 (3), 2006; p. 122–126.
28. Khaodhiar, L., Ricciotti, H., Li, L., Pan, W., Schickel, M., Zhou, J., and Blackburn, G., Daidzein-rich isoflavone aglycones are potentially effective in reducing hot flashes in menopausal women. Menopause. 2008; 15(1): 125–132.
29. Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Molecules. 2013, 18, 2328-2375. doi:10.3390/molecules18022328.
30. Koide T, Hashimoto Y, Kamei H, Kojima T, Hasegawa M, Terabe K. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. Cancer Biother Radiopharm. 1997; 12(4):277-280.
31. Kuo Ch.H., Chen B.Y., Liu Y.Ch., Chang Ch.M.J., Deng T.S., Chen J.H., Shieh Ch.J. Optimized Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Polygonum cuspidatum. Molecules. 2014, 19, 67-77. doi:10.3390/molecules19010067.
32. Kurkina, A. V.; Ryazanova, T. K.; Kurkin, V. A. Flavonoids from the Aerial Part of Polygonum persicaria Chemistry of Natural Compounds (Impact Factor: 0.5). 2013; 49(5) p. 845-847 doi: 10.1007/s10600-013-0761-3.
33. Lee, J., Lee, H.K., Kim, C.Y., Hong, Y.J., Choe, C.M., You, T.W., Seong, G.J., Purified high-dose anthocyanoside oligomer administration improves nocturnal vision and clinical symptoms in myopia subjects. Br. J.Nutr. 93 (6); 2005; p. 895–899
doi: <http://dx.doi.org/10.1079/BJN20051438>.
34. Liu R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. J Nutr 2004;134:3479S-3485S.
35. Liu, Z.M., Ho, S.C., Chen, Y.M., Ho, Y.P., The effects of isoflavones combined with soy protein on lipid profiles, C-reactive protein and cardiovascular risk among postmenopausal Chinese women. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2012 Sep;22(9):712-9. doi:10.1016/j.numecd.2010.11.002.
36. Mabberley D.J. Mabberley's Plant-Book third edition (2008). Cambridge University Press: UK; 2008.

37. Maizura M., Aminah A., Wan Aida W.M. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Kesum (*Polygonum minus*), Ginger (*Zingiber officinale*) and Turmeric (*Curcuma longa*) Extract. *International Food Research Journal*. 2011; 18: 529-534.
38. Manach C., Williamson G., Morand Ch., Scalbert A., Remesy Ch. Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. I. Review of 97 Bioavailability Studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. [Internet] 2005 [žiūrėta: 2015 balandžio 29] Internetinė prieiga: <http://ajcn.nutrition.org/content/81/1/230S.long>.
39. Matsumoto A., Nakamura Y., Hirayama M., Yoshiki Y., Okubo K. Antioxidant activity of black currant anthocyanin aglycons and their glycosides measured by chemiluminescence in a neutral pH region and in human plasma. *J Agric Food Chem.*, 2002.
40. Miwa, Y., Mitsuzumi, H., Sunayama, T., Yamada, M., Okada, K., Kubota, M., Chaen, H., Mishima, Y., Kibata, M. Glucosyl hesperidin lowers serum triglyceride level in hypertriglyceridemic subjects through the improvement of very low-density lipoprotein metabolic abnormality. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 51 (6), p 460–470, 2005.
41. Mustafa R.A., Abdul Hamid A., Mohamed S., Abu Bakar F. Total Phenolic Compounds, Flavonoids, and Radical Scavenging Activity of 21 Selected Tropical Plants. *Journal of Food Science*. 2009; 1:75. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01401.x.
42. Muth E.R, Laurent J, Jasper P. The effect of bilberry nutritional supplementation on night visual acuity and contrast sensitivity. *Altern Med Rev*. 2000; 5:164-73.
43. Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition* 2001; 74:418-25.
44. Pari, L., Gnanasoundari, M. Influence of naringenin on oxytetracycline mediated oxidative damage in rat liver. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98 (5), p. 456–461, 2006.
45. Qin, Y., Niu, K., Zeng, Y., Liu, P., Yi, L., Zhang, T., Zhang, Q.Y., Zhu, J.D., Mi, M.T., Isoflavones for hypercholesterolaemia in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Jun 6;6:CD009518. doi: 10.1002/14651858.CD009518.
46. Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., and Dhama, K., “Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay,” *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 761264, 19 pages, 2014. doi:10.1155/2014/761264.
47. Rajadurai, M., Stanely Mainzen Prince, P. Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: biochemical and histopathological evidences. *Toxicology* 228 (2–3), p. 259–268, 2006.

48. Ramalingam R., Nath A. R., Madhavi B. B., Nagulu M., Balasubramaniam A. "Free radical scavenging and antiepileptic activity of *Leucas lanata*," *Journal of Pharmacy Research*, vol. 6, no. 3, 2013; p. 368–372.
49. Rodrigues E., Poerner N., Rockenbach I.I., Gonzaga L.V., Mendes C.R., Fett R. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Blueberry Cultivars Grown in Brazil. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*. 2011; 31(4):911-917.
50. Ryan-Borchers, T.A., Park, J.S., Chew, B.P., McGuire, M.K., Fournier, L.R., Beerman, K.A., Soy isoflavones modulate immune function in healthy postmenopausal women. 2006; *Am. J. Clin. Nutr.* 83, p. 1118–1125. [PubMed: 16685055].
51. Simmonds N.W. *Polygonum persicaria* L. *Journal of Ecology* Vol. 33, No. 1 (Oct., 1945), pp. 121-131. doi:10.2307/2256568.
52. Smolarz H. D. Comparative study on the free flavonoid aglycones in herbs of different species of *Polygonum* L. *Acta Pol. Pharm.*, 59 (2), 2002. p. 145-148.
53. Stankovic M.S., Niciforovic N., Mihailovic V., Topuzovic M., Soujic S. Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and Flavonoid Concentrations of Different Plant Parts of *Teucrium polium* L. Subsp. *polium*. *Polish Botanical Society*. 2012;81(2): 117-122. doi:10.5586/asbp.2012.010.
54. Symonowicz M., Kolanek M. Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Food Science and Biotechnology* 2012; 76 (1) p. 35-41.
55. Trock, B.J., Hilakivi-Clarke, L., Clarke, R., Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. 2006; *J. Natl. Cancer Inst.* 98, p. 459–471. [PubMed: 16595782].
56. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 2009; 7(1), 65–74. doi:10.2174/157015909787602823.
57. Valcheva-Kuzmanova, S., Kuzmanov, K., Mihova, V., Krasnaliev, I., Borisova, P., Belcheva, A., Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Foods Human Nutr.* 62 (1), 2007; p.19–24.
58. Verheus, M., van Gils, C.H., Keinan-Boker, L., Grace, P.B., Bingham, S.A., Peeters, P.H.M., Plasma phytoestrogens and subsequent breast cancer risk. 2007; *J. Clin. Oncol.* 25, p. 648–655.
59. Vermerris W., Nicholson R.L. *Phenolic Compound Biochemistry* Springer Science & Business Media; 2007; p 3-21
60. Williamson-Hughes, P.S., Flickinger, B.D., Messina, M.J., Empie, M.W., Isoflavone supplements containing predominantly genistein reduce hot flash symptoms: a critical review of published studies. *Menopause*. 2006; 13:831–839. [PubMed: 16932241].

61. Xia, X., Ling, W., Ma, J., Xia, M., Hou, M., Wang, Q., Zhu, H., Tang, Z., An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.* 136 (8), 2003; p.744-751.