

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

**MEDICINOS FAKULTETAS**

**Biomedicinos mokslų institutas (Farmacijos ir farmakologijos centras)**

**MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS**

Fenolinių junginių ir taninų kiekių palyginimas Ericaceae ir Rosaceae augalų vandeniniuose ekstraktuose, gautuose naudojant skirtingus ekstrahavimo vandeniu būdus

Studentė: Evelina Petraitytė

V kursas, II grupė

Darbo vadovė:

dr. Kristina Ložienė

\_\_\_\_\_

parašas

Farmacijos ir farmakologijos centro vadovė:

doc. dr. Kristina Garuolienė

\_\_\_\_\_

parašas

Biomedicinos mokslų instituto direktorius:

prof. dr. Algirdas Edvardas Tamošiūnas

\_\_\_\_\_

parašas

Darbo įteikimo data: 2023 05 14

Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

Studento elektroninio pašto adresas:

[evelina.petraityte@mf.stud.vu.lt](mailto:evelina.petraityte@mf.stud.vu.lt)

2023

## TURINYS

SANTRAUKA.....	4
SUMMARY.....	6
SANTRUMPOS.....	8
ĮVADAS .....	9
TIKSLAS IR UŽDAVINIAI .....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1 Bruknė ( <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.).....	12
1.2. Mėlynė ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.).....	14
1.3. Miltinė meškauogė ( <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> L. Spreng.).....	15
1.4. Šilinis viržis ( <i>Calluna vulgaris</i> L.).....	16
1.5. Paprastoji rasakila ( <i>Alchemilla vulgaris</i> L.).....	18
1.6. Vaistinė dirvuolė ( <i>Agrimonia eupatoria</i> L.).....	20
1.7. Žašinė sidabražolė ( <i>Potentilla anserina</i> L.).....	21
1.8. Paprastoji žemuogė ( <i>Fragaria vesca</i> L.).....	22
1.9. Fenoliniai junginiai .....	24
1.10. Taninai.....	26
1.11. Ekstrahavimo metodai ir tirpikliai .....	27
1.11.1. Ekstrahavimas ultragarsu.....	28
1.11.2. Ekstrakcija mikrobangomis .....	29
1.11.3. Superkritinių skysčių ekstrakcija.....	29
1.11.4. Ekstrakcija suslėgtu skysčiu .....	29
2. TYRIMO METODIKA .....	31
2.1. Tyrimo objektas .....	31
2.2. Naudota aparatūra bei reagentai.....	31
2.3. Tyrimo metodas .....	32
2.3.1. Ekstraktų paruošimas.....	32

2.3.2. Drėgmės kiekio ir sausosios medžiagos kiekio nustatymas augalinėje žaliavoje terminio džiovavimo būdu .....	32
2.3.3. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas.....	33
2.3.4. Bendro taninų kiekio nustatymas .....	35
2.4. Statistinis duomenų įvertinimas .....	35
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	36
3.1. Drėgmės kiekis Ericaceae bei Rosaceae šeimų tirtų augalų orausėje žaliavoje .....	36
3.2. Bendro fenolinių junginių kiekio palyginimas Ericaceae bei Rosaceae šeimų tirtose rūšyse .....	37
3.2.1. Bendro fenolinių junginių kiekio palyginimas rūšyse, neatsižvelgiant į ekstrakcijos vandeniu metodą.....	37
3.2.2. Bendro fenolinių junginių kiekio palyginimas Ericaceae šeimos rūšyse, naudojant skirtingus ekstrakcijos vandeniu metodus .....	40
3.2.3. Bendro fenolinių junginių kiekio palyginimas Rosaceae šeimos rūšyse, naudojant skirtingus ekstrakcijos vandeniu metodus .....	43
3.3. Bendro taninų kiekio palyginimas Ericaceae bei Rosaceae šeimų tirtose rūšyse .....	44
3.3.1. Bendro taninų kiekio palyginimas rūšyse, neatsižvelgiant į ekstrakcijos vandeniu metodą .....	44
3.3.2. Bendro taninų kiekio palyginimas Ericaceae šeimos rūšyse, naudojant skirtingus ekstrakcijos vandeniu metodus.....	47
3.3.3. Bendro taninų kiekio palyginimas Rosaceae šeimos rūšyse, naudojant skirtingus ekstrakcijos vandeniu metodus.....	49
4. IŠVADOS .....	51
5. REKOMENDACIJOS .....	52
6. LITERATŪROS ŠALTINIAI .....	53

## SANTRAUKA

Evelinos Petraitytės baigiamasis magistro darbas: **Fenolinių junginių ir taninų kiekių palyginimas Ericaceae ir Rosaceae augalų vandeniniuose ekstraktuose, gautuose naudojant skirtingus ekstrahavimo vandeniu būdus.**

**Tyrimo tikslas:** nustatyti bei palyginti bendrą fenolinių junginių ir bendrą taninų kiekį Lietuvoje augančių kai kurių Ericaceae ir Rosaceae augalų lapų vandeniniuose ekstraktuose, naudojant skirtingus ekstrahavimo vandeniu būdus.

**Uždaviniai:** nustatyti bendrą fenolinių junginių kiekį mėlynės, bruknės, miltinės meškauogės, šilinio viržio, vaistinės dirvuolės, paprastosios žemuogės, žąsinės sidabražolės ir paprastosios rasakilos lapų vandeniniuose ekstraktuose, nepriklausomai nuo ekstrahavimo metodo; nustatyti bendrą taninų kiekį aukščiau minėtų Ericaceae ir Rosaceae augalų lapų vandeniniuose ekstraktuose, nepriklausomai nuo ekstrahavimo metodo; palyginti bendrą fenolinių junginių ir taninų kiekį skirtingais ekstrahavimo būdais gautuose aukščiau minėtų Ericaceae ir Rosaceae augalų lapų vandeniniuose ekstraktuose.

**Metodai:** terminio džiovavimo būdu buvo nustatomas drėgmės ir sausosios medžiagos kiekis augalinėje žaliavoje. Spektrofotometrinis metodas naudojant Folin-Ciocalteu reagentą buvo pasitelktas suminiam fenolinių junginių kiekiui nustatyti. Taninų kiekis buvo apskaičiuojamas iš bendro fenolių kiekio atėmus po taninų surišimo su PVPP likusį fenolinių junginių kiekį. Statistinė duomenų analizė atlikta naudojantis STATISTICA<sup>®</sup> 10 ir Microsoft Excel programomis.

**Rezultatai ir išvados:** iš visų tirtų rūšių didžiausiu bendru fenolinių junginių kiekiu, nepriklausomai nuo ekstrakcijos vandeniu metodo, išsiskyrė Ericaceae šeimos atstovė miltinė meškauogė. Mažiausi fenolinių junginių kiekiai šioje šeimoje nustatyti mėlynės lapuose bei šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje. Rosaceae šeimoje daugiausia fenolinių junginių nustatyta paprastosios rasakilos ir vaistinės dirvuolės, mažiausi – paprastosios žemuogės ir žąsinės sidabražolės lapuose. Didžiausias taninų kiekis, nepriklausomai nuo ekstrakcijos vandeniu metodo, nustatytas miltinėje meškauogėje, mažiausias – šiliniame viržyje. Ekstrakcija karštu vandeniu buvo efektyviausias būdas išskirti fenolinius junginius iš Ericaceae rūšių augalų; maceracija – mažiausiai efektyvus būdas, ypač miltinei meškauogei. Tiriant taninų kiekius Ericaceae rūšių augaluose, ekstrakcija ultragarsu buvo efektyviausia miltinei meškauogei ir bruknei, ekstrakcija virintu vandeniu – mėlynei, o maceracija – šiliniui viržiui. Nebuvo galima išskirti ekstrakcijos vandeniu metodo, kuris, ekstrahuojant fenolinius junginius, būtų efektyvus visoms tirtoms Rosaceae šeimos rūšims: ekstrakcija verdančiu vandeniu buvo efektyviausia

ekstrahuojant vaistinės dirvuolės ir paprastosios žemuogės lapus, ekstrakcija ultragarsu – žąsinės sidabražolės ir paprastosios rasakilos lapus. Maceracija buvo mažiausiai efektyvi visose šios šeimos rūšyse. Išskiriant taninus iš Rosaceae rūšių augalų labiausiai efektyvus buvo maceracijos kambario temperatūros vandeniū parą tamsoje metodas, išskyrus vaistinę dirvuolę, kuriai šis metodas buvo tinkamas mažiausiai.

## SUMMARY

Evelina Petraitytė Master's Thesis: **Comparison of amounts of phenolic compounds and tannins in aqueous extracts of Ericaceae and Rosaceae plants obtained using different water extraction methods.**

**The aim of the study:** to determine and compare the total phenolic compounds and total tannins in aqueous extracts of leaves of some Ericaceae and Rosaceae plants growing in Lithuania, using different water extraction methods.

**Objectives:** to determine the total phenolic compounds in aqueous extracts of blueberry, lingonberry, bearberry, heather, agrimony, wild strawberry, silverweed and lady's mantle leaves, regardless of the extraction method; to determine the total amount of tannins in aqueous extracts of leaves of the above Ericaceae and Rosaceae plants, irrespective of the extraction method; to compare the total amount of phenolic compounds and tannins in aqueous extracts of leaves of the above Ericaceae and Rosaceae plants obtained by the different extraction methods.

**Methods:** moisture and dry matter content were determined by thermal drying in the plant material. The spectrophotometric method using Folin-Ciocalteu reagent was used to determine the total phenolic compounds. The tannin content was calculated by subtracting the amount of phenolic compounds remaining after binding of tannins to PVPP from the total phenolic content. Statistical analysis of the data was performed using STATISTICA® 10 and Microsoft Excel.

**Results and conclusions:** of all the studied species, the Ericaceae species with the highest total phenolic content, regardless of the method of water extraction, was the common bearberry. The lowest levels of phenolic compounds in this family were found in the leaves of blueberry and in a mixture of leaves and flowers of heather. In the Rosaceae family, the highest amounts of phenolic compounds were found in the leaves of lady's mantle and agrimony, while the lowest amounts were found in the leaves of wild strawberry and silverweed. The highest tannin content, irrespective of the method of water extraction, was found in bearberry and the lowest in heather. Hot water extraction was the most efficient method for the extraction of phenolic compounds from Ericaceae species; maceration was the least efficient method, especially for bearberry. When the tannin contents of Ericaceae species were investigated, ultrasonic extraction was the most efficient for bearberry and lingonberry, boiling water extraction for blueberry and maceration for heather. It was not possible to identify a water extraction method that was effective in extracting phenolic compounds for all the Rosaceae species studied: boiling water extraction was the most effective method for extracting the leaves of the agrimony and the wild strawberry, while ultrasonic

extraction was the most effective method for extracting the leaves of the silverweed and the lady's mantle. Maceration was the least effective in all species of this family. Maceration with water at room temperature overnight in the dark was the most effective method for extracting tannins from Rosaceae species, except for the agrimony, for which it was the least suitable.

## SANTRUMPOS

**GRE** – galo rūgštis ekvivalentas

**CChE** – cianidino chlorido ekvivalentas

**RUE** – rutino ekvivalentai

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – natrio karbonatas

**CO<sub>2</sub>** – anglies dioksidas

**PVPP** – polivinilpirolidonas

**TA** – tanino rūgštis

**TRE** – tanino rūgštis ekvivalentas



## ĮVADAS

Augalams augant ir bręstant, juose galima rasti tam tikrų medžiagų, kurios atlieka svarbų vaidmenį panaudojant augalą įvairiose kasdieninėse bei medicininėse srityse (1). Fenoliniai junginiai – tai antriniai augalų metabolitai. Fenoliniais junginiais ypatingai domimasi dėl jų antioksidacinių savybių (2), taip pat jų vaidmens apsaugant žmones nuo širdies ir kraujagyslių sistemos sutrikimų, diabeto, senėjimo, vėžinių susirgimų ir neurodegeneracinių ligų (3,4). Taninai sudaro gausią fenolinių junginių grupę. Jie susiję su augalų gynybiniais mechanizmais nuo žolėdžių žinduolių, paukščių ar vabzdžių. Šie cheminiai junginiai taip pat pasižymi priešuždegiminiu bei antioksidaciniu, neuroprotekciniu ir antipatogeniniu poveikiu (5).

Daug fenolinius junginius ir taninus kaupiančių augalų rūšių priklauso erikinių (Ericaceae) ir erškėtinių (Rosaceae) šeimoms. Kai kurios Ericaceae bei Rosaceae šeimos rūšys, dėl jose susikaupiančių nemažų kiekių fenolinių junginių bei taninų, ne tik buvo naudojamos liaudies medicinoje, bet ir dabar atlieka svarbų vaidmenį šiuolaikinėje medicinoje (3,6). Pavyzdžiui, į Europos Farmakopėją įtraukti erikinių šeimai priklausančios mėlynės vaisiai (*Myrtilli fructus*), miltinės meškauogės lapai (*Uvae ursi folium*) bei erškėtinių šeimos atstovių miškinės sidabražolės šakniastiebiai (*Tormentillae rhizoma*), vaistinės dirvuolės ir paprastosios rasakilos antžeminės dalys (atitinkamai *Agrimoniae herba* ir *Alchemillae herba*) (7). Visos šios minėtos augalų rūšys (išskyrus miltinę meškauogę) Lietuvoje yra dažnos ir paplitusios visoje šalies teritorijoje. Taip pat Lietuvos savaiminėje floroje auga nemažai ir kitų šioms šeimoms priklausančių augalų rūšių, kurios nors ir neįtrauktos į Europos Farmakopėją, tačiau naudojamos liaudies medicinoje (8). Todėl šių rūšių natūralūs resursai galėtų būti potencialūs fenolinių junginių ir taninų šaltiniai.

Fenolinių junginių ir taninų ekstrakcijai galima naudoti įvairius tirpiklius ir ekstrakcijos būdus. Tačiau dėl skirtingų rūšių augaluose susikaupiančių fenolinių junginių ir taninų įvairovės plataus spektro, nėra vieno tirpiklio ir/ar standartizuoto ekstrakcijos būdo vienodai tinkamo visoms šiuos biologiškai aktyvius junginius turinčioms augalinėms žaliavoms (9). Vanduo, lyginant su organiniais tirpikliais, yra pigiausias ir ekologiniu požiūriu saugiausias tirpiklis (10). Įvairūs ekstrakcijos metodai, pavyzdžiui, maceracija, ekstrakcija ultragarsu, karščiu, mikrobangomis ar aukštu slėgiu, priklausomai nuo žaliavos ir/ar naudojamo tirpiklio gali skirtis fenolinių junginių ir taninų išeigos iš augalinės žaliavos kiekiu, selektyvumu, trukme (11). Todėl nuo ekstrahavimo būdo gali priklausyti tiek kiekybinė, tiek ir kokybinė išekstrahuotų fenolinių

funginių ir taninų sudėtis (9). Tad norint iš augalinės žaliavos vandeniu išgauti kuo didesnę fenolinių junginių ir taninų kiekį, reikia parinkti tinkamą ekstrahavimo vandeniu būdą.

## TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

**Darbo tikslas:** nustatyti bei palyginti bendrą fenolinių junginių ir bendrą taninų kiekį Lietuvoje augančių kai kurių Ericaceae ir Rosaceae augalų lapų vandeniniuose ekstraktuose, naudojant skirtingus ekstrahavimo vandeniu būdus.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Nustatyti bendrą fenolinių junginių kiekį mėlynės, bruknės, miltinės meškauogės, šilinio viržio, vaistinės dirvuolės, paprastosios žemuogės, žąsinės sidabražolės ir paprastosios rasakilos lapų vandeniniuose ekstraktuose, nepriklausomai nuo ekstrahavimo metodo.
2. Nustatyti bendrą taninų kiekį aukščiau minėtų Ericaceae ir Rosaceae augalų lapų vandeniniuose ekstraktuose, nepriklausomai nuo ekstrahavimo metodo.
3. Palyginti bendrą fenolinių junginių ir taninų kiekį skirtingais ekstrahavimo būdais gautuose aukščiau minėtų Ericaceae augalų lapų vandeniniuose ekstraktuose.
4. Palyginti bendrą fenolinių junginių ir taninų kiekį skirtingais ekstrahavimo būdais gautuose aukščiau minėtų Rosaceae augalų lapų vandeniniuose ekstraktuose.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1 Bruknė (*Vaccinium vitis-idaea* L.)

Bruknė (1 pav.) priklauso magnolijainių klasei (Magnoliopsida), erikinių (Ericaceae) šeimai. Tai daugiametis, visšalis krūmokšnis, pasižymintis 5 – 15 cm aukščiu, su požeminiais, šliaužiančiais, žvynuotais, išsakinijančiais ūgliais. Lapai dažniausiai atvirksčiai kiaušiniški, viršūnėje įlenktai apskriti, visžaliai, odiški, lygiakraščiai arba kiek karbuoti, raitytu pakraščiu, viršutinė pusė tamsiai žalia, blizganti, apatinė – blyškiai žalia, nusėta rudomis liaukutėmis, kurios išskiria raugines medžiagas. Žiedai truputį kvapnūs, tankiose, kabančiose kekėse, balti, rausvo atspalvio. Taurelė keturskiautė, rečiau penkiaskiautė, plėniška, jos skiautės trikampiškos, blakstienotos. Vainikėlis atviras ir persisvėręs, varpiškas, išorėn lenktomis skiautėmis. Vaisius – tai uogos, kurios iš pradžių pasižymi balta spalva, vėliau pereinanti į ryškiai raudoną, blizgančios, apvalios, nelabai sultingos, daugiasėklės, viršuje su taurelės liekana (8).



1 pav. Bruknė (*Vaccinium vitis-idaea* L.)

Bruknės dažniausiai žydi gegužės–birželio mėn., kartais pakartotinai ir liepos mėnesį. Galima aptikti Vidurio Europos, Rusijos bei Kanados miškuose (12). Geriausiai auga sausuose pušynuose, bet pasitaiko ir pušynuose su eglės pomiškiu, mišriuose spygliuočių miškuose, ypač su beržais, taip pat aukštapelkių ir tarpinio tipo pelkių sausesniuose pakraščiuose (8).

Bruknių lapai ir vaisiai yra svarbi žaliava maisto, sveikatos priežiūros pramonėje bei puikiai žinoma farmakognozijos srityje (13,14). Bruknių vaisiai yra turtingas maistinių mikroelementų ir bioaktyvių junginių, įskaitant vitaminus, polifenolius ir mineralus, šaltinis. Bruknėse rasta polifenolių, tokių kaip flavonoidai, polifenolinės rūgštys, antocianinai, procianidinai, organinės rūgštys, vitaminai (A, B1, B2, B3 ir C), kalis, kalcis, magnis bei fosforas (15,16). Nors medžiagų apykaitos procesus, lemiančius bioaktyvių sudedamųjų dalių kaupimąsi, iš esmės kontroliuoja genetinė sandara, aplinkos sąlygos (klimatas, dirvožemis ir kt.), augalų

geografinė kilmė ir derliaus nuėmimo laikas yra veiksniai, darantys įtaką bioaktyvių junginių kiekiui skirtinguose vaistinių augalų organuose (17).

Bendras fenolinių junginių kiekis Aliaskoje augančiose laukinėse bruknėse buvo 624,4 mg/100 g (18), tuo tarpu vidurio Lenkijos miškuose augusių bruknių bendras fenolinių junginių kiekis etanolio-vandens ekstrakte buvo 582 – 760 mg/100 g, o vandens ekstrakte – 436 – 636 mg/100 g (12). Fenolinių junginių tirpumas yra didesnis alkoholiuose, todėl galima daryti išvadą, kodėl buvo gauti didesni rezultatai tiriant etanolio-vandens ekstraktą. Bendras flavonoidų kiekis laukinėse bruknėse iš Lenkijos varijavo nuo 522 – 647  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  etanolio-vandens ekstrakto ir 255 – 353  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  vandens ekstrakto (19). Antocianino glikozidai yra pigmentai, kurie yra atsakingi už mėlyną ir raudoną uogų spalvas. Tai labiausiai paplitę fenoliniai junginiai bruknėse. Tiriant antocianinų kiekį laukinėse bruknėse Aliaskoje, buvo nustatyta, jog dominuojantys antocianinai buvo cianidino glikozidai (18). Didesnis santykinis cianidino glikozidų kiekis bruknių uogose buvo susijęs su geografiniais ir aplinkos veiksniais šiauriausiose Suomijos platumose (20). Cianidin-3-galaktozidas sudaro maždaug 82,5% visų laukinių bruknių antocianinų junginių, o cianidin-3-arabinozidas ir cianidin-3-gliukozidas yra aptinkamas mažesniais kiekiais (12).

Analizuojant mokslinius šaltinius, galima pastebėti, jog bruknės pasižymi sveikata stiprinančiomis savybėmis. Bruknės bei kitų Ericaceae šeimos rūšių uogos daro teigiamą poveikį sveikatai daugiausia dėl didelio antioksidacinio aktyvumo. Vandeningas liofilizuotų bruknių vaisių ekstraktas turėjo apsauginį poveikį nuo oksidacinio streso. Tik reguliarus uogų vartojimas ištiesus metus gali užkirsti kelią ar sumažinti širdies ir kraujagyslių bei degeneracines ligas. Tyrimai patvirtino, kad tiek švieži, tiek džiovinti vaisiai pasižymi dideliu antioksidaciniu poveikiu. Mėnesiais, kai nėra šviežių uogų ir vaisių, džiovintos bruknės gali būti geras koncentruotų antioksidantų šaltinis (12). Dróždź ir kt. (2017 m.) nustatė, kad šviežių bruknių vandeniniuose ekstraktuose bendras fenolinių junginių kiekis sudaro 4,36 mg GE/g žaliavos, o džiovintų – 23,6 GE/g sausos masės (19). Nors yra mažai įrodymų apie bruknių priešvėžinį poveikį, tačiau buvo įrodyta, kad bruknių ekstraktai slopina vėžinių ląstelių dauginimąsi ir naviko progresavimą pelių modelių sistemose (22). Randama nemažai mokslinių įrodymų, kad dieta, kurioje gausu uogų, turi teigiamą poveikį smegenims ir užkerta kelią su amžiumi susijusiai neurodegeneracijai. Kad toks poveikis būtų pasiektas, uogos ar aktyvūs uogų junginiai turi prasiskverbti per kraujo-smegenų barjerą (23).

## 1.2. Mėlynė (*Vaccinium myrtillus* L.)

Mėlynė (2 pav.) tai labai išsišakojęs, erikinių (*Ericaceae*) šeimos puskrūmokšnis su požeminiu, toli šliaužiančiu šakniastiebiu, augantis iki 15 – 40, rečiau 50 cm aukščio. Lapai vasaržaliai, apvaliai kiaušiniški, nusmailėjusia viršūne, trumpakočiai, pliki, smulkiai pjūkliški. Žiedai pavieniai, kabantys ant trumpo žiedkočio. Taurelė suaugusi su mezgine, neryškiai penkiaskiautė, rečiau keturskiautė. Vainikėlis su penkiomis, trumpomis, bukomis skiautelėmis. Vaisius – rutuliška, sultinga, daugiasėklė uoga, dažniausiai su apnašu, jos viršūnėje yra taurelės pėdsakai. Sėklos smulkios, rudos, šiek tiek pusmėnuliškos. Šios rūšies augalai žydi gegužės – birželio mėnesiais (8).



2 pav. Mėlynė (*Vaccinium myrtillus* L.)

Nors šiuo metu *Vaccinium* L. gentis apima daugiau nei 170 rūšių (24), svarbu paminėti, jog *V. myrtillus* yra kilusi iš Šiaurės Europos bei Šiaurės Amerikos, bet taip pat aptinkama ir Azijoje (25). Mėlynė formuoja sąžalynus, auga ne per daug ūksmėtuose, drėgnų, puveningų, bet rūgščių dirvožemių miškuose. Jų neįmanoma auginti kultūroje dėl labai specifinių dirvožemio poreikių (8).

Mėlynės vaisiai yra svarbi vietinės mitybos dalis daugelyje šalių ir naudojami kaip vaistažolė įvairiems sutrikimams gydyti. Jie vertinami dėl malonaus skonio, tačiau tuo pačiu reikalauja daug fizinių pastangų renkant augavietėse. Ši priežastis lemia gana didelę mėlynių uogų rinkos vertę (26). Moksliniuose šaltiniuose teigiama, jog mėlynėse yra cukrų, vitaminų, pektino ir fenolių. Fenoliniai junginiai yra antocianinai (didžiausia frakcija), terpenoidai (triterpenoidai, tetraterpenai ir iridoidai), flavonoliai (kvercetas ir miricetas), taninai ir flavanoliai (katechinas ir epikatechinas), kumarinai, fenolio rūgštys bei resveratrolis. Šiaurinėse platumose augančių mėlynių vaisiuose fenolių kiekiai yra didesni nei augančių pietinėse platumose (25). Svarbu atkreipti dėmesį, jog *V. myrtillus* uogos pasižymi intensyvia spalva, kurią suteikia tiek žievelėse, tiek minkštame randamas didelis antocianidinių (iki 2 % šviežios masės žievelėse) kiekis. 90 % visų vaisiaus fenolinių junginių sudaro antocianinai. Mėlynių vaisių ekstraktai dažnai įeina į akių sveikatą stiprinančių papildų sudėtį, pasižymi kraujagysles apsaugančiomis bei imunostimuliuojančiomis savybėmis, veikia nuo edemos. Neapdoroti mėlynių vaisių ekstraktai

dabar parduodami kaip farmaciniai preparatai, skirti gydyti oftalmologines ligas ir kraujagyslių sutrikimus (27).

Mėlynės yra viena svarbiausių *Vaccinium* genties rūšių, kurios lapai yra plačiai žinomi kaip natūralūs maisto, gėrimų, maisto papildų ir vaistų šaltiniai (28). Tyrimai parodė, kad mėlynių lapuose yra hidroksicinamono rūgščių, flavonolių, proantocianidinų, cinchonainų ir iridoidų (29). Europos šalyse mėlynių lapų ekstraktai dėl sutraukiančių ir antiseptinių savybių tradiciškai naudojami kaip augaliniai vaistai šlapimo takams gydyti. Jie taip pat turi antibakterinį, priešuždegiminį, hipoglikeminį, lipidų kiekį mažinantį ir hipolipideminį poveikį. Tačiau mėlynių lapuose rasta ir kitų vertingų junginių, tokių kaip stilbenai, iridoidiniai glikozidai, riebalų rūgštys, vitaminai, mineralinės medžiagos bei maistinės skaidulos (27).

### **1.3. Miltinė meškauogė (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng.)**

Meškauogė (3 pav.) tai žemaūgis, šliaužiantis, erikinių (*Ericaceae*) šeimos daugiametis augalas (30). Šakelės apaugusios trumpais koteliais, prisitvirtinusiomis storais, pailgais, suapvalintomis viršūnėmis, tamsiai žaliais, odiškais lapais. Viršutinė lapo dalis paprastai blizga, o apatinė – šviesi su įdubusiomis gyslomis. Žiemą lapai nusidažo bronzine spalva, o pavasarį vėl tampa žali. Baltai rausvi žiedai susitelkę po kelis trumpose, svyrančiose kekėse, žiedynkotis apaugęs trumpais garbanotais ir pavieniais liaukiniais plaukeliais. Taurelė giliai penkiaskiautė, su odiškais, trikampiškai apvaliomis skiautėmis. Vainikėlis kiaušiniškas arba ašotiškas, balzganas arba rausvas, su 5 trumpomis, apvaliomis, į lauko pusę išsilenkusiomis, rausvomis skiautėmis. Vaisius – rutuliška, miltinga uoga, kuri vasarą būna žalia, o rudenį – raudona, kartais pasiliekanti ant augalo per visą žiemą (8).



**3 pav. Miltinė meškauogė (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng.)**

Miltinė meškauogė žydi gegužės–birželio mėnesiais (8). Ši augalų rūšis tai amžinai žaliuojantys, žemaūgiai krūmai, randami Europoje, Azijoje bei Šiaurės Amerikoje. Pietinėje ir pietvakarinėje Europos dalyse meškauogės auga kalnuotuose regionuose, o Vidurio Europoje

daugiausia aptinkamos žemumose – sausuose pušynuose ir smėlingose kopose išsidėsčiusiuose viržynuose (31).

Daugelis Ericaceae augalų rūšių turi ilgą etnofarmakologinio naudojimo istoriją ir yra svarbios medicininiais bei farmakologiniais tikslais (3). Pastaraisiais metais buvo intensyviai tiriama meškauogių lapų cheminė sudėtis. Nustatyta, kad *Uvae ursi folium* yra gausus fitocheminių medžiagų šaltinis (31), ypač rezultatuose dominavo fenoliai, taninai bei flavonoidai. Arbutinas (hidrochinonas-β-D-gliukopiranozidas, 5–15 %) yra vienas iš pagrindinių ir svarbiausių junginių, aptinkamų meškauogių lapuose, tačiau metilarbutinas (iki 4 %) ir laisvieji aglikonai taip pat laikomi svarbiais fenoliniais junginiais (3). Daugelį metų šio augalo lapai tradicinėje medicinoje naudojami kaip diuretikas, antimikrobinis ir priešuždegiminis vaistas nuo įvairių urogenitalinės sistemos ligų (32). Pastaraisiais dešimtmečiais daug tyrimų parodė, kad meškauogių lapų ekstraktai turi stiprų poveikį bakterijų padermėms, sukeliančioms šlapimo takų infekcijas (31).

Antrinių metabolitų kaupimasis labai priklauso nuo genetinių, ontogeninių, morfogenetinių ir įvairių aplinkos veiksnių, tokių kaip šviesa, temperatūra, drėgmė, dirvožemio derlingumas bei druskingumas. Vieno veiksnio pokyčiai gali pakeisti antrinių metabolitų kieki, net jei kiti veiksniai išlieka pastovūs (33). Sugier ir kt. (2021 m.) atliko tyrimą, kuriame buvo bandoma išsiaiškinti skirtingose vietovėse surinktų *A. uva-ursi* lapų cheminę sudėtį, naudojant skysčių chromatografiją. Rezultatai parodė, kad skirtingose vietovėse (viržynuose ar pušynuose) augusių miltinių meškauogių lapų cheminė sudėtis skyrėsi. Viržynuose augančių meškauogių lapai pasižymėjo žymiai didesniu bendro flavonoidų ir hiperozido kiekiu bei žymiai mažesniu metilarbutino ir korilagino kiekiu, lyginant su pušynuose augančių miltinių meškauogių lapais (31).

#### **1.4. Šilinis viržis (*Calluna vulgaris* L.)**

Šilinis viržis (4 pav.) tai vienintelis *Calluna* genties, priklausančios *Ericaceae* šeimai, atstovas. Tai visžalis, daugiametis (34), 0,2 – 0,7 m aukščio krūmokšnis su prigulisiais įsišaknijančiais ūgliais ir kylančiomis šakelėmis. Stiebai ploni, pilkšvai rudi, labai išsišakoję; šakelių viršūnės stačios, tankios. Lapai išsidėstę čerpiškai, linijiški, pailgi, ketureiliai, bekočiai, apie 2 mm ilgio ir 0,6 mm pločio. Žiedynas kekiškas, tankus ir gausiažiedis. Žiedai trumpakočiai, nusvirę, rausvai violetiniai, retai balti. Vainikėlis pusės taurėlapio ilgio; vainiklapiai smailūs. Vaisius – apvali, daugiasėklė, keturlizdė dėžutė su standžiais plaukeliais. Sėklos labai smulkios, šviesiai rudos, pailgai kiaušiniškos (8).





**4 pav. Šilinis viržis (*Calluna vulgaris* L.)**

*C. vulgaris* yra kilęs iš Europos, tačiau tapo vienu iš labiausiai paplitusių augalų visoje Azijoje, Šiaurės Amerikoje, Australijoje bei Naujojoje Zelandijoje (35). Žydi liepos – rugsėjo mėnesiais (8). Šis augalas apibūdinamas kaip oligotrofinė, kalcifuginė rūšis (36), galinti augti bei išgyventi aukštapelkėse, ypač degusiuose, sausintuose durpynuose, smėlynuose, kopose, t. y. nekarbonatinguose dirvožemiuose. Gali sudaryti didžiulius sąžalynus ar vientisą kilimą (8).

*C. vulgaris* nuo seno naudojamas tradicinėje medicinoje dėl fenolinių junginių terapinio poveikio (37). *C. vulgaris* pasižymi antibakteriniu, nerimą mažinančiu poveikiu (38), antivirusinėmis savybėmis (39), antihipertenziniu, analgetiniu bei priešūždegiminiu poveikiu (40). Svarbu paminėti, kad *C. vulgaris* ekstraktas yra veiksmingas prieš *Mycobacterium tuberculosis bacillus* (41). Tai moksliskai pagrindžia tradicinį šio augalo vartojimą gydant tuberkuliozę (42).

*C. vulgaris* cheminė sudėtis buvo plačiai tiriama siekiant nustatyti pagrindinius bioaktyvius junginius bei maistingumą. Gausiausiai *C. vulgaris* besikaupiantys cheminiai junginiai – fenolinės rūgštys (hidroksicinamo rūgštis, kofeino rūgštis, kumarinai), flavonoidai (rutinas, kvercetas, izokvercetas, kaempferolis, luteolinas, apigeninas), fenoliai ir jų glikozidai (hidrochinonas, arbutinas, metilarbutinas), taninai, triterpenai, antocianidinai, terpenoidai (lupeolis, ursolio, oleanolio rūgštys), organinės rūgštys, steroidai, eteriniai aliejai. Šių bioaktyvių junginių yra įvairiose šio daugiamečio augalo dalyse (šaknyse, žieduose, ūgliuose) (34). Fitocheminė *C. vulgaris* analizė taip pat parodė, kad yra vitaminų, ypač vitamino E, kurį sudaro aštuoni tarpusavyje susiję junginiai: keturi tokoferoliai ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tokoferolis) ir keturi tokotrienoliai ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tokotrienolis) (43).

Starchenko ir kt. (2020 m.) spektrofotometriniu metodu nustatė *C. vulgaris* antžeminių dalių sudėtyje esančius įvairius fenolinius metabolitus, iš kurių dominuojantys buvo arbutinas, chlorogeninė rūgštis, rutinas, (-)-epigalokatechinas ir (+)-galokatechinas. Arbutino, rutino kiekiai buvo didesni vandeniniame ekstrakte, tuo tarpu hidroetanoliniuose ekstraktuose (70 % etanolio) buvo nustatyta daugiau chlorogeninės rūgšties, rutino, hiperozido, kvercetino-3-D-

gliukozido, (+)-galokatechino ir (-)- epigalokatechino (44). Nepaisant to, kad arbutinas yra labiausiai vyraujantis *C. vulgaris* junginys, vandeniniuose ekstraktuose jo buvo 1,25 %, tuo tarpu hidroetanoliniame ekstrakte (70 % etanolio) šio junginio nustatyta 0,83 % arba jo net nebuvo aptikta (45).

Nors fenolinių junginių rasta visose *C. vulgaris* augalų dalyse, jų kiekis gali skirtis priklausomai nuo augalo augimo etapo arba nuo klimato veiksnių, pavyzdžiui, aukščio virš jūros lygio ar dirvožemio savybių (34). Chepel ir kt. (2020 m.) stebėjo įvairių fenolinių junginių pokyčius šilinio viržio augaluose skirtingais vystymosi etapais (vegetacijos, žiedinių pumpurų, žydėjimo, sėklų brandimo). Autoriai nustatė, kad vegetatyvinėje stadijoje didžiausias fenolinių junginių (ypač taninų, flavonoidų ir proantocianidinų) kiekis susikaupia šaknyse ( $31,66 \pm 0,53$  mg/g), mažiausias ( $14,52 \pm 1,85$  mg/g) – lapuose. Fenolinių junginių kiekis keitėsi augalui vystantis: daugiau fenolinių junginių (flavonoidų, antocianinų, proantocianidinų ir hidroksicinamo rūgšties) lapai sukaupe žiedinių pumpurų ( $28,15 \pm 0,76$  mg/g) ir sėklų brandimo tarpsniu ( $32,67 \pm 0,12$  mg/g), o didžiausias bendras fenolinių junginių (taninų, flavonoidų, antocianinų, proantocianidinų ir hidroksicinamo rūgšties) kiekis žieduose buvo žydėjimo fazėje ( $27,88 \pm 0,18$  mg/g) (46). Tokio pobūdžio tyrimai yra labai svarbūs, nes jie reikšmingai prisideda prie supratimo apie galimus fenolinių junginių kaupimosi pokyčius įvairiose *C. vulgaris* dalyse skirtingais augimo etapais ir taip padeda geriau panaudoti šį augalą gydymo tikslais (34).

### 1.5. Paprastoji rasakila (*Alchemilla vulgaris* L.)

*Alchemilla vulgaris* (5 pav.) tai daugiametis 30 – 50 cm aukščio žolinis augalas, priklausantis *Rosaceae* šeimai (47). Paprastoji rasakila pasižymi gana ilgu, tvirtu šakniastiebiu. Lapai apskriti, stori, 3 – 5 cm ilgio, abipus plaukuoti, prie vidurinių gyslų klostėti. Vienų lapų skiautės gana ilgos, smailaus trikampio arba pailgo puskiaušinio formos, su smailiais arba apysmailiais danteliais, kitų (paprastai pavasarinių) jos gana trumpos, apskritaviršūnės, pusrutuliškos arba lankiškos, su apybukiais danteliais (pasitaiko individų arba vien tik su ilgomis, arba vien tik su trumpomis skiautėmis). Pamatinės lapų skiautės viena ant kitos užėina, tikrai retkarčiais tarp jų yra siauras tarpas. *A. vulgaris* žiedynas platus, gausiažiedis. Žiedai žalsvi, 4 – 5 mm pločio; hipantijos trumpos, pusrutuliškos, visai plikos. Saulėtose vietose augančių augalų stiebai, lapkočiai, atskiros lapų dalys, danteliai, prielapiai ir žiedai po kiek laiko paraudonuoja (48).



**5 pav. Paprastoji rasakila (*Alchemilla vulgaris* L.)**

Paprastoji rasakila paplitusi beveik visoje Europoje, didesniuose Europos teritorijos plotuose Rusijoje bei Sibire (49), taip pat Vakarų Azijoje ir Šiaurės Amerikoje (50). Žydi gegužės – spalio mėnesiais. Auga paprastai sausuose, atviruose, nedidelių upių ir upelių šlaituose bei krantuose, pagrioviuose, dažnai dideliais sąžalynais. Pasitaiko ir dobilienose, ant ežių, miškuose, parkuose, baltalksniais apaugusiuose nedidelių upių šlaituose, retkarčiais ir šlapiuose, versmėtuose šlaituose (48).

*A. vulgaris* plačiai naudojama liaudies medicinoje visame pasaulyje. Pietryčių Europoje ir Balkanuose *Alchemilla* rūšys vartojamos esant ginekologiniams, menstruaciniams ir menopauzės sutrikimams, kvėpavimo takų infekcijoms, viduriavimui, diabetui, inkstų ir kepenų ligoms, svorio kritimui, odos sutrikimams ir įvairiems uždegimams (51–53). Taip pat šis vaistinis augalas pasižymi antibakterinėmis, priešgrybelinėmis ir antivirusinėmis savybėmis (52,53). Atsižvelgiant į bakterijų atsparumą antibiotikams, augaliniai vaistai ir ekstraktai laikomi veiksmingais antibakteriniais preparatais, nesukeliantis pavojaus, kad atsparumas standartiniams antimikrobiniais preparatams dar labiau padidės (54). Neseniai atliktas tyrimas, taikytas *A. vulgaris* infuzijos poveikiui po hipoksijos padarinių, atskleidė teigiamas augalinio vaisto neuroprotekcines savybes (55).

Atliktų tyrimų duomenimis, *A. vulgaris* antžeminėse dalyse yra daug fenolinių junginių, ypač daug fenolinių rūgščių (elago, galo ir kofeino rūgščių), flavonoidų (kvercetino, izokvercetino, rutino ir tilirozido) ir taninų agrimoniino, pedunculagino ir laevigatino (56). Fenoliniai junginiai iš šios rūšies augalų paprastai ekstrahuojami naudojant standartinius organinius tirpiklius. Duckstein ir kt. (2012 m.) iš *A. vulgaris* lapų (įskaitant stiebus) acetonu ir vandeniu išskyrė skirtingus elagitaninus, atitinkamai galo bei chlorogeno rūgštis (50), o Boroja ir kt. (2018 m.) fenolinius junginius iš antžeminių dalių ir šaknų išskyrė maceruojuant metanolyje (47). Bioaktyvūs junginiai iš sausos augalinės medžiagos gali būti ekstrahuojami ir kitais tirpikliais, pavyzdžiui, 80 % metanoliu, 70 % etanoliu, 70 % etilacetatu ir distiliuotu vandeniu 24

val. maceruojant, kur etilacetatas pasirodė esąs veiksmingiausias ekstrahuojant fenolinius junginius (galo rūgštį, kofeino rūgštį, ferulo rūgštį, kvercetiną, katechiną, kaempferolį), taip pat pasižymintis didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu (57). Šiuo metu vis labiau pripažįstama fenolinių komponentų svarba, todėl vis dažniau kuriami nauji jų ekstrakcijos ir išskyrimo metodai (58). Pagrindinis skirtumas tarp tradicinių ir šiuolaikinių ekstrahavimo metodų yra geresnis pastarųjų našumas per trumpesnę ekstrahavimo laiką (59).

### 1.6. Vaistinė dirvuolė (*Agrimonia eupatoria* L.)

Vaistinė dirvuolė tai 30 – 100 cm aukščio daugiametis žolinis augalas, su trumpu, storu šakniastiebiu, priklausantis *Rosaceae* šeimai. Stiebas status, dažniausiai nešakotas. Lapų viršutinė pusė tamsiai žalia, apaugusi prigulusiais plaukeliais, apatinė pusė balsva, apaugusi tankiais plaukeliais ir pasislėpusiomis po jais mažomis, beveik bekotėmis liaukutėmis. Apatiniai ir viduriniai lapai yra 9 – 30 cm ilgio, viršutiniai – staigiai susmulkėjantys, apatiniai lapai suartėdami sudaro skrotelę. Žiedynas 10 – 30 cm ilgio. Vainiklapiai kiaušiniški, viršuje nežymiai iškirpti. Žiedo dubenėlis žydėjimo metu yra 2 – 3 mm, vaisiams subrendus – 4 – 5 mm, apaugęs tankiais plaukeliais, su 10 gilių išilginių vagelių, prieinančių beveik iki pat jo pamato, vaisiams išaugus, greit nusvyrantis. Subrendę vaisiai yra 5 – 8 mm ilgio bei 3 – 6,5 mm pločio (48).



6 pav. Vaistinė dirvuolė (*Agrimonia eupatoria* L.)

Šie augalai daugiausia paplitę vidutinio klimato šiaurinio pusrutulio regionuose (60), žydi birželio – rugpjūčio mėnesiais. Šią rūšį galima aptikti šlaituose, pakelėse ir uolėtose vietose, taip pat sausose pievose bei sausringuose miškuose (61).

Pastaraisiais dešimtmečiais padidėjo susidomėjimas fitomedicinos nauda sveikatai. Daugelio ekstraktų poveikio sveikatai aspektų yra susiję su polifenolių kiekiu augale (62). Pavyzdžiui, *A. eupatoria* vandeniniai ekstraktai pasižymi į insuliną panašiu poveikiu ir dėl antioksidacinių savybių pasižymi hepatoproteciniu (63) bei neuroproteciniu poveikiais (64). Šiandien vaistinė dirvuolė naudojama įvairių pasaulio šalių medicinoje. Augalas pasižymi plačiu farmakologinio aktyvumo spektru – choleretiniu, sutraukiančiu, priešūždegiminiu, antimikrobinu,



antivirusiniu (65), atsikosėjimą lengvinančiu, diuretiniu, hemostaziniu ir medžiagų apykaitą normalizuojančiu poveikiu (66).

Malheiros ir kt. (2022 m.) atliko tyrimą, kuriuo siekė nustatyti bendrą fenolių, flavonoidų, taninų ir proantocianidinų kiekį *A. eupatoria* vandens, dietileterio, acetono ir etanolio ekstraktuose (67). Antriniai metabolitai, tokie kaip: flavonoidai, fenoliai, taninai ir proantocianidiniai, pasižymi tirpumu vandenyje, acetone, etanolyje ir dietilo eteri, ir tai yra kriterijus, pagal kurį pasirenkamas tirpiklis ekstrakcijai. Remiantis gautais rezultatais, acetono ekstrakto buvo nustatytas didžiausias bendras flavonoidų (97,06 mgRU/g), bendras fenolių (220,31 mgGR/g), bendras taninų (207,27 mgGR/g) ir bendras proantocianidinų (103,72 CChE/g) kiekis. Etanoliniuose ir vandeniniuose *A. eupatoria* ekstraktuose šių junginių kiekiai buvo perpus mažesni, o dietilo eterio ekstrakto – mažiausi. Tuo tarpu acetoniniame *A. eupatoria* ekstrakto šių junginių kiekiai buvo didžiausi: to priežastis gali būti ta, kad acetonas yra veiksmingas tirpiklis šios rūšies augaluose besikaupiančių fenolių, taninų ir proantocianidinų ekstrahavimui (68).

### 1.7. Žąsinė sidabražolė (*Potentilla anserina* L.)

*Potentilla anserina* (7 pav.) tai daugiametis žolinis augalas, priklausantis *Rosaceae* šeimai, turintis mėsingas, gumbiškas sustorėjusias šaknis. Žiedus išauginantieji stiebai ploni, 15 – 80 cm ilgio, šliaužiantys, ties bambliais įsišaknijantys, plaukuoti. Pamatiniai lapai kotuoti, siaurai pailgi arba platesni, dažniausiai 10 – 20 cm ilgio, pertrauktinai plunksniški. Viršutiniai lapeliai bekočiai, elipsiški arba pailgai atvirksčiai kiaušiniški, 1 – 4 cm ilgio, iki pat pamato giliai pjūkliškai dantyti, su smailiais danteliais, viršutinėje pusėje žali, pliki, apatinėje – pilkšvi, blizgantys. Žiedai stambūs, 1,5 – 2 cm skersmens, pavieniai, ilgakočiai, išaugę ties bambliais. Pataurys, taurelė ir vainikėlis penkianariai. Taurėlapiai plačiai kiaušiniški, apysmailiai, lygiakraščiai. Vainiklapiai dukart ilgesni už taurėlapius, 7 – 10 mm ilgio. Vaisiai kiaušiniški arba rutuliški, su vagele nugarėlėje (8).



7 pav. Žąsinė sidabražolė (*Potentilla anserina* L.)

Žašinė sidabražolė randama vidutinio klimato juostoje visame pasaulyje, tačiau dažniausiai smėlėtuose arba molinguose dirvožemiuose Europoje, Sibire, Tolimuosiuose Rytuose bei Centrinėje Azijoje (69). Žydi gegužės – rugpjūčio mėnesiais (8).

*Potentilla anserina* ekstraktai tradicinėje medicinoje naudojami jau seniai. Augalo antžeminių ir požeminių dalių ekstraktai naudojami uždegimams, žaizdoms, bakterijų, grybelių ir virusų sukeltoms infekcijoms, viduriavimui, cukriniam diabetui ar kitiems negalavimams gydyti (70). Tomczyk ir Latté teigia, jog *P. anserina* ir kitos *Potentilla* rūšys paprastai naudojamos homeopatiniams vaistams ruošti (71), todėl *P. anserina* perdirbama į daugelį maisto papildų ir farmacinių preparatų, tokių kaip arbatos, tinktūros, kapsulės ar tabletės (70). Augalo antžeminėje dalyje randama fenolkarboksirūgščių ir hidroksikinamo rūgščių, flavonoidų, kumarinų, katechinų, leukocianidinų, antocianinų bei rauginių medžiagų (72).

Literatūros duomenimis, "standartinio" tirpiklio *P. anserina* fenoliniams junginiams ekstrahuoti nėra. Skirtingi autoriai naudojo 70 % acetoną (69), 30 – 100 % metanolį (73), 70 % etanolį (70) ir vandenį (74). Dėl šios priežasties buvo tikrinamos įvairių rūšių terpės, įskaitant įprastinius tirpiklius, tokius kaip vanduo ar alkoholiai, taip pat netradicinius tirpiklius, tokius kaip ketonai, eteriai bei dimetilsulfoksidai. Remiantis tyrimų rezultatais, vandeninis ekstraktas parodė didžiausią kofeino rūgšties kiekį 152,68 µg/ml; flavonoidų, agrimoniino ir elaginės rūgšties kiekis vandeniniame ekstrakte buvo daug mažesnis nei metanolinio ekstrakto. Etanoliniame ekstrakte nustatyti visų junginių kiekių tarpinės vertės, išskyrus elaginės rūgšties, kurios kiekis buvo mažesnis nei vandeniniame ekstrakte 7,89 µg/ml. Bendro fenolinių junginių kiekio vertės buvo 639,27, 1123,04 ir 585,60 µg/ml atitinkamai vandens, metanolio ir etanolio ekstraktuose. Taikant n-propanolį ir izopropanolį, didesnio kiekio fenolinių junginių išskirti nepavyko; bendras identifikuotų fenolinių junginių kiekis *P. anserina* n-propanolio ir izopropanolio ekstraktuose buvo atitinkamai 122,62 ir 26,41 µg/ml. Naudojant polinį aprotinį dimetilsulfoksido tirpiklį, *P. anserina* ekstrakte buvo nustatytas didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis – 1806,23 µg/ml. (69). Šie rezultatai tik patvirtina, jog siekiant išgauti didžiausią cheminių junginių kiekį, būtina pasirinkti ne tik išgavimo metodą bet ir tinkamiausią tirpiklį.

### **1.8. Paprastoji žemuogė (*Fragaria vesca* L.)**

*Fragaria vesca* (8 pav.) tai *Rosaceae* šeimai priklausantis daugiametis žolinis augalas. Stiebas 5 – 20 cm aukščio, stačias, rečiau kylantis, nedaug aukštesnis už pamatinius lapus, apatinėje dalyje gausiai apaugęs pasišiaušusiais plaukeliais. Pamatiniai lapai ilgakočiai, trilapiai, viršutinėje pusėje tamsiai žali, negausiai apaugę prigulusiais plaukeliais, apatinėje – melsvai žali, šilkaplaukiai. Vidurinis lapelis su trumpu koteliu, kiaušiniškas arba rombiškas, šoniniai – įžambiai apskriti arba atvirkščiai kiaušiniški, bekočiai arba su vos žymiais koteliais. Visi lapai stambiai

dantyti, iš kiekvieno šono turi 6 – 13 trikampiškų arba beveik apskritų dantelių. Prielapiai lancetiški, nusmailėję, lygiakraščiai, plaukuota apatine puse. Viršūniniai lapai paprastai redukuoti. Žiedynas – skėtiška kekė su nedaugeliu žiedų. Žiedkočiai ilgi. Žiedai paprastai ne daugiau kaip 2 cm skersmens. Taurėlapiai trikampiški, smailūs arba staigiai nusmailėję, apaugę prigulusiais plaukeliais, vaisiui išaugus, horizontaliai atsilošę arba užsilenkę atgal. Vaisiai – kiaušiniškos, kūgiškos arba beveik apvalios ryškiai raudonos uogos, užaugančios iki 2 cm ilgio (8).



### 8 pav. Paprastoji žemuogė (*Fragaria vesca* L.)

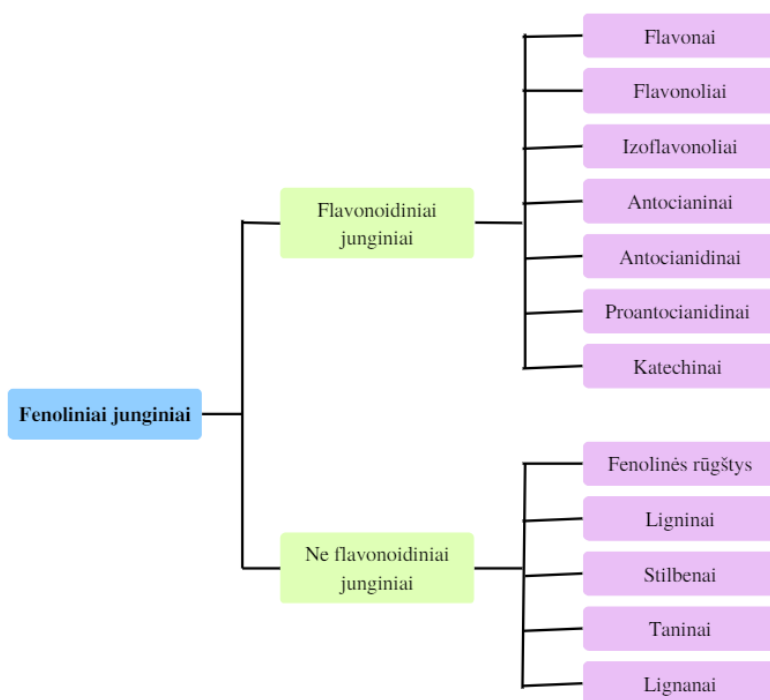
Paprastoji žemuogė paplitusi Europoje, Japonijoje, Šiaurės Amerikoje ir Kanadoje. Auga laukinėse kalnų zonose, miškuose, šlaituose bei pakelėse (75). Žydi gegužės – birželio mėnesiais, kartais antrą kartą pražysta ir rudenį (8).

*F. vesca* ypač vertinama dėl savo vaisių, tačiau remiantis šaltiniais, vegetatyvinės dalys taip pat yra svarbios makro- ir mikroelementų, fenolinių junginių šaltinis (76). *F. vesca* lapuose gausu elagitaninų, flavonoidų, proantocianidinų, fenolinių rūgščių, lakiųjų aliejų, katechinų, metilo salicilato, elaginės rūgšties, borneolio, taip pat aptinkama ir alkaloidų pėdsakų. Dėl didelės polifenolinių junginių įvairovės ir jų antioksidacinių savybių *F. vesca* lapų ekstraktai naudojami kosmetikoje, kuri pasižymi odą apsaugančiomis savybėmis (77). Hidrolizuojami taninai, t. y. elagitaninai, pasižymi antioksidaciniu ir antimelanogeniniu poveikiu, kurio mechanizmas yra susijęs su tirozinazės – esminio fermento, katalizuojančio pirmuosius endogeninio melanino gamybos etapus – ekspresijos mažėjimu (78,79). Taip pat nustatyta, kad elaginė rūgštis, susidaranti hidrolizuojant elagitaninus, slopina melanogenezę (78). Manoma, kad depigmentuojantis poveikis yra susijęs su tirozinazės antioksidaciniu aktyvumu (79). Svarbu paminėti, jog paprastoji žemuogė taip pat yra naudojama virškinimo ir kraujotakos sistemos ligoms gydyti. Nepaisant to, jog *F. vesca* pasižymi detoksikuojančiomis, šlapimą varančiomis bei stimuliuojančiomis savybėmis, ji taip pat naudojama nuovirams gaminti, kurie skirti hipertenzijos gydymui (80).

Cyboran-Mikołajczyk ir kt. (2022 m.) atliko tyrimą, kurio tikslas buvo nustatyti *Rubus idaeus* ir *F. vesca* lapų vandeninių ekstraktų citotoksiškumą ir antioksidacinį aktyvumą pasirinktoms kraujotakos sistemos ląstelėms. Naudojant chromatografinius metodus buvo atlikta išsami kokybinė ir kiekybinė ekstraktų fenolinių junginių analizė. Remiantis gautais rezultatais, paprastosios žemuogės lapų ekstraktuose daugiausia rasta elagitaninų (595,55 mg/g), kvercetino-3-O-gliukuronido (15,12 mg/g), kvercetino-3-O- rutinozido (8,78 mg/g), neochlorogeninė rūgšties (5,05 mg/g), tuo tarpu *Rubus idaeus* ekstraktuose šių komponentų buvo mažiau arba visai neaptikta (81).

### 1.9. Fenoliniai junginiai

Fenoliai – tai organiniai cheminiai junginiai, randami visuose augaluose antrinių metabolitų pavidalu (82). Antriniai metabolitai veikia kaip signaliniai junginiai, pritraukiantys apdulkintojus ar gyvūnus sėkloms išbarstyti, be to, jie apsaugo augalą nuo oksidantų ir ultravioletinių spindulių. Fenoliniai junginiai pasižymi didele struktūrine įvairove, kuriai būdingas vienas ar daugiau aromatinis benzeno žiedas (C6) su konjuguota aromatine sistema, turinčia vieną ar daugiau hidroksilo grupių. Fenolio žiedų skaičius ir struktūriniai elementai, jungiantys žiedus tarpusavyje, lemia platų gamtoje pasitaikančių fenolinių junginių spektrą, tačiau nepaisant to, fenoliniai metabolitai dažniausiai klasifikuojami į flavonoidinius ir ne flavonoidinius junginius (83). Šių junginių smulkesnė klasifikacija pateikta 9 paveikslėlyje (84).



9 pav. Fenolinių junginių klasifikacija (84)



Kai kurie fenoliniai junginiai yra labai plačiai paplitę, o kiti būdingi tik tam tikroms augalų šeimoms arba aptinkami tik tam tikruose augalų organuose bei tam tikrais vystymosi etapais (85). Flavonoidai yra vieni iš labiausiai paplitusių fenolinių junginių, plačiai pasiskirsčiusių augalų audiniuose, kurie kartu su karotinoidais ir chlorofilais dažnai lemia mėlyną, violetinę, geltoną, oranžinę ir raudoną spalvas. Flavonoidų grupei priklauso flavonai, flavonoliai, izoflavonoliai, antocianinai, antocianidinai, proantocianidinai ir katechinai (86,87). Visi flavonoidai yra kilę iš aromatinių aminorūgščių, fenilalanino ir tirozino bei yra trijų žiedų struktūros (10). Flavonoidų struktūros skirtumai atsiranda dėl hidroksilinimo, renilinimo, šarminimo ir glikozilinimo reakcijų, kurių pasekoje pagrindinė molekulė pasikeičia (88). Struktūrų įvairovė lemia daugelį skirtingų savybių, kurios susiję su specifiniais vaidmenimis augaluose, todėl ir jų paplitimas yra specifinis. Pavyzdžiui, antocianinai yra daugumos raudonų ir mėlynų augalų organų pigmentai. Jų randama žieduose bei sunokusiuose vaisiuose, kurie atlieka svarbų vaidmenį traukos procesuose, susijusiuose su apdulkinimu ir sėklų platinimu. Antocianinai taip pat gana dažni jaunuose lapuose, kur gali turėti atbaidantį poveikį žolėdžiams vabzdžiams (85). Flavonoliai apsaugo augalų audinius nuo UV spinduliuotės (89), o proantocianidinai (t. y. flavan-3-olio oligomerai ir polimerai, dar vadinami kondensuotais taninais) gali dalyvauti augalų apsaugoje nuo žolėdžių, grybų ir virusų, tikriausiai dėl savo baltymų rauginimo savybių, ir randami daugumoje augalų audinių nuo ankstesnių vystymosi stadijų (90).

Fenolinės rūgštys yra kita svarbi fenolinių junginių grupė, paplitusi augaluose. Šios rūgštys būna esterių, glikozidų arba amidų pavidalo, tačiau retai būna laisvos formos. Fenolinės rūgštys skiriasi hidroksilo grupių skaičiumi ir išsidėstymu aromatiniam žiede (91). Fenolinės rūgštys turi dvi pirmines struktūras: hidroksicinaminę ir hidroksibenzoinę rūgštį. Hidroksicinaminės rūgšties dariniai yra ferulinė, kavos, p-kumaro ir sinapinė rūgštys, o hidroksibenzoinės rūgšties dariniai – galo, vanilinė, siringinė bei protokatechinė rūgštys (88).

Kita svarbi fenolinių junginių klasė - ląstelių sienelių fenoliniai junginiai. Jie yra netirpūs ir randami kompleksuose su kitų tipų ląstelių komponentais. Dvi pagrindinės ląstelių sienelių fenolinių medžiagų grupės yra ligninai ir hidroksicinamono rūgštys (92). Ligninas yra polifenolinis junginys, sintetinamas polipropanoidiniu būdu. Šis fenolinis junginys yra kai kurių induočių augalų ir kai kurių dumblių struktūrinė medžiaga, taip pat atlieka svarbų vaidmenį ląstelių sienelių susidaryme (93).

Kai kurie tyrimai parodė, kad fenoliniai junginiai yra gausiausi iš visų su maistu gaunamų antioksidantų. Pastaruoju metu fenoliniai junginiai sulaukė didelio susidomėjimo, nes buvo paskelbta daug pranešimų apie numanomą jų vaidmenį stabdant įvairias žmogaus ligas (94). Iš augalų išskirti fenoliniai junginiai gali slopinti amilazės absorbciją gydant angliavandenių

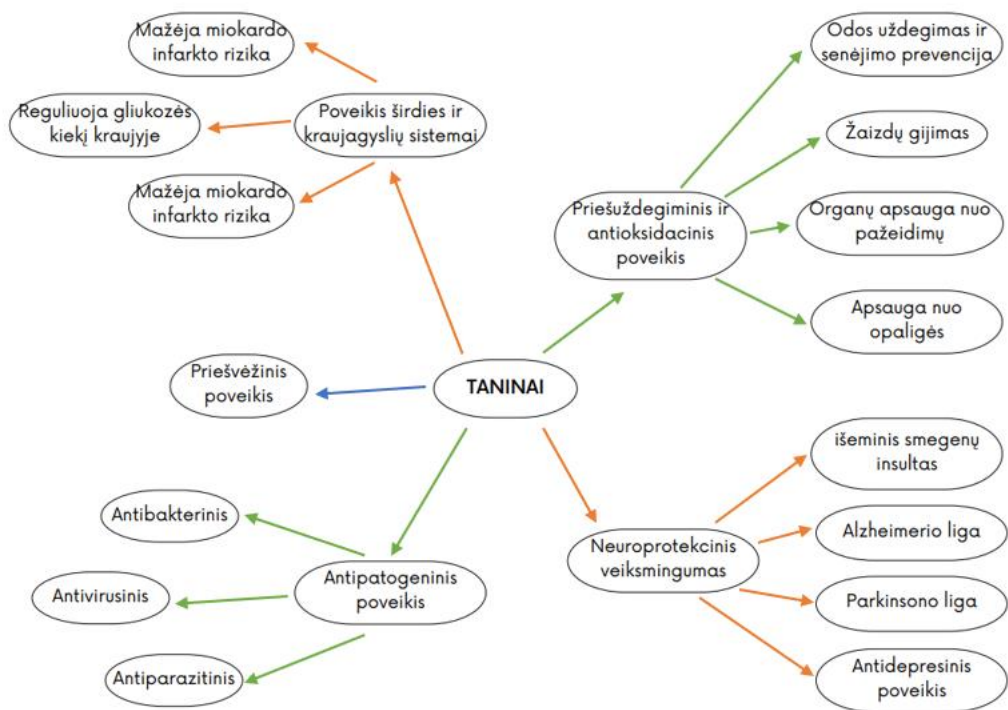
absorbiciją, pavyzdžiui, cukrinį diabetą (95). Atlikta daug tyrimų, kurie įrodo fenolinių junginių teigiamą poveikį, stabdant senėjimo procesus, priešuždegiminį ar antiproliferacinį poveikį (96). Skirtingos fenolinių junginių grupės pasižymi skirtingomis biologinėmis savybėmis ir labai mažai žinoma apie mechanizmus, kuriais jie galėtų prisidėti prie ligų prevencijos, todėl vis dar reikia atlikti tolesnius tyrimus (2).

### **1.10. Taninai**

Taninai yra natūralių fenolinių biomolekulių grupė, kurios pagrindinis vaidmuo - apsaugoti augalus nuo vabzdžių ir grybų. Nors ši grupė apima daugybę oligomerų ir polimerų, galima išskirti dvi pagrindines taninų grupes: hidrolizuojamus taninus ir proantocianidinus, dar vadinamus kondensuotais flavonoidiniais taniniais, kurie yra atsparūs hidroliziniam skilimui (97). Hidrolizuojamus taninus sudaro galo rūgšties (galotaninai) arba elagino rūgšties (elagitaninai) esteriai su cukraus šerdimi, dažniausiai gliukoze, ir jie lengvai hidrolizuojami rūgščių arba fermentų į monomerus (5). Hidrolizuojamų taninų molekulinė masė varijuoja nuo 500 iki 3000 daltonų (Da) (98). Kondensuotieji taninai sudaryti iš skirtingo polimerizacijos laipsnio flavonoidų oligomerų (5), o jų molekulinė masė varijuoja nuo 1 000 iki 20 000 Da (98). Taninų sudėtyje yra aromatinių žiedų su hidroksilo grupėmis, dėl kurių jie pasižymi dideliu cheminiu aktyvumu ir gali sudaryti kompleksus su kitomis makromolekulėmis, pavyzdžiui, angliavandeniais, arba bakterijų ląstelių membranomis. Tačiau pagrindinės jų savybės yra baltymų kompleksų sudarymas ir nusodinimas (99).

Augaliniai taninai plačiai paplitę augaluose, ypač žolėse, krūmuose, grūduose bei vaistažolėse (98). Jų taip pat yra daugelyje vaisių, pavyzdžiui, bananuose, gervuogėse, obuoliuose ar vynuogėse (100). Sudėtiniai taninai ir kondensuoti taninai yra labiausiai paplitę ir lengvai išgaunami iš ankštinių augalų; galo rūgšties taninai dažniausiai aptinkami galo riešutuose ar lakišiaus lapuose, o elago rūgšties taninai - ąžuoluose, gervuogėse ir granatuose. Augalinių taninų daugiau yra labiau pažeidžiamose augalų dalyse, pavyzdžiui, jaunuose lapuose ar žieduose (101). Kadangi augaluose randamų taninų cheminė struktūra ir kiekis labai skiriasi priklausomai nuo augalų rūšių, augimo stadijų bei sąlygų (tokių kaip temperatūra, šviesa ir maistinės medžiagos), skiriasi ir skirtingų ekstrahavimo būdų biologinės funkcijos (102).

Taninai pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis, nes sulaiko reaktyvius laisvuosius radikalus, taip pat atlieka svarbų vaidmenį gerinant žmogaus sveikatą (103,104). Tanino rūgšties (TA) farmakologinis veiksmingumas ir su juo susiję veikimo mechanizmai pateikti 10 paveikslėlyje (5).



10 pav. Farmakologinis tanino rūgšties veiksmingumas (5)

Pastaraisiais metais atlikta daug tyrimų, siekiant nustatyti taninų antioksidacinį aktyvumą. Dėl savo antioksidacinių savybių, pavyzdžiui, širdies ir kraujagyslių ligų, vėžio ar osteoporozės prevencijos, taninai sulaukė daug dėmesio (105,106). Manoma, kad TA gali būti naudojamas kaip antidiabetinis vaistas, nes slopina su medžiagų apykaita susijusius fermentus, įskaitant  $\alpha$ -gliukozidazę ir  $\alpha$ -amilazę (5). Naujausi tyrimai parodė, kad TA  $\alpha$ -amilazės slopinamasis aktyvumas yra geresnis už akarbozės aktyvumą: IC50 yra 3,46, palyginti su 10,4  $\mu\text{g/ml}$  (107). TA, inkapsuliuotas į kalcio-alginato mikrogranules, skirtas vartoti per burną, pasižymi ilgalaikiu atsipalaidavimu ir riboja  $\alpha$ -amilazės veiklą plonojoje žarnoje (108). Be to, TA ir galo rūgštis gali sumažinti aldozės reduktazės ir sorbitolio dehidrogenazės susidarymą inkstuose (109). Taigi TA gali būti naudojama monosacharidų absorbcijai virškinamajame trakte mažinti, siekiant kontroliuoti cukraus kiekį kraujyje.

### 1.11. Ekstrahavimo metodai ir tirpikliai

Pirmasis biologiškai aktyvių junginių iš augalinės medžiagos išskyrimo ir gryninimo etapas yra ekstrahavimas. Antrinių metabolitų, tokių kaip fenolinės rūgštys ir flavonoidai, ekstrakcija yra sudėtinga dėl jų netirpumo (110). Norint padidinti ekstrakcijos greitį, prieš ekstrahuojant augalo audinį reikia kruopščiai homogenizuoti (111). Įvairios augalų dalys, pavyzdžiui, lapai, šaknys, vaisiai, žiedai, šakniastiebiai ir kt. gamina biologiškai aktyvias chemines medžiagas nedideliais ir įvairiais kiekiais. Todėl labai svarbu pasirinkti tinkamą ekstrakcijos būdą, kad iš augalinės žaliavos būtų išekstrahuojamas maksimalus bioaktyvių junginių kiekis (112).

Ekstrakcijos veiksmingumą lemia keli svarbūs elementai, įskaitant ekstrakcijos metodą, augalinės žaliavos savybes, ekstrakcijos tirpiklį, temperatūrą, slėgį ir laiką (113).

Tirpiklio pasirinkimas priklauso nuo augalo rūšies, ekstrahuojamos augalo dalies, biologiškai aktyvių junginių prigimties ir tirpiklio prieinamumo. Paprastai poliniams junginiams ekstrahuoti naudojami poliniai tirpikliai, tokie kaip: vanduo, metanolis ir etanolis, o nepoliniams junginiams ekstrahuoti nepoliniai tirpikliai, tokie kaip heksanas ir dichlormetanas (111,114). Visuose prieš tai paminėtuose tirpikliuose yra vandens dėl jo didelio poliškumo ir maišymosi su organiniu tirpikliu. Junginys, kuris turi būti ekstrahuojamas taikant skysčio-skysčio ekstrahavimo metodą, turėtų būti tirpus organiniame tirpiklyje, bet ne vandenyje, kad būtų lengviau atskirti (115). Renkantis ekstrahentą reikėtų atsižvelgti į keletą veiksnių, tokių kaip: selektyvumas; saugumas, jog nebūtų toksiškas ar degus; reaktyvumas, kadangi tinkamas ekstrakcijos tirpiklis neturėtų reaguoti su biologiškai veikliais ekstrakto junginiais; išgavimas; klampumas, kuris turėtų būti kuo mažesnis, kad būtų lengva išsiskverbti; temperatūra – kuo žemesnė, kad tirpiklis nesuirėtų nuo karščio (116).

Da Silva ir kiti (2020 m.) vertino skirtingų tirpiklių (gryno vandens, etanolio (50 – 100 %, v/v) ir metanolio (50 – 100 %, v/v)) poveikį fenolinių junginių ekstrakcijai iš obuolių išspaudų ir nustatė, kad geriausiai fenolinius junginius išgauna 80 % metanolis (v/v) (117). Organiniai tirpikliai, tokie kaip etanolis ar jo mišiniai, labiausiai tinkami fenoliniams junginiams (pvz., flavonoidams) ekstrahuoti (118).

Per pastaruosius 50 metų buvo sukurtos naujos ekstrahavimo technologijos, kurios yra palankesnės aplinkai dėl mažesnio sintetinių ir organinių cheminių medžiagų sunaudojimo, trumpesnio darbo laiko ir geresnės ekstrakto išeigos bei kokybės. Siekiant pagerinti bendrą iš augalinių medžiagų išgaunamų biologiškai aktyvių komponentų išeigą ir selektyvumą, populiarėja nauji ekstrahavimo metodai, tokie kaip: ekstrakcija ultragarsu (119), impulsiniu elektriniu lauku (110), fermentais (120), mikrobangų krosnelėmis (121), superkritiniu skysčiu (122) arba suslėgtu skysčiu (119).

### **1.11.1. Ekstrahavimas ultragarsu**

Šis procesas apima labai aukšto dažnio, didesnio nei 20 KHz, garso energijos naudojimą, kad būtų suardytos visos augalo ląstelės ir padidintas tirpiklio prasiskverbimo į augalinę žaliavą paviršiaus plotas. Taikant šį metodą augalinė medžiaga pirmiausia turi būti išdžiovinta, susmulkinta iki smulkios masės ir tinkamai persijota. Tada paruoštas mėginys sumaišomas su atitinkamu ekstrahavimo tirpikliu ir įdedamas į ultragarsinį ekstrahatorių (114,116). Didelė garso energija pagreitina ekstrakcijos procesą, nes sumažėja šilumos poreikis.

Natūralūs produktai, kuriuos paprastai reikia ekstrahuoti kelias valandas ar dienas, taikant klasikinius kietojo ir skystojo būvio ekstrakcijos metodus, gali būti sėkmingai ekstrahuojami naudojant ultragarsą per kelias minutes (123). Pagrindiniai privalumai taikant ultragarsinį ekstrahavimo metodą yra trumpas ekstrakcijos laikas, galima taikyti mažiems mėginiams, sumažinamas naudojamo tirpiklio kiekis bei padidinama išeiga (115).

### **1.11.2. Ekstrakcija mikrobangomis**

Tai vienas iš pažangiausių ekstrahavimo būdų vaistiniams augalams tirti. Taikant šį metodą naudojamas dipolio sukimosi ir jonų pernašos mechanizmas, kai tirpiklyje ir vaistinėje žaliavoje esantys įkrauti jonai pasislenka (115). Ekstrakcija mikrobangomis pagrįsta ląstelių struktūros suardymu arba pokyčiais, kai mėginio matricą veikia nejonizuojančios elektromagnetinės bangos, kurių dažniai svyruoja nuo 300 MHz iki 300 GHz (124). Kai naudojamas polinis tirpiklis, vyksta dipolinis sukimasis ir jonų migracija, padidėja tirpiklio skverbtis ir palengvėja ekstrakcijos procesas. Tačiau kai naudojamas nepolinis tirpiklis, išsiskirianti mikrobangų spinduliuotė išskiria tik nedidelę šilumą, todėl šis metodas nėra palankus nepolinių tirpiklių naudojimui. Šis metodas tinka tik fenoliniams junginiams ir flavonoidams. Tokie junginiai, kaip taninai ir antocianinai, gali būti suardyti dėl aukštos temperatūros (114).

### **1.11.3. Superkritinių skysčių ekstrakcija**

Ekstrakcija superkritiniu skysčiu, kur dažniausiai naudojamas tirpiklis yra anglies dioksidas (CO<sub>2</sub>) (125), turi keletą privalumų, palyginti su įprastiniais ekstrakcijos metodais, nes naudojami superkritiniai tirpikliai, pasižymintys skirtingomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis, pavyzdžiui, tankiu, skvarbumu, klampumu ir dielektrine konstanta. Dėl mažos klampos ir santykinai didelio sklaidos koeficiento superkritiniai skysčiai pasižymi geresnėmis transportinėmis savybėmis nei skysčiai, lengvai difunduoja per kietąsias medžiagas ir todėl gali užtikrinti didesnę ekstrakcijos greitį. Viena iš pagrindinių superkritinio skysčio savybių - galimybė keisti skysčio tankį keičiant jo slėgį ir (arba) temperatūrą. Kadangi tankis susijęs su tirpumu, keičiant ekstrahavimo slėgį, galima keisti superkritinio tirpiklio stiprumą (39).

### **1.11.4. Ekstrakcija suslėgtu skysčiu**

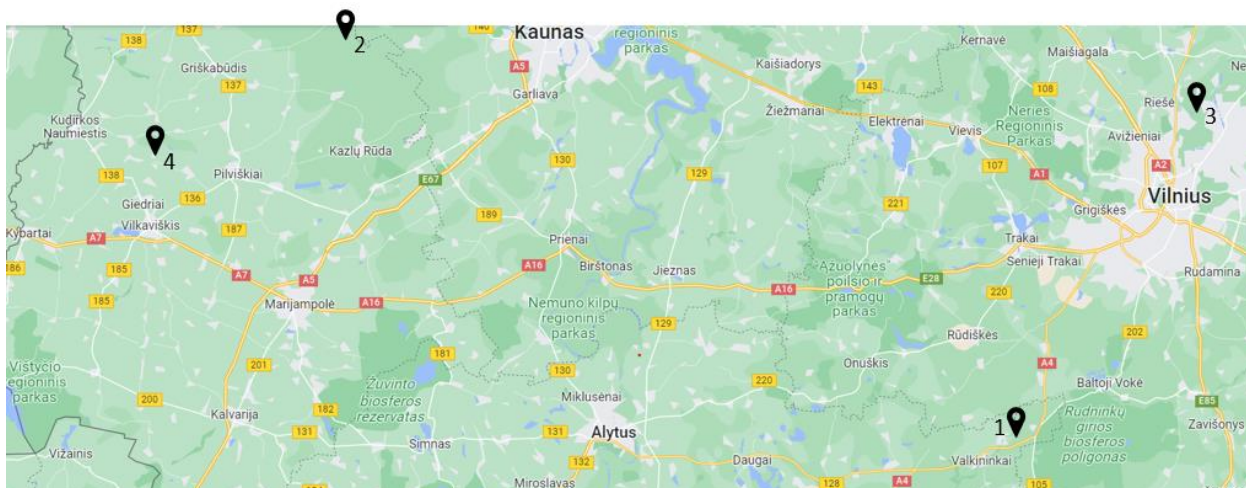
Kitas alternatyvus metodas, naudojamas biologiškai aktyviems junginiams išgauti iš augalinių žaliavų, yra ekstrakcija suslėgtuoju skysčiu, be kita ko, dar vadinama pagreitinta ekstrakcija tirpikliais. Ekstrakcija suslėgtuoju skysčiu turi tam tikrų privalumų, pavyzdžiui, greitesnis ekstrakcijos laikas, mažesnės tirpiklio sąnaudos ir tikslus veikimo parametru reguliavimas (126). Ekstrakcija suslėgtuoju skysčiu gali vykti aukštesnėje temperatūroje (aukštesnėje nei tirpiklio virimo temperatūra), nes tirpiklis yra suslėgtas, o tai leidžia išlaikyti tirpiklį skystoje būsenoje. Tokia savybė pagerina tirpiklio savybes ir padidina siekiamų junginių

adsorbiciją bei tirpumą (127). Renkantis tirpiklį, pirmenybė teikiama saugiems tirpikliams, tokiems kaip: etanolis, etilacetatas, etilo laktatas arba d-limonenas, tačiau ekologiškiausia yra naudoti vandenį. Kai vanduo naudojamas kaip ekstrahavimo tirpiklis, šis metodas paprastai vadinamas ekstrakcija karštuoju vandeniu (angl. pressurized hot-water extraction) (128).

## 2. TYRIMO METODIKA

### 2.1. Tyrimo objektas

Tyrime naudojami Ericaceae ir Rosaceae šeimoms priklausantys augalai buvo renkami skirtingose Lietuvos vietovėse (11 pav.). Iš abiejų šeimų buvo pasirinkta po 4 skirtingas augalų rūšis. Bruknė, mėlynė, miltinė meškauogė bei šilinis viržis – tai erikinių šeimai priklausantys augalai, o vaistinė dirvuolė, paprastoji rasakila, paprastoji žemuogė ir žąsinė sidabražolė – erškėtinių šeimos vaistiniai augalai. Miltinės meškauogės bei šilinio viržio augalinė žaliava buvo surinkti 2021-08-20 Valkininkų seniūnijos augavietėje (Varėnos rajono sav.; augavietė Nr. 1). Bruknės, mėlynės ir paprastosios žemuogės žaliava buvo surinkta 2022-05-28 Braziūkų girininkijoje (Kazlų rūdos savivaldybė; augavietė Nr. 2). Paprastosios rasakilos augalinė žaliava buvo surinkta 2022-06-13 Verkių regioniniame parke (Vilnius; augavietė Nr. 3). Tą pačią dieną Bobių kaime (Vilkaviškio rajonas; augavietė Nr. 4) taip pat buvo surinkta žąsinės sidabražolės vaistinė žaliava. Vaistinės dirvuolės augalinė žaliava surinkta 2022-07-18 Gamtos tyrimų centro lauko bandymų stoties vaistinių ir aromatinių augalų kolekcijoje (Vilnius; augavietė Nr.3). Visi surinkti augalai buvo džiovinami atskirai kambario temperatūroje, uždaroje, gerai vėdinamoje patalpoje be tiesioginių saulės spindulių.



11 pav. Naudojamų augalų augaviečių lokacijos Lietuvos teritorijoje

### 2.2. Naudota aparatūra bei reagentai

1. Laboratorinės svarstyklės („Axis AD50“, Lenkija);
2. Analitinės svarstyklės („Axis AD50“, Lenkija);
3. Elektrinis smulkintuvas-malūnas („Retsch GM 200“, Vokietija)
4. Džiovinimo spinta („Memmert UN55“, Vokietija);
5. Ultragarsinė vonelė („Bandelin Sonorex“, Vokietija)

6. Spektrofotometras („Biochrom libra S32 PC“, Jungtinė Karalystė)
7. Centrifuga („Ependorf 5430R“, Vokietija)
8. Automatinės pipetės („Eppendorf Research“, Vokietija)
9. Kaitinimo krosnelė
10. Šaldytuvas-šaldiklis
11. Natrio karbonatas („Sigma-Aldrich“, Vokietija)
12. Folin-Ciocalteu reagentas („Sigma-Aldrich“, Šveicarija)
13. Netirpus polivilpirolidonas (PVPP) („Sigma-Aldrich“, Kinija)
14. Tanino rūgštis („Sigma-Aldrich“, Kinija)
15. Distiliuotas vanduo

### **2.3. Tyrimo metodas**

Atliekant tyrimą buvo remtasi metodika, aprašyta „Quantification of Tannins in Tree Foliage“ (2000) laboratorijos vadove, darant tam tikrus pakeitimus (35).

#### **2.3.1. Ekstraktų paruošimas**

Ekstraktų ruošimui buvo naudojami augalų lapai (tik šilinio viržio buvo naudojami lapai su žiedais drauge), kurie buvo susmulkinti elektriniu smulkintuvu-malūnu bei persijoti per 2 mm ir 0,5 mm akučių dydžio sietelius. Kiekvieno augalo ištyrimui buvo atsverta po 0,4 g augalinės žaliavos bei paruošta po 3 mėginius.

Augalų vandeniniai ekstraktai buvo paruošiami trimis skirtingais būdais:

- 1) augalinė žaliava buvo užpilama kambario temperatūros distiliuotu vandeniu ir laikoma ultragarsinėje vonelėje 20 min.;
- 2) augalinė žaliava užpilama verdančiu vandeniu bei laikoma 20 min.;
- 3) augalinė žaliava užpilama kambario temperatūros distiliuotu vandeniu ir laikoma tamsoje 24 valandas.

Po ekstrakcijos kolbučių turinys perkeliamas į centrifuginius mėgintuvėlius ir 10 min 3000 g 4°C centrifuguojamas. Gautas supernatantas atsargiai, jog nesusidrumstų, nupilamas į stiklinį mėgintuvėlį ir laikomas šaldytuve 15 min.

#### **2.3.2. Drėgmės kiekio ir sausosios medžiagos kiekio nustatymas augalinėje žaliavoje terminio džiovinimo būdu**

Drėgmės kiekio nustatymui orasausiai augalų lapai (šilinio viržio lapai ir žiedai) buvo susmulkinti elektriniu smulkintuvu-malūnu. Kiekvieno tiriamo augalo buvo ruošiami 3 mėginiai, kiekvienam atsisveriant po 2 g susmulkintos homogeninės masės.



Kiekvienam objektui ištirti buvo paimti 3 biuksai, kurių kiekvienas kartu su dangteliu buvo sunumeruoti (t. y. ant biukso kaklelio iš vidinės pusės ir ant jam skirto dangtelio kaklelio išorinės pusės buvo užrašomas tas pats skaičius). Taip paruošti atidengti biuksai buvo džiovinti džiovinimo spintoje 1 val. 104 °C temperatūroje. Biuksų dangteliai džiovinimo metu buvo padėti šalia, jog visi paviršiai džiuūtų vienodai. Biuksams išdžiūvus, jie uždengti su tuo pačiu numeriu paženklinutu dangteliu bei sudėti į eksikatorių, jog atvėstų. Kiekvienas atšalęs biuksas su uždėtu dangteliu pasvertas 1 mg tikslumu (Wb). Į ant svarstyklių padėtą atidengtą biuksą buvo supiltas paruoštas augalinės žaliavos mėginys, kuris taip pat pasvertas 1 mg tikslumu (W1). Tokiu būdu paruošti visi 3 mėginiai uždengti ir iš karto gražinti į eksikatorių. Paruošti biuksai su analizuojama žaliava sudėti į džiovinimo spintą, dangteliai nuimti bei padėti šalia ir kaitinti 4 val. 104 °C temperatūroje. Praėjus džiovinimo laikui, biuksai uždengti bei sudėti į eksikatorių, jog atauštų iki kambario temperatūros. Biuksams atvėsus, kiekvienas neatidengtas mėginys pasvertas 1 mg tikslumu (W2). Drėgmės kiekis buvo apskaičiuotas procentais, remiantis formule:

$$W = \frac{W1 - (W2 - Wb)}{W1} \times 100\%,$$

kur W – analizuojamos augalinės žaliavos drėgmė (%), W1 – analizuojamos augalinės žaliavos mėginio masė prieš džiovinimą (g), W2 – ataušusio uždengto biukso su analizuojamu augalinės žaliavos mėginiu masė po džiovinimo (g), Wb – tuščio iškaitinto biukso su dangteliu masė (g). Aritmetinis vidurkis buvo skaičiuojamas remiantis trijų mėginių rezultatais.

Apskaičiavus drėgmės kiekį augalinėje žaliavoje, sausosios medžiagos kiekis (M) buvo skaičiuojamas remiantis formule:

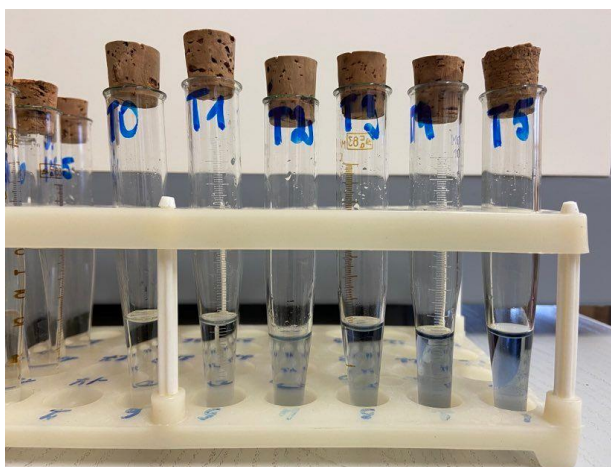
$$M (\%) = 100 \% - W,$$

kur W–analizuojamos augalinės žaliavos drėgmė (%), M–sausosios medžiagos kiekis žaliavoje (%).

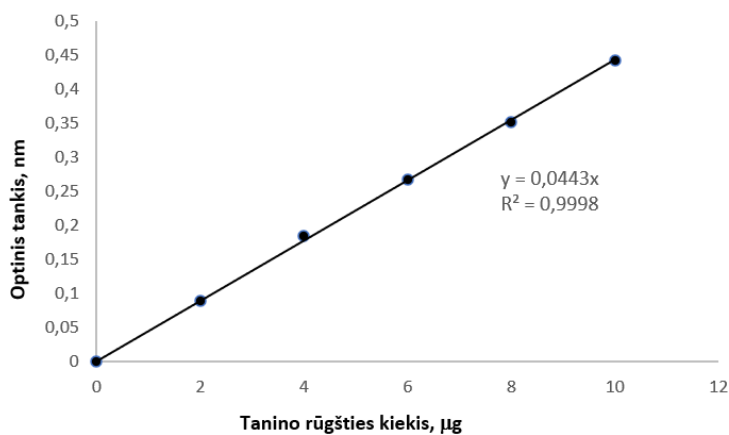
### 2.3.3. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas

Ericaceae bei Rosaceae šeimų augalų lapuose esantis bendras fenolinių junginių kiekis buvo tiriamas spektrofotometru naudojant Folin-Ciocalteu reagentą. Pradiniai gauti ekstraktai buvo skiedžiami santykiu 1:5 arba 1:10. Vėliau buvo paimama 0,02 ml praskiesto ekstrakto, supilama į atskirą laboratorinį mėgintuvėlį, iki 0,5 ml žymos įpilama distiliuoto vandens, 0,25 ml Folin-Ciocalteu reagento bei 1,25 ml natrio karbonato tirpalo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Mėgintuvėliai supurtomi, jog juose esančios medžiagos homogeniškai susimaišytų, bei paliekami 40 min

kambario temperatūroje. Lyginamasis tirpalas pagaminamas sumaišant 0,5 ml distiliuoto vandens su 0,25 ml Folin-Ciocalteu reagentu bei 1,25 ml natrio karbonato tirpalu. Kalibracinei kreivei pasiruošiami 5 žinomo tanino rūgšties kiekio (atitinkamai – 2  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 6  $\mu\text{g}$ , 8  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ ) etaloniniai tirpalai (12 pav.). Šie mėginiai su tanino rūgštimi buvo ruošiami identišškai kaip ir tiriamieji augalų ekstraktai, tačiau vietoj augalinio ekstrakto buvo naudojami skirtingi tūriai 0,1 mg/ml tanino rūgšties tirpalo. Praėjus nustatytam laikui (40 min), mėgintuvėlių turinys su analizuojamu augaliniu ekstraktu buvo tiriamas spektrofotometru 1 cm skersmens kiuvetėje prie 725 nm bangos ilgio, siekiant išmatuoti tirpalų optinį tankį (13 pav.).



**12 pav. Kalibracinės kreivės nustatymui paruošti skirtingos koncentracijos tanino rūgšties tirpalai**



**13 pav. Kalibracinė kreivė, parodanti koreliaciją tarp tanino rūgšties kiekio tirpale ir tirpalo optinio tankio**

Gautas bendras fenolinių junginių kiekis išreiškiamas tanino rūgšties ekvivalentu procentais absoliučiai sausoje augalinėje žaliavoje.

#### **2.3.4. Bendro taninų kiekio nustatymas**

Siekiant išsiaiškinti tiriamų Ericaceae bei Rosaceae šeimų augalų lapuose esantį bendrą taninų kiekį, naudojome polivinilpirolidono (PVPP) miltelius, kurių funkcija yra surišti taninus, esančius tiriamų augalų lapų ekstraktuose. Pradžioje į centrifuginius mėgintuvėlius atsisveriname po 0,1 g PVPP, kurį užpilame 1 ml distiliuotu vandeniu bei 1 ml praskiestu 1:5 arba 1:10 augaliniu ekstraktu. Mėgintuvėliai supurtomi bei laikomi 15 min 4°C temperatūroje (šaldytuve), kurie vėliau 10 min cINTRIFUGuojami 4°C temperatūroje 3000 g jėga. Centrifugavimo metu augaliniame ekstrakte esantys taninai susijungia su PVPP ir nusėda mėgintuvėlio dugne, o gautame supernatante lieka tik fenoliniai junginiai. Absorbcijos matavimui pasiruošiami mėginiai pilant 0,25 ml Folin-Ciocalteu reagento bei 1,25 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Mėgintuvėlių turinys sumaišomas ir paliekamas kambario temperatūroje 40 min, o vėliau spektrofotometru išmatuojama absorbcija. Rezultatai lyginami su kalibracine kreive, naudota bendro fenolinių junginių kiekio nustatymui.

Taninų kiekis yra apskaičiuojamas iš bendro fenolinių junginių kiekio atėmus supernatante nustatytą bendrą fenolinių junginių kiekį:

$x - y =$  taninų, išreikštų tanino rūgšties ekvivalentu (TRE), procentinė dalis absoliučiai sausoje augalinėje žaliavoje

$x$  – bendras fenolinių junginių kiekis;  $y$  – fenolinių junginių kiekis, likęs ekstrakte po taninų nusodinimo.

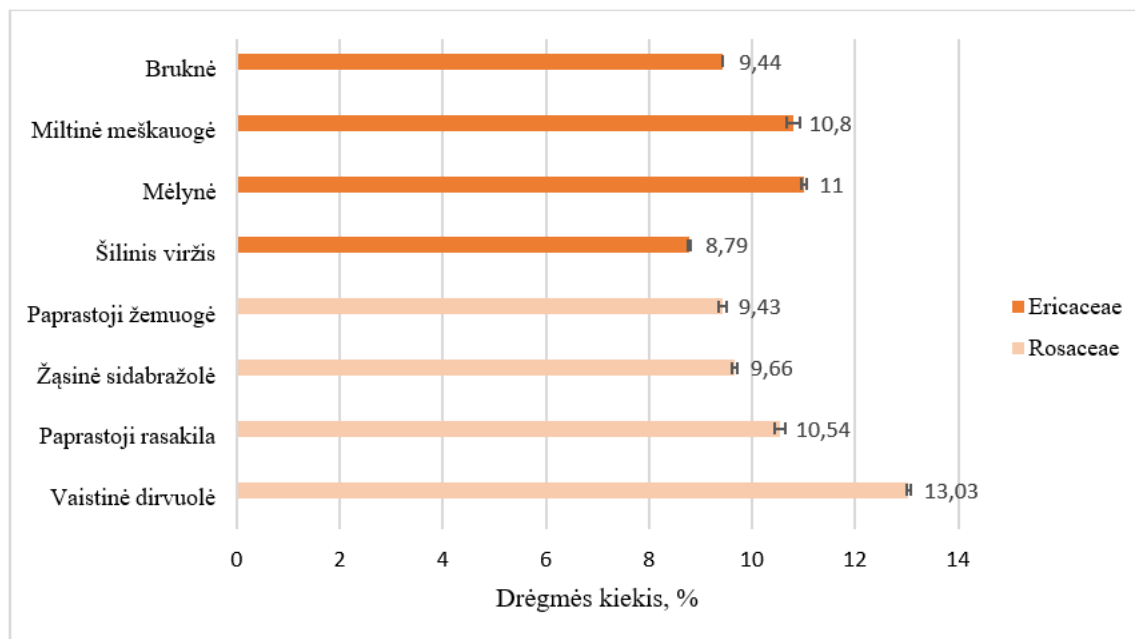
#### **2.4. Statistinis duomenų įvertinimas**

Statistinė duomenų analizė atlikta „Microsoft Office Excel 2016“ ir STATISTICA<sup>®</sup> 10 programomis. „Microsoft Office Excel 2016“ programa apskaičiuotas vidurkis ir standartiniai nuokrypiai, nubraižyti grafikai. Diagramose ir tekste fenolinių junginių ir taninų kiekių vidurkiai nurodyti su standartiniais nuokrypiais. Vienfaktorinė dispersinė analizė (One-way ANOVA), Scheffe testas buvo atlikti naudojantis STATISTICA<sup>®</sup> 10 programomis; pasirinktas reikšmingumo lygmuo  $\alpha = 0,05$ .

### 3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Drėgmės kiekis Ericaceae bei Rosaceae šeimų tirtų augalų orasausėje žaliavoje

Nustatyti drėgmės kiekiai abiejų šeimų tirtų augalų žaliavose pateikti 14 paveiksle.



14 pav. Drėgmės kiekis Ericaceae bei Rosaceae šeimų augalų lapuose

Tirtų Ericaceae šeimos augalų lapuose drėgmės kiekis vidutiniškai sudarė  $10,0 \pm 0,97$  %. Didžiausias drėgmės kiekis buvo nustatytas mėlynės lapuose – 11,0 %, o mažiausias drėgmės kiekis matomas šilinio viržio naudotame lapų bei žiedų mišinyje – 8,79 %. Tarp erikinių šeimos tirtų keturių rūšių, mėlynių ir miltinės meškaugės lapuose drėgmės kiekiai buvo labai panašūs ir skyrėsi tik 0,2 %. Rosaceae šeimos augalų lapų vidutinis drėgmės kiekis buvo kiek didesnis ir sudarė  $10,7 \pm 1,49$  %. Didžiausias drėgmės kiekis tarp Rosaceae šeimos augalų nustatytas vaistinės dirvuolės lapuose – 13,03 %, o mažiausias – paprastosios žemuogės lapuose; skirtumas tarp šių augalų buvo 3,6 %.

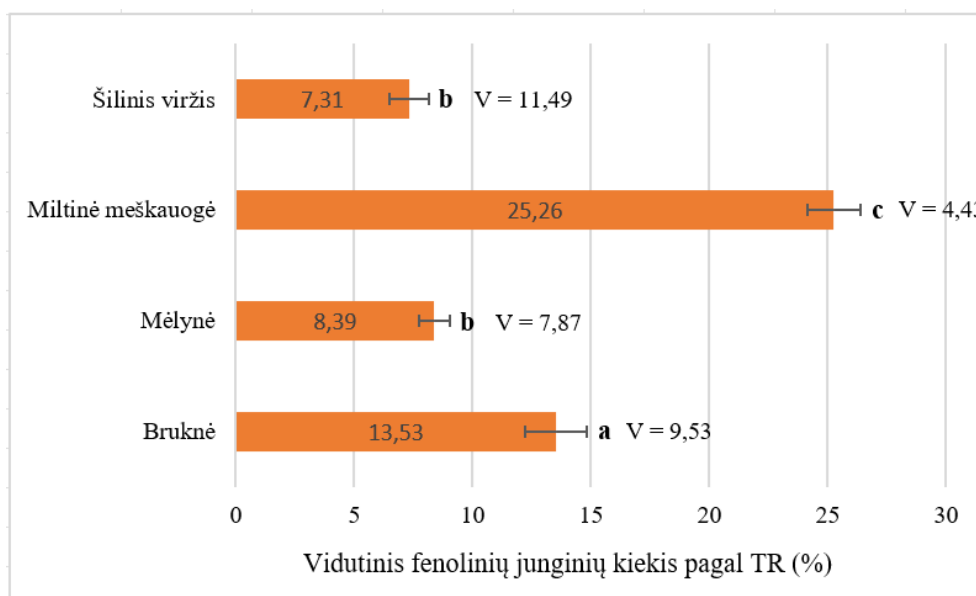
Drėgmės kiekio pasiskirstymą tarp skirtingų augalų rūšių galėjo lemti morfologiniai ar anatomiciniai lapų skirtumai. Ericaceae šeimai priklausančių augalų lapai yra mažesni, lyginant su Rosaceae šeimos augalais, ir turi mažesnę paviršiaus plotą, ko pasekoje į aplinką išgarina mažiau vandens. Taip pat Ericaceae šeimos augalų lapai yra padengti kutikuliniu vaško sluoksniu, kuris apsaugo augalo lapus nuo greito drėgmės netekimo bei padeda išlaikyti drėgmės pusiausvyrą (129). Rosaceae šeimai priklausantiems tirtų rūšių augalams buvo būdingi didelio paviršiaus ploto lapai. Atsižvelgiant į tai, jog šios šeimos augalų lapai linkę per trumpesnę laiką netekti didelio

kiekio vandens jį išgarinant, šiai šeimai priklausančių augalų lapai yra padengti plaukelių sluoksniu, kuris padeda sulaikyti drėgmę lapo viduje (130).

### 3.2. Bendro fenolinių junginių kiekio palyginimas Ericaceae bei Rosaceae šeimų tirtose rūšyse

#### 3.2.1. Bendro fenolinių junginių kiekio palyginimas rūšyse, neatsižvelgiant į ekstrakcijos vandeniu metoda

Iš 15 paveiksle pateikto bendro fenolinių junginių vidutinio kiekio Ericaceae šeimos tirtų rūšių augaluose matyti, kad didžiausias šių junginių kiekis nustatytas miltinės meškauogės lapuose. Šis kiekis miltinėje meškauogėje buvo net 3 ir 3,5 karto didesnis nei atitinkamai mėlynės lapuose ir šilinio viržio lapų bei žiedų mišinyje. Mėlynės ir šilinio viržio augalinėse žaliavose fenolinių junginių kiekiai buvo labai panašūs, mažiausi tarp tirtų erikinių šeimos rūšių, ir tirtose Ericaceae šeimos rūšyse, tik šios rūšys viena nuo kitos statistiškai patikimai nesiskyrė pagal šių junginių kiekį. Bruknės lapuose bendras fenolinių junginių kiekis buvo dvigubai mažesnis nei miltinės meškauogės lapuose, tačiau 85 % ir 61 % didesnis nei atitinkamai šilinio viržio ir mėlynės žaliavose.



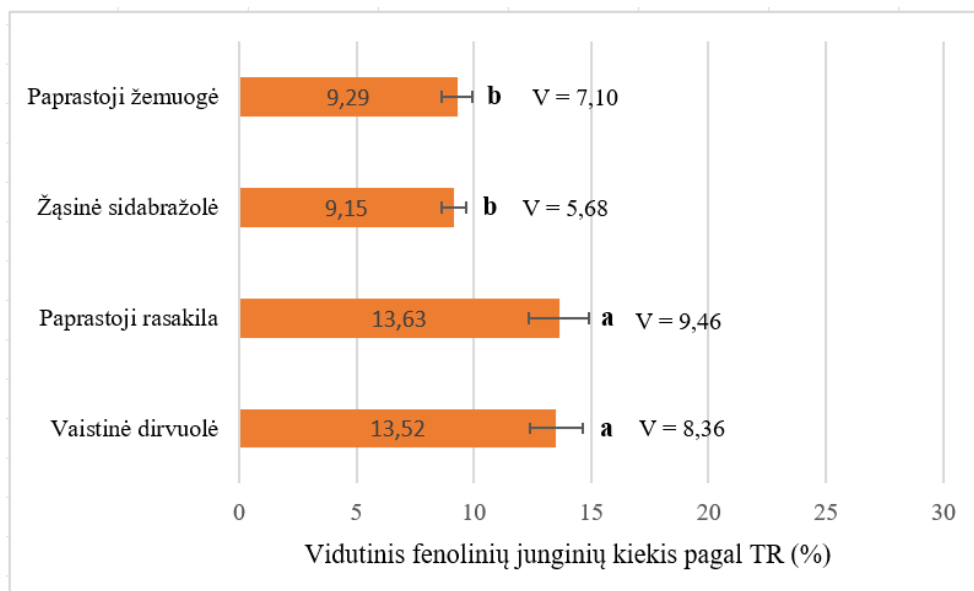
**15 pav. Bendri fenolinių junginių kiekiai Ericaceae šeimos rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrahavimo vandeniu metodo (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas, V – variacijos koeficientas; skirtingos ir panašios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ir nereikšmingus ( $p < 0,05$ ) fenolinių junginių kiekio vidurkių skirtumus tarp rūšių)**

E. Asensio ir kt. (2020 m.) atliko tyrimą, siekdami išsiaiškinti, kokie biologiniai, klimato ir/ar geografiniai veiksniai daro įtaką fenolinių junginių kiekiui miltinėse meškauogėse, natūraliai paplitusiose įvairiose augavietės Iberijos pusiasalyje. Miltinės meškauogės lapai buvo renkami 2014 m. ir 2015 m., iš kurių buvo ruošiami metanoliniai ekstraktai. Lapuose, surinktuose

2014 m., fenolinių junginių kiekis varijavo nuo  $103,3 \pm 4,8$  mg GRE/g iki  $206,4 \pm 6,5$  mg GRE/g, o surinktuose 2015 m. – nuo  $110,5 \pm 3,6$  mg GRE/g iki  $200,9 \pm 9,8$  mg GRE/g. Lyginant su mūsų tyrime gautu fenolinių junginių kiekiu miltinės meškaugės lapuose, tirpikliu naudojant vandenį, matyti, jog gautas fenolinių junginių kiekis buvo 4 – 8 kartus didesnis nei vandeniniame ekstrakto mūsų tyrimo metu. Literatūroje taip pat nurodoma, kad bendram fenolių kiekiui augaluose įtakos turi ir geografiniai bei klimato veiksniai, tokie kaip: aukštis virš jūros lygio, temperatūra ar kritulių kiekis. Miltinių meškaugių, augusių Iberijos pusiasalyje, augimo vieta buvo reikšmingas rodiklis tiriant 2015 m. rinktą žaliavą. Tačiau reikšmingų bendrojo fenolių kiekio skirtumų nepastebėta tarp 2014 m. tirtų miltinės meškaugės populiacijų, kurios buvo išsidėsčiusios palyginti nedidelėje teritorijoje, tačiau pasiskirsčiusios plačiame aukščio virš jūros lygio diapazone. Ši skirtingų aukščių įvairovė buvo susijusi su klimato sąlygų skirtumais, nes aukštesnėse vietovėse buvo būdinga žemesnė vidutinė temperatūra ir didesnis metinis kritulių kiekis (131). Bosnijoje ir Hercegovinoje augusių *C. vulgaris* lapų ir žiedų mišinyje, bendras fenolių kiekis, priklausomai nuo naudoto ekstrakto, varijavo nuo  $67,55 \pm 0,38$  mg GRE/g ekstrakto iki  $142,46 \pm 0,50$  mg GRE/g ekstrakto: vandeniniame ekstrakto buvo didžiausias fenolinių junginių kiekis, tuo tarpu etilo acetato ekstrakto – mažiausias; etanoliniame ekstrakto fenolinių junginių buvo nustatyta  $81,86 \pm 0,95$  mg GRE/g ekstrakto (42). R. Ștefănescu ir kt. (2022 m.) atliko įvairių literatūros šaltinių, kuriuose pateikti mėlynės fitocheminės sudėties tyrimų rezultatai, analizę. Joje nurodoma, kad vienas svarbiausių aspektų, lemiančių fenolinių junginių kiekį, yra tirpiklis. Optimizavus įvairius tirpiklius (80 % metanolis, 40 % etanolis, acetonas-vanduo 80:20, 70 % etanolis, vanduo, 50 % etanolis), rezultatai rodė, kad ekstrakcija 50 – 70 % etanoliumi davė didžiausią fenolinių junginių išeigą iš mėlynių. Ekstrakcija tik vandeniu parodė net 55 % mažesnius rezultatus lyginant su ekstrakcija 70 % etanoliumi (132). Todėl galime manyti, jog mūsų tyrime ekstrakcijai naudotas vanduo, nors ir yra ekologiškas tirpiklis, gali būti mažiau efektyvus, norint išgauti didžiausią fenolinių junginių kiekį iš mėlynių. Literatūroje taip pat nurodoma, kad naudojant parūgštiną vandeninį etanolio ekstraktą 70:30:1 (etanolis : vanduo : acto rūgštis), bruknių lapų 100 ml ekstrakto buvo nustatyta  $859,5 \pm 9,9$  mg fenolinių junginių, tuo tarpu mėlynių lapuose – net 4,2 karto mažiau ( $201,7 \pm 18,2$  mg/100 ml ekstrakto) (133). Mūsų tyrimo duomenimis, nors ekstrakcijai naudotas vanduo, rezultatų santykis tarp bruknės ir mėlynės lapų buvo proporcingai panašus – bruknės lapuose fenolinių junginių gauta daugiau (15 pav.).

Mažiausias bendras fenolinių junginių vidutinis kiekis tarp Rosaceae šeimos tirtų augalų rūšių nustatytas žąsinės sidabražolės žaliavoje –  $9,15 \pm 0,52$  % (16 pav.). Panašus fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas ir paprastosios žemuogės lapuose, kur jis buvo tik 0,14 % didesnis nei žąsinės sidabražolės lapuose. Scheffe testas taip pat parodė, kad fenolinių junginių vidutinis kiekis tarp šių abiejų rūšių patikimai nesiskyrė. Iš tirtų keturių Rosaceae šeimos augalų rūšių

didžiausi bendri fenolių kiekiai nustatyti paprastojoje rasakiloje ir vaistinėje dirvuolėje; šių augalų lapuose vidutiniai fenolių kiekiai statistiškai patikimai nesiskyrė, skirtumas tarp jų buvo 0,8 %. Bendras fenolinių junginių kiekis erškėtinių šeimos rūšyse, kuriose nustatyti gausiausi šių junginių kiekiai, buvo beveik 1,5 karto didesnis ir statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo fenolinių junginių kiekio rūšyse, kuriose šių junginių buvo nustatyta mažiausia (tai yra paprastosios žemuogės ir žąsinės sidabražolės).



**16 pav. Bendri fenolinių junginių kiekiai Rosaceae šeimos rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrahavimo vandeniu metodo (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas, V – variacijos koeficientas; skirtingos ir panašios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ir nereikšmingus ( $p < 0,05$ ) fenolinių junginių kiekio vidurkių skirtumus tarp rūšių)**

Rodopų kalnuose (Balkanų pusiasalis) surinktų paprastųjų žemuogių lapuose bendras fenolinių junginių kiekis, priklausomai nuo ekstrakcijos vandeniu būdo ir augalinės žaliavos surinkimo laiko, varijavo 28,2 – 129,0 mg/g ribose: didžiausi kiekiai buvo nustatyti birželio mėnesį bei vandeniniuose nuoviruose (134). S. Vlaisavljević ir kt. (2019 m.) lygino fenolinių junginių kiekio skirtumus paprastosios rasakilos žaliavoje, kuri buvo surinkta Pietų Serbijoje, naudojant 80 % metanolį, 70 % etanolį, distiliuotą vandenį bei 70 % etilacetatą. Fenolinių junginių kiekis varijavo nuo  $6,89 \pm 0,03$  mg/GRE g iki  $9,65 \pm 0,02$  mg/GRE g ekstrakto. Didžiausias fenolių kiekis paprastosios rasakilos žaliavoje buvo nustatytas naudojant etilacetato tirpalą, o mažiausias – distiliuotą vandenį (57). Šiame tyrime gautas fenolinių junginių kiekis naudojant ekstrakciją distiliuotu vandeniu buvo beveik 2 kartus mažesnis lyginant su mūsų tyrime gautu vidutiniu fenolinių junginių kiekiu nepriklausomai nuo ekstrakcijos metodo ( $13,63 \pm 1,29$  %) (16 pav.) Tokius fenolinių junginių kiekių skirtumus gali lemti augalų genetinės savybės ir/ar nevienodos klimatinės sąlygos augimo metu, dirvožemio savybės. Pasitelkiant didelio efektyvumo

skysčių chromatografijos metoda, S. Granica ir kt. (2013 m.) tyrė vaistinės dirvuolės žaliavos, rinktos Lenkijoje, fitocheminę sudėtį, pasitelkiant vandeninius ekstraktus. Pateiktais tyrimo rezultatais, fenolinių junginių kiekis žaliavoje varijavo nuo 19,61 mg GRE/g iki 220,31 mg GRE/g (135). Šių autorių duomenis lyginant su mūsų tyrimo duomenimis, galima manyti, kad naudojant didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metoda, būtų galima išgauti didesnę fenolinių junginių kiekį iš vaistinės dirvuolės žaliavos nei naudojant ekstrakcijos su verdančiu vandeniu metoda, kurio metu buvo gautas optimaliausias fenolinių junginių kiekis (18 pav.). Daniilas N. Olennikovas ir kt. (2015 m.), pasitelkdamis didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metoda su UV detektoriumi, tyrė fenolinių junginių kiekį *Potentilla anserina* susmulkintoje antžeminėje dalyje, surinktoje augalų žydėjimo laikotarpiu trijuose Sibiro regionuose. Bendras fenolių kiekis vandeniame, metanoliniame ir etanoliniame ekstraktoje buvo atitinkamai 639,27, 1123,04 ir 585,60 µg/mL (69). Remiantis šio tyrimo rezultatais, matyti, jog ekstrakcija naudojant vandenį yra antras pagal efektyvumą būdas, siekiant išgauti optimaliausią fenolinių junginių kiekį iš žąsinės sidabražolės. Mūsų atliktame tyrime žąsinės sidabražolės tirta žaliava pasižymėjo mažiausiu fenolinių junginių kiekiu, lyginant visas tirtas *Rosaceae* šeimos rūšis.

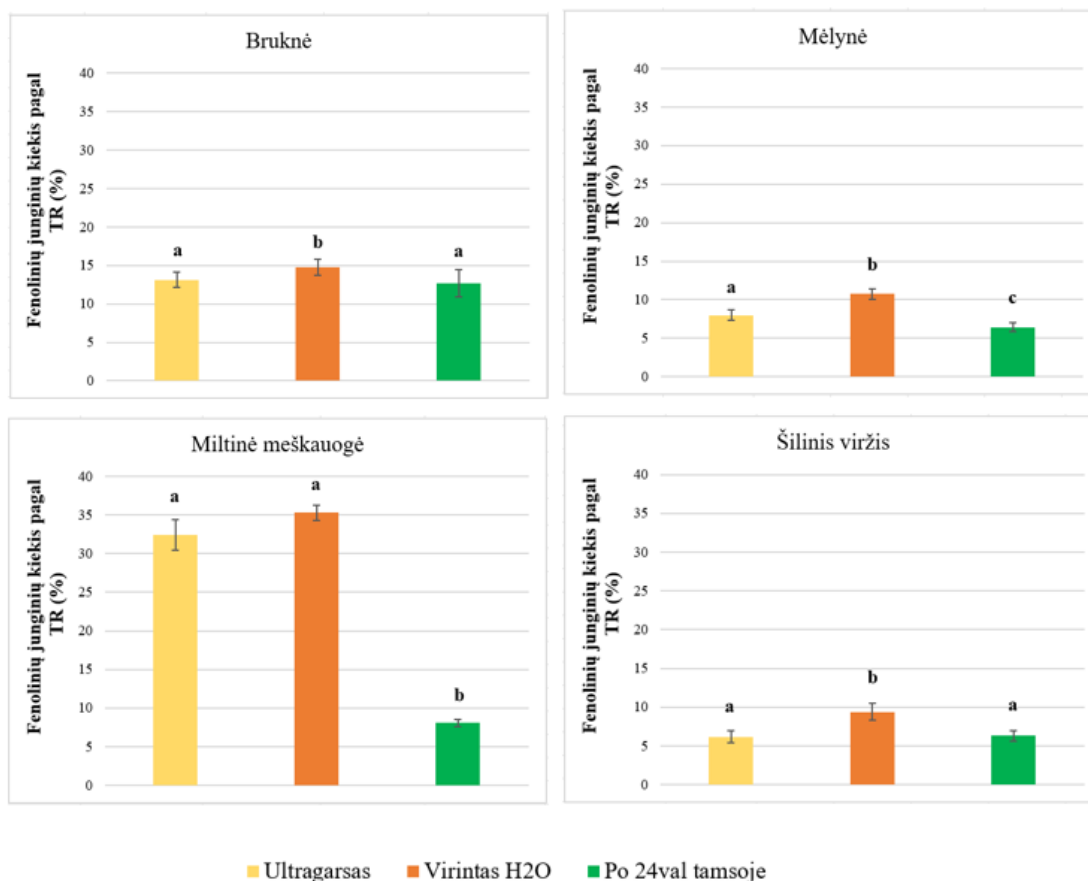
Kaip matyti iš 15 ir 16 paveiksle pateiktų standartinių nuokrypių ir variacijos koeficientų, fenolinių junginių kiekiai rūšyse varijavo. Tai galėjo nulemti būtent skirtingas ekstrakcijos vandeniu būdas, kadangi šiuose grafikuose pateikti fenolinių junginių kiekiai *Ericaceae* ir *Rosaceae* šeimų rūšyse vidurkiai, gauti panaudojus įvairius ekstrahavimo vandeniu metodus. Todėl, siekiant išgauti optimaliausią reikiamų cheminių junginių, šiuo atveju – fenolinių junginių, kiekį iš vaistinės augalinės žaliavos, būtina optimizuoti tinkamiausią ekstrakcijos metoda.

### **3.2.2. Bendro fenolinių junginių kiekio palyginimas *Ericaceae* šeimos rūšyse, naudojant skirtingus ekstrakcijos vandeniu metodus**

Vertinant rezultatus, pateiktus 17 paveiksle, matyti, jog didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis visose tirtose augalų rūšyse nustatytas ekstrahuojant karštu vandeniu. Fenolinių junginių kiekiai, nustatyti ekstrahuojant šiuo būdu, statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo šių junginių kiekio, nustatyto kitais ekstrahavimo būdais, net 3 iš 4 tirtų rūšių: bruknėje, mėlynėje ir šiliniame viržyje. Fenolinių junginių, nustatytų šiuo ekstrahavimo būdu, kiekiai tirtose *Ericaceae* šeimos rūšyse varijavo nuo  $9,41 \pm 1,05$  % iki  $35,3 \pm 0,96$  %: didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas miltinės meškauogės lapuose, o mažiausiu bendru fenolių kiekiu pasižymėjo šilinis viržis, kurio lapų ir žiedų mišinys buvo nustatyta net 3,7 karto mažiau fenolinių junginių, lyginant su miltinės meškauogės lapais. Mėlynių bei bruknių lapuose buvo nustatyti panašūs fenolinių junginių kiekiai (mėlynėse bendras fenolinių junginių kiekis buvo tik 1,37 % mažesnis



nei bruknėse), atitinkamai  $10,75 \pm 0,7 \%$  ir  $14,75 \pm 1,07 \%$ . Remiantis literatūros duomenimis kylant temperatūrai, didėja ekstrahuojamo aktyvaus junginio kiekis tiriamoje žaliavoje (136).



**17 pav. Bendrojo fenolinių junginių kiekio variavimas Ericaceae šeimos tirtų augalų žaliavoje, naudojant skirtingus ekstrahavimo vandeniu metodus (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas, V – variacijos koeficientas; skirtingos ir panašios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ir nereikšmingus ( $p < 0,05$ ) fenolinių junginių kiekio skirtumus rūšyse tarp skirtingų ekstrakcijos vandeniu metodų)**

Iš 17 paveiksle pateiktų grafikų matyti, kad mažiausias bendras fenolinių junginių kiekis tirtose augalinėse žaliavose nustatytas maceruojant distiliuotu kambario temperatūros vandeniu parą laiko tamsoje. Tačiau šiuo metodu išekstrahuoti fenolinių junginių kiekiai statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo fenolinių junginių kiekio, nustatyto ekstrahuojant kitais metodais, tik mėlynėje ir miltinėje meškauogėje. Naudojant šį ekstrakcijos būdą, mažiausias bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas mėlynės lapuose ( $6,43 \pm 0,58 \%$ ), o didžiausias ir dvigubai didesnis nei mėlynėje – bruknės lapuose ( $12,69 \pm 1,82 \%$ ). Įdomu tai, kad naudojant šį ekstrakcijos vandeniu būdą, miltinėje meškauogėje bendras fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas tik keliais procentais didesnis nei mėlynėje ir šiliniame viržyje, nors, kaip buvo aprašyta šio darbo 3.2.1 skyrelyje ir pavaizduota 15 paveiksle, miltinė meškauogė pasižymėjo didžiausiu

fenolinių junginių kiekiu tarp visų tirtų Rosaceae ir Ericaceae šeimos rūšių. Didžiausias bendro fenolinių junginių kiekio skirtumas ekstrahuojant karštu vandeniu ir maceruojant distiliuotu kambario temperatūros vandeniu nustatytas miltinėje meškauogėje: jos lapus 24 valandas maceruojant vandeniu kambario temperatūroje, fenolinių junginių nustatyta net 4 kartus mažiau nei ekstrahuojant karštu vandeniu. Scheffe testas parodė, kad fenolinių junginių kiekiai, nustatyti naudojant šiuos metodus, statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi. Tuo tarpu bruknės, mėlynės bei šilinio viržio žaliavose, jas 24 valandas maceruojant vandeliu kambario temperatūroje, fenolinių junginių kiekiai buvo nustatyti tik atitinkamai 2,06 %, 4,32 % ir 3,07 % mažesni, lyginant su bendru fenolinių junginių kiekiu, nustatytu naudojant ekstrakciją virintu vandeniu.

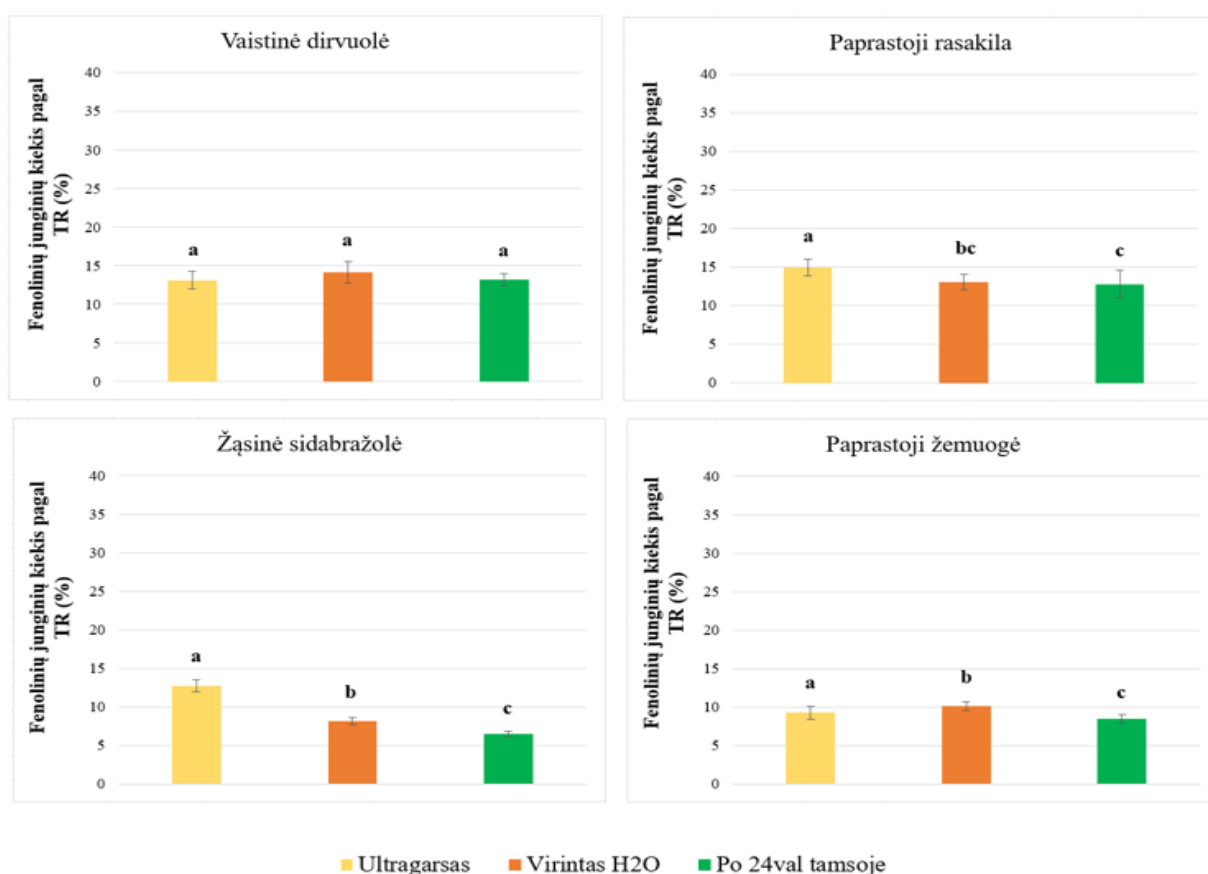
Svarbu atkreipti dėmesį, jog lyginant visus naudotus metodus, ekstrahavimas ultragarsu buvo antras pagal efektyvumą metodas, stengiantis išgauti didžiausią fenolinių junginių kiekį iš bruknės, mėlynės bei miltinės meškauogės žaliavų. Iš 17 paveiksle pateikto grafiko matyti, kad mažiausią suminį fenolių kiekį, naudojant ultragarsinį ekstrahavimo metodą, sukaupe šilinis viržis: jo lapuose ir žieduose buvo nustatyta  $6,19 \pm 0,8$  % fenolių. Net 5 kartus daugiau fenolinių junginių nei šiliniame viržyje nustatyta miltinės meškauogės lapuose –  $32,41 \pm 1,94$  %. Lyginant mėlynę ir bruknę, bendras fenolinių junginių kiekis procentiškai mažai skyrėsi – tik 5,15 % (mėlynėse bendras fenolinių junginių kiekis buvo  $8,00 \pm 0,7$  %, bruknėse  $13,15 \pm 0,97$  %).

Phu Cao-Ngoc ir kt. (2020 m.) atliko tyrimą, kurio metu skirtingais metodais vandeniu ekstrahavo juodųjų serbentų (*Ribes nigrum*) bei *Crysanthellum americanum* susmulkintus lapus. Įdomiausia tai, jog mažiausias bendras fenolinių junginių kiekis (*C. americanum* –  $12,74 \pm 0,94$  mg GRE/g, *R. nigrum* –  $42,42 \pm 1,67$  mg GRE/g) buvo nustatytas naudojant ultragarsą, kai tuo tarpu Ericaceae šeimos tirtų augalų žaliavose mažiausiai fenolių buvo nustatyta žaliavas maceruojant distiliuotu kambario temperatūros vandeniu parą laiko tamsoje. Tačiau kaip ir tirtuose Ericaceae šeimos augaluose, taip ir *R. nigrum* bei *C. americanum* didžiausias fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas ekstrahuojant karštu vandeniu, atitinkamai  $47,28 \pm 0,57$  mg GRE/g,  $17,08 \pm 0,31$  mg GRE/g. Šis tyrimas tik patvirtina, jog ekstrahavimo metodas, pasitelkiant karštą vandenį, yra efektyvus ir lengviausias būdas išgauti vandenyje tirpius komponentus (137). Chepel ir kt. (2020 m.) tyrė bei stebėjo fenolinių junginių pokyčius analizuojant įvairias šilinio viržio dalis: lapus, stiebus, šaknis, šakniastiebius, žiedus ir sėklas. Ekstrakcija buvo vykdoma su 70 % etanoliniu tirpalu ir bendras fenolinių junginių kiekis buvo nustatomas spektrofotometriškai Folin-Ciocalteu reagento pagalba. Remiantis gautais tyrimo rezultatais, žydėjimo laikotarpiu šilinio viržio lapuose buvo nustatyta  $26,88 \pm 0,11$  % fenolinių junginių (46), tai yra beveik 3 kartus daugiau nei mūsų atliktame tyrime. Svarbu paminėti, jog antrinių metabolitų, įskaitant fenolinius junginius, biosintezė ir kaupimasis augaluose priklauso

nuo daugelio veiksnių, pavyzdžiui, rūšies išskirtinumo, vegetacijos laikotarpio ir auginimo sąlygų (klimato veiksnių, aukščio virš jūros lygio ir dirvožemio savybių) (33).

### 3.2.3. Bendro fenolinių junginių kiekio palyginimas Rosaceae šeimos rūšyse, naudojant skirtingus ekstrahavimo vandeniu metodus

Atlikus Rosaceae šeimai priklausančių augalų (vaistinės dirvuolės, paprastosios rasakilos, žąsinės sidabražolės, paprastosios žemuogės) lapų ėminių biologiškai aktyvių junginių, šiuo atveju – fenolinių junginių, ekstrahavimo vandeniu tyrimus, negalima išskirti kažkokio metodo, kuris būtų vienodai efektyvus visoms tirtoms šios šeimos rūšims (18 paveikslas).



**18 pav. Bendrojo fenolinių junginių kiekio variavimas Rosaceae šeimos tirtų augalų lapuose, naudojant skirtingus ekstrahavimo vandeniu metodus (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas, V – variacijos koeficientas; skirtingos ir panašios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ir nereikšmingus ( $p < 0,05$ ) fenolinių junginių kiekio skirtumus rūšyse tarp skirtingų ekstrahavimo vandeniu metodų)**

Ekstrahavimas verdančiu vandeniu davė didžiausius rezultatus 2 iš 4 tirtų augalų rūšių – vaistinės dirvuolės lapuose fenoliniai junginiai sudarė  $14,15 \pm 1,45$  %, o paprastosios žemuogės  $10,16 \pm 0,55$  %. Optimaliausias bendras fenolinių junginių kiekis žąsinės sidabražolės ir paprastosios rasakilos lapuose buvo nustatytas naudojant ultragarsinį ekstrahavimo metodą

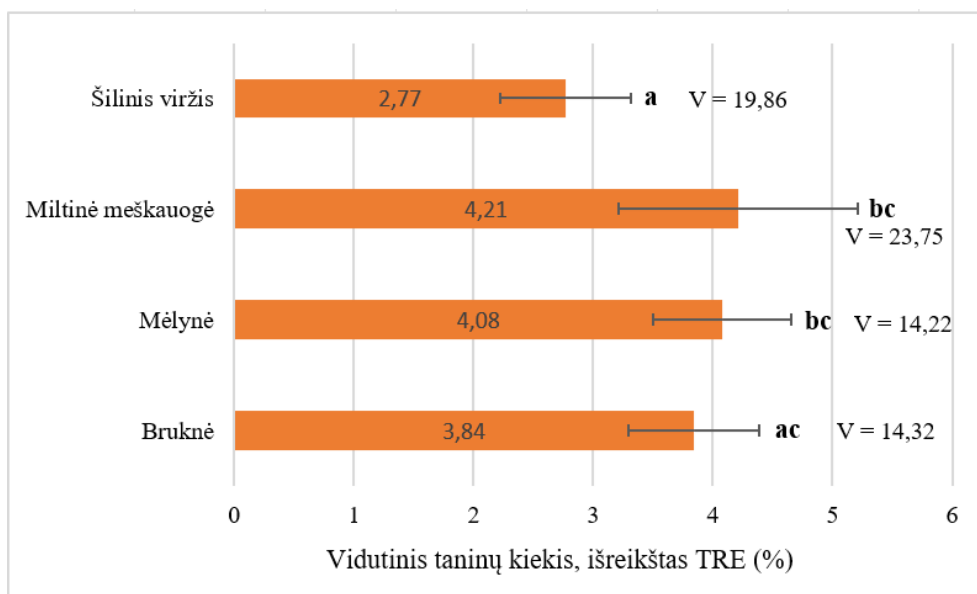
(atitinkamai  $12,77 \pm 0,79$  % ir  $15,00 \pm 1,10$  %). Mažiausias bendras fenolinių junginių kiekis, lyginant skirtingus ekstrahavimo metodus, kaip ir Ericaceae šeimos, taip ir Rosaceae šeimos tirtose rūšyse buvo gautas maceruojant distiliuotu kambario temperatūros vandeniu parą laiko tamsoje. Tik vaistinėje dirvuolėje mažiausias bendras fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas ne maceruojant, o naudojant ekstrakciją ultragarsu. I. Ivanov ir kt. (2015 m.) atliko tyrimą, kurio tikslas buvo atskleisti *Fragaria vesca* lapų, surinktų gegužės ir spalio mėnesiais įvairiose Bulgarijos vietovėse, kaupiamą fenolinių junginių kiekį naudojant skirtingus vandeninius ekstraktus: užpila, kai labai karštu vandeniu užpiltą žaliavą palikdavo pastovėti 20 min. bei nuovirą, kai karštu vandeniu užpiltą žaliavą dar pakaitindavo ir palikdavo 15min. Tyrimui buvo naudoti augalų lapai, kurie buvo smulkiai sumalti ir homogenizuoti. Didžiausias fenolinių medžiagų kiekis buvo nuovire ( $39 - 46$  mg GRE/g), po jo sekė užpilas ( $28 - 37$  mg GRE/g). Tais pačiais metais G. Ivanov ir kt. (2015 m.) atliko tyrimą, siekdami ištirti kaupiamą fenolinių junginių kiekį paprastosios žemuogės lapuose skirtingais augalo vegetacijos laikotarpiais. Tyrime buvo naudojami augalo vandeniniai ekstraktai, kurių gegužės mėnesį surinktų lapų užpiluose bei nuoviruose bendras fenolinių junginių kiekis siekė  $37,2$  mg/g ir  $39,0$  mg/g, o spalio mėnesį atitinkamai  $28,2$  mg/g ir  $39,1$  mg/g (138). Tas pats autorius 2018 m. atliko tyrimą bei nustatė, jog paprastosios žemuogės lapų, rinktų birželio mėnesį, vandeniniuose užpiluose ir nuoviruose bendras fenolinių junginių kiekis siekia  $107,5 \pm 1,2$  mg/g ir  $129,0 \pm 1,1$  mg/g (134). Lyginant visus literatūros šaltinius matyti, jog bendras žaliavos, rinktos birželio mėnesį, fenolinių junginių kiekis užpiluose bei nuoviruose yra didžiausias (atitinkamai  $2,9 - 3,8$  ir  $2,8 - 3,3$  karto) lyginant su žaliava, rinkta gegužės ar spalio mėnesiais.

### **3.3. Bendro taninų kiekio palyginimas Ericaceae bei Rosaceae šeimų tirtose rūšyse**

#### **3.3.1. Bendro taninų kiekio palyginimas rūšyse, neatsižvelgiant į ekstrakcijos vandeniu metoda**

Vertinant rezultatus, pateiktus 19 paveiksle, matyti, jog, kaip ir fenolinių junginių atveju, mažiausią vidutinį taninų kiekį sukaupė šilinis viržis, o didžiausią – miltinė meškauogė: jų tirtose žaliavose buvo nustatyta atitinkamai  $2,77 \pm 0,55$  % ir  $4,21 \pm 1,00$  % taninų. Nors taninų kiekio skirtumas tarp šių abiejų rūšių buvo gero mažesnis nei fenolinių junginių atveju (taninų miltinėje meškauogėje buvo tik pusantro karto daugiau nei šiliniame viržyje, kai tuo tarpu fenolinių junginių buvo daugiau net 3,5 karto), tačiau šis skirtumas buvo statistiškai patikimas ( $p < 0,05$ ). Tai leidžia manyti, kad taninai miltinės meškauogės lapuose sudarė nedidelę bendro fenolinių junginių kiekio dalį. Tuo tarpu literatūroje nurodoma, kad miltinės meškauogės lapuose apie 20 % visų cheminių junginių sudaro taninai (139). Tačiau reikia atkreipti dėmesį, jog taninų kiekio procentas gali varijuoti priklausomai nuo tyrimo metu naudojamo tirpiklio bei nepamiršti, jog vanduo yra silpnasis tirpiklis nei organiniai tirpikliai ir išekstrahuoja mažesnius cheminių

junginių kiekius. Vos 3 % mažiau taninų, lyginant su miltine meškauoge, sukauptė mėlynė. Iš tirtų Ericaceae šeimos atstovų, pagal vidutinį taninų kiekį, nepriklausomai nuo ekstrahavimo metodo, bruknė užėmė trečiąją vietą, nors šios rūšies lapuose sukauptų taninų kiekis buvo tik 8,7 % mažesnis, nei šia junginių grupe gausiausioje miltinėje meškauogėje. M. Maieris ir kt. (2017 m.) tirpikliu naudodami vandenį ir pasitelkę didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodą, miltinės meškauogės lapuose nustatė  $13,7 \pm 0,8$  % taninų (140). Lyginant rezultatus su mūsų tyrime gautais duomenimis, galima daryti išvadą, jog mūsų naudoti metodai nebuvo tokie efektyvūs, lyginant su didelio efektyvumo skysčių chromatografija.

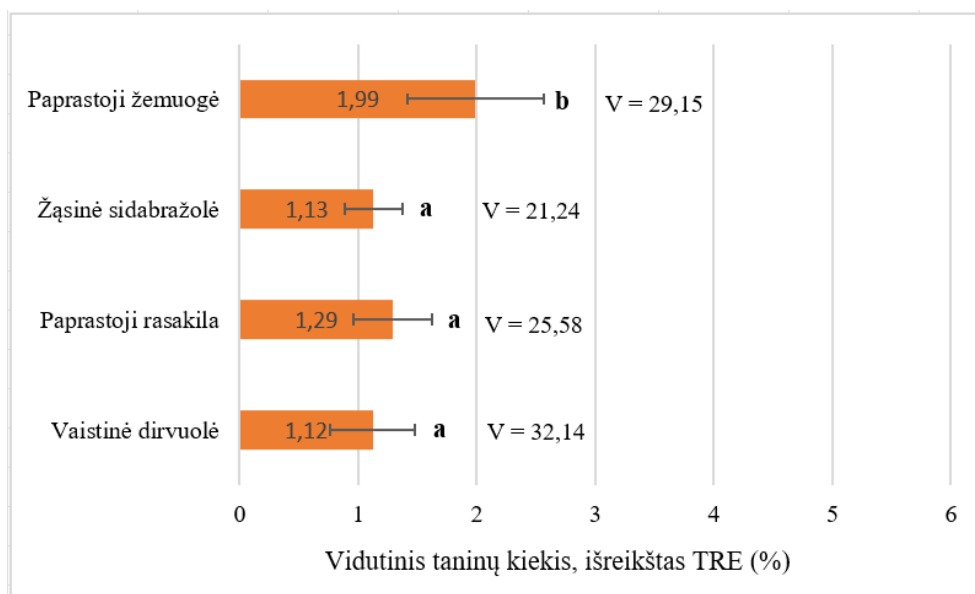


**19 pav. Bendri taninų kiekiai tirtose Ericaceae šeimos rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrahavimo vandeniu metodo (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas, V – variacijos koeficientas; skirtingos ir panašios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ir nereikšmingus ( $p < 0,05$ ) taninų kiekio vidurkių skirtumus tarp rūšių)**

G. Starchenko ir kt. (2020 m.) tirdami *Calluna vulgaris* antžemines dalis, rinktas Ukrainoje, palygino taninų kiekius, nustatytus ekstrahuojant žaliavą distiliuotu vandeniu bei 70 % etanoliu. Remiantis tyrimo rezultatais, taninų metabolitų, tokių kaip: galo rūgštis, (-) epigalokatechinas, (+)-katechinas ir (-)-epikatechinas, didesni kiekiai (atitinkamai  $0,13 \pm 0,01$  %,  $1,36 \pm 0,09$  %,  $0,21 \pm 0,03$  % ir  $0,26 \pm 0,02$  %) nustatyti etanoliniame ekstrakte, kai tuo tarpu vandeniniame ekstrakte taninų metabolitai pasiskirstė atitinkamai  $0,07 \pm 0,01$  %,  $0,21 \pm 0,01$  %,  $0,13 \pm 0,03$  % ir  $0,09 \pm 0,01$  %.

20 paveikslo diagramoje pavaizduotas vidutinis taninų kiekio (neatsižvelgiant į ekstrakcijos metodą) pasiskirstymas tarp tirtų Rosaceae šeimos rūšių. Vidutinis bendras taninų kiekis tirtose Rosaceae šeimos rūšyse varijavo nuo  $1,12 \pm 0,36$  % iki  $1,99 \pm 0,58$  % (20 pav.): didžiausias vidutinis bendras taninų kiekis nustatytas paprastosios žemuogės lapuose, o

mažiausiais šių junginių kiekiais pasižymėjo vaistinė dirvuolė ir žąsinė sidabražolė, tačiau jų lapuose buvo nustatyta tik 1,8 karto mažiau taninų, lyginant su paprastosios žemuogės lapais. Atlikus Scheffe testą nustatyta, kad taninių kiekis tik paprastojėje žemuogėje statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo taninų kiekio kitose tirtose Rosaceae šeimos rūšyse.



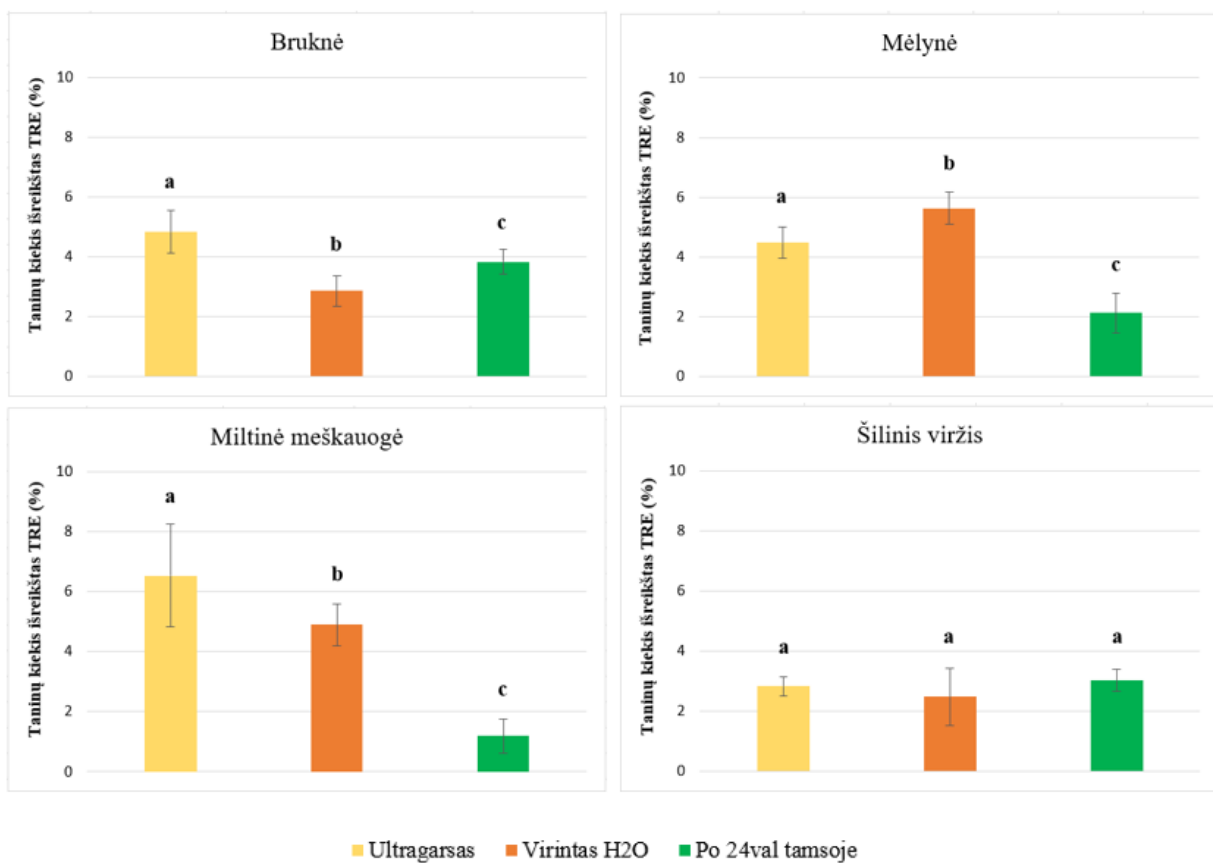
**20 pav. Bendri taninų kiekiai tirtose Rosaceae šeimos rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrahavimo vandenių metodo (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas, V – variacijos koeficientas; skirtingos ir panašios raidės atitinkamai žymi statistiškai reikšmingus ir nereikšmingus ( $p < 0,05$ ) taninų kiekio vidurkių skirtumus tarp rūšių)**

M. Tomczyk ir kt. (2019 m.) tyrė keletą *Potentilla* rūšių, siekdami išsiaiškinti elago rūgšties taninų kiekį lapuose. Tyrimo metu buvo naudotas metanolinis tirpiklis bei pasitelkta aukšto efektyvumo skysčių chromatografija. *Potentilla anserina* žaliavoje buvo nustatyta  $216,2 \pm 3,2$  mg/g elago rūgšties taninų (141). Šis rezultatas ženkliai skiriasi nuo mūsų tyrime gautų duomenų, kadangi mes tyrėme bendrą taninų kiekį, neišskiriant konkretaus vieno junginio, taip pat tirpikliu buvo pasitelktas vanduo bei naudoti kiti ekstrahavimo metodai. T. Boroja ir kt. (2018 m.) tyrė *Alchemilla vulgaris* taninų kiekį antžeminėse dalyse bei šaknyse, naudojant metanolinius ekstraktus bei pasitelkiant 72 valandų maceracijos metodą. Tyrimo metu buvo gauta  $386,70 \pm 6,82$  mg GRE/g (47).

Lyginant nustatytus vidutinius taninų kiekius Ericaceae bei Rosaceae šeimoms priklausančių rūšių tirtose žaliavose, matyti, jog Ericaceae šeimos rūšys pasižymi didesniu vidutiniu taninų kiekiu. Skirtumas tarp didžiausių kiekių abiejose šeimose (lyginant miltinę meškauogę su paprastąja žemuoge) lygus 2,22 %.

### 3.3.2. Bendro taninų kiekio palyginimas Ericaceae šeimos rūšyse, naudojant skirtingus ekstrakcijos vandeniu metodus

21 paveiksle pateikti grafikai rodo, jog nėra vieno tinkamiausio ekstrahavimo vandeniu metodo, kuris tiktų visoms tirtoms Ericaceae šeimos rūšims. Pavyzdžiui, ultragarsinis ekstrahavimo metodas buvo efektyviausias ir šiuo būdu nustatytas taninų kiekis patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo kitais metodais nustatyto taninų kiekio bruknėje ir miltinėje meškauogėje. Ekstrakcija virintu vandeniu buvo efektyviausia mėlynėje. Tuo tarpu maceracijos distiliuotu kambario temperatūros vandeniu 24 valandas tamsoje būdu daugiausia taninų buvo išskirta iš šilinio viržio, tačiau šiuo ekstrakcijos vandeniu metodu nustatytas taninų kiekis patikimai nesiskyrė nuo taninų kiekio, nustatyto kitais dviem būdais. Bendras taninų kiekis tirtuose Ericaceae rūšių augaluose, naudojant skirtingus ekstrahavimo metodus, varijavo nuo  $1,19 \pm 0,58$  % miltinėje meškauogėje, jos lapus maceruojant distiliuotu kambario temperatūros vandeniu parą laiko tamsoje, iki  $6,54 \pm 1,72$  % miltinėje meškauogėje, jos lapus ekstrahuojant ultragarsu. Tik dviem iš keturių augalų rūšių – bruknei ir miltinei meškauogei – ekstrakcija ultragarsu davė didžiausius rezultatus, atitinkamai  $4,83 \pm 0,72$  % ir  $6,54 \pm 1,72$  %. Mažiausi taninų kiekiai buvo gauti naudojant ekstrakcijos metodą verdančiu vandeniu (bruknė  $2,86 \pm 0,51$  % bei šilinis viržis  $2,47 \pm 0,96$  %) ir maceruojant distiliuotu kambario temperatūros vandeniu parą laiko tamsoje (mėlynė  $2,12 \pm 0,68$  % ir miltinė meškauogė  $1,19 \pm 0,58$  %). Remiantis literatūros duomenimis, mėlynių lapuose susikaupia didelis taninų kiekis, paprastai nuo 0,8 iki 6,7 % (142). Tai rodo, jog mūsų tyrime nustatytas taninų kiekis mėlynės žaliavoje, naudojant ekstrakciją verdančiu vandeniu, yra tinkamas pasirinkimas, siekiant išgauti optimaliausią šių junginių kiekį, kadangi rezultatas buvo lygus  $5,63 \pm 0,54$  %. Kaip ir tiriant bendrą fenolinių junginių kiekį, didžiausias bendro taninų kiekio skirtumas naudojant tris skirtingus ekstrakcijos būdus nustatytas miltinėje meškauogėje: jos lapus 24 valandas maceruojant vandeniu kambario temperatūroje, taninų nustatyta net 5,5 karto mažiau nei ekstrahuojant ultragarsu.



**21 pav. Bendrojo taninų kiekio variavimas Ericaceae šeimos tirtų augalų lapuose, naudojant skirtingus ekstrahavimo vandeniu metodus (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas, V – variacijos koeficientas; skirtingos ir panašios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ir nereikšmingus ( $p < 0,05$ ) taninų kiekio skirtumus rūšyse tarp skirtingų ekstrakcijos vandeniu metodų)**

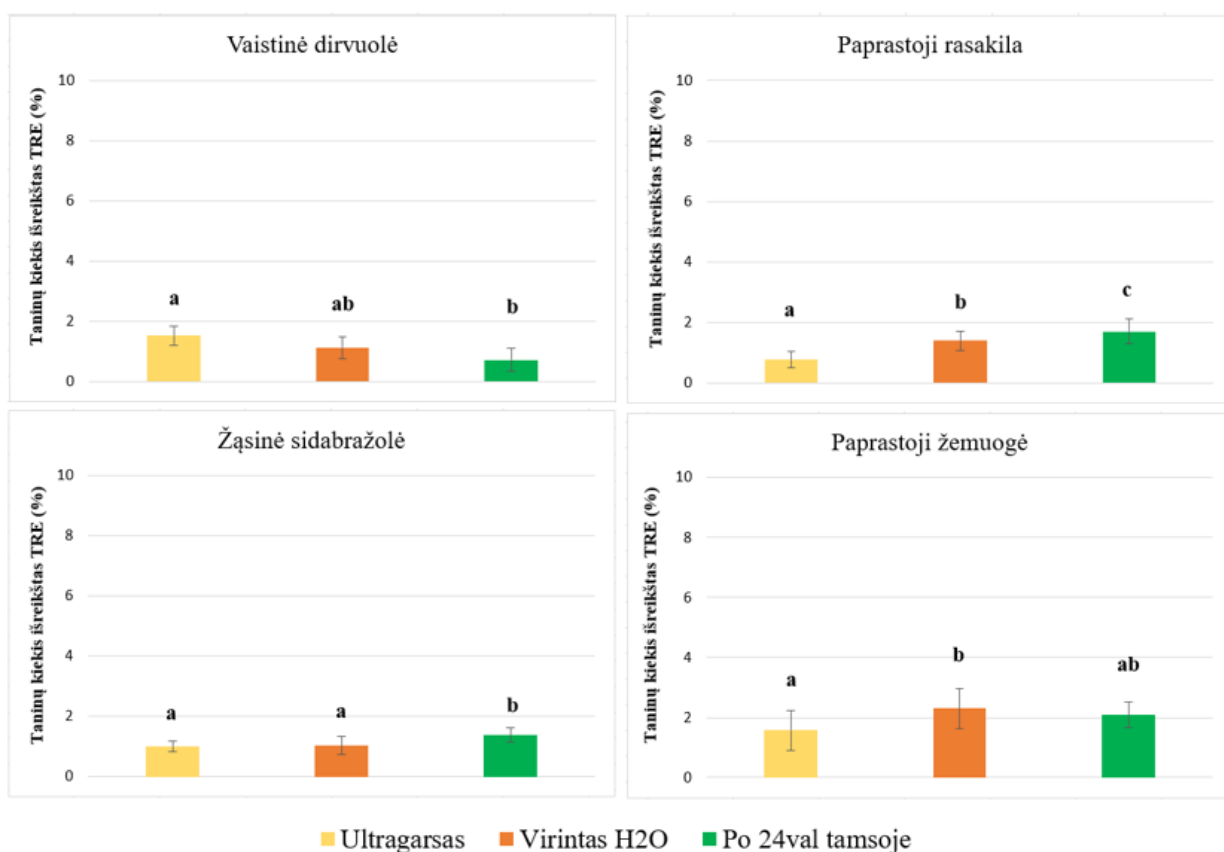
Chepel ir kt. (2020 m.) savo atliktame tyrime siekė išsiaiškinti šilinio viržio kaupiamą bendrą taninų kiekį skirtingais augimo tarpsniais. Bendras taninų kiekis buvo nustatytas Prussian Blue metodu, naudojant etanolio ir kazeino mišinį (kuris vėliau inkubuojamas 30 °C), bei pasitelkiant spektrofotometriją. Tyrimo rezultatai atskleidė, jog žydėjimo metu, šilinis viržis lapuose buvo sukaukęs  $15,79 \pm 0,11$  % taninų (143). Lyginant duomenis su mūsų tyrime gautu bendru taninų kiekiu šilinio viržio žaliavoje, svarbu atkreipti dėmesį, jog tokį didelį skirtumą galėjo lemti tokie aspektai, kaip: 1) naudojamas tirpiklis – vanduo šiuo atveju nebuvo geriausias tirpiklis norint išgauti optimaliausią taninų kiekį; 2) žaliava – literatūriniam šaltinyje buvo naudoti tik lapai, o mūsų tyrime lapų ir žiedų mišinys, iš ko galima manyti, kad žieduose esantis taninų kiekis gali būti mažesnis lyginant su lapuose esančiu taninų kiekiu. Miltinės meškaugės lapuose, surinkti Buriatijos respublikoje bei ekstrahuotuose 70 % etanolio, nustatyta 72,58 mg/g taninų (144).



Svarbu atkreipti dėmesį, jog tiek tiriant bendrą fenolinių junginių kiekį, tiek bendrą taninų kiekį Ericaceae šeimos augaluose, mažiausi rezultatai buvo stebimi naudojant maceracijos metodą distiliuotu kambario temperatūros vandeniu parą laiko tamsoje.

### 3.3.3. Bendro taninų kiekio palyginimas Rosaceae šeimos rūšyse, naudojant skirtingus ekstrakcijos vandeniu metodus

Iš 22 paveiksle pateikto grafiko galima matyti, kad tik iš paprastosios žemuogės lapų, naudojant maceraciją ir virintą vandenį, buvo išekstrahuota ne mažiau kaip 2 % taninų. Didžiausias taninų kiekis nustatytas paprastosios žemuogės lapuose, naudojant ekstrahavimą virintu vandeniu, tačiau lyginant su Ericaceae šeimoje taniniais gausiausia miltine meškauoge (21 pav.), taninų kiekis čia buvo net 2,8 karto mažesnis. Kiek mažiau taninų nei paprastojoje žemuogėje nustatyta paprastojoje rasakiloje, jos žaliavą maceruojant distiliuotu kambario temperatūros vandeniu parą laiko tamsoje, skirtumas tik 0,6 %.



22 pav. Bendrojo taninų kiekio varijavimas Rosaceae šeimos tirtų augalų lapuose, naudojant skirtingus ekstrahavimo vandeniu metodus (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas, V – variacijos koeficientas; skirtingos ir panašios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ir nereikšmingus ( $p < 0,05$ ) fenolinių junginių kiekio skirtumus tarp skirtingų ekstrakcijos vandeniu metodų)

Maceracijos metodas buvo efektyviausias ir šiuo būdu nustatytas taninų kiekis patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo taninų kiekio, nustatyto kitais dviem metodais, paprastojoje rasakiloje ir žąsinėje sidabražolėje. Vaistinėje dirvuolėje, skirtingai nuo kitų šios šeimos rūšių, efektyviausia išskiriant taninus buvo ultragarso panaudojimas, tuo tarpu maceracija buvo mažiausiai efektyvi; taninų kiekiai, šiais abiem metodais išskirti iš vaistinės dirvuolės, patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi. Kaip matome, ekstrakcija ultragarsu, priešingai nei Ericaceae šeimoje, davė mažiausius rezultatus net 3 iš 4 tirtų Rosaceae šeimos rūšių – žąsinėje sidabražolėje, paprastojoje rasakiloje ir paprastojoje žemuogėje. M. Maier ir kt. (2017 m.) atliko tyrimą, siekdami išsiaiškinti, kurie augalai yra didžiausi taninų šaltiniai, naudodami vandeninius ekstraktus. Tarp tirtų rūšių, kurių buvo net 47, buvo tirta ir *Agrimonia eupatoria* bei *Alchemilla vulgaris* žolė. Remiantis rezultatų duomenimis, gautas taninų kiekis pasiskirstė atitinkamai  $2,6 \pm 0,1$  % ir  $4,6 \pm 0,3$  %, kas rodo žymiai didesnius taninų kiekius lyginant su mūsų tyrime gautais duomenimis (140). Tokių rezultatų skirtumą galėjo lemti skirtingas taninų nustatymo metodas, kadangi M. Maier savo tyrime taninų nustatymui naudojo didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodą, kai tuo tarpu mes – spektrofotometrini. Svarbu atkreipti dėmesį ir į tai, jog literatūriniame šaltinyje naudotos žaliavos buvo įsigytos vaistažolių parduotuvėje Vienoje, todėl nėra tikslių duomenų, kokiomis sąlygomis jos augo. Angielczyk, Mirosław ir kt. (2010 m.) tyrė šiaurės rytų Lenkijos ariamų laukų pakraščiuose augančių žąsinių sidabražolių cheminę sudėtį jų metanoliniuose ekstraktuose, naudojant ultragarsinį ekstrahavimo metodą. Nustatytas bendras taninų kiekis buvo itin mažas (0,81 – 0,91 %) ir labai artimas mūsų tyrimo metu nustatytam taninų kiekiui žąsinės sidabražolės lapų vandeniniuose ekstraktuose, kai ekstrakcijai taip pat buvo panaudotas ultragarsas (73). Tad, neatsižvelgiant į skirtingas augimo sąlygas ir galimą žąsinės sidabražolės cheminį polimorfizmą, galima manyti, kad vanduo yra ne kiek ne prastesnis tirpiklis nei metanolis, norint ultragarso būdu išekstrahuoti taninus iš šios rūšies augalų, ir turi didesnę privalumą, nes yra nekenksmingas aplinkai.

## 4. IŠVADOS

1. Nepriklausomai nuo ekstrakcijos vandeniu metodo, didžiausiu bendru fenolinių junginių kiekiu išsiskyrė Ericaceae šeimos atstovė miltinė meškauogė: jos lapuose nustatyta  $25,26 \pm 1,12$  % fenolinių junginių; bruknių lapuose šių junginių buvo dvigubai mažiau nei miltinėje meškauogėje, o mėlynės lapuose bei šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje – mažiausiai iš tirtų Ericaceae rūšių (atitinkamai  $8,39 \pm 0,66$  % ir  $7,31 \pm 0,84$  %). Rosaceae šeimoje daugiausia fenolinių junginių nustatyta paprastosios rasakilos ir vaistinės dirvuolės (atitinkamai  $13,63 \pm 1,29$  % ir  $13,52 \pm 1,13$  %), mažiausiai – paprastosios žemuogės ir žąsinės sidabražolės lapuose (atitinkamai  $9,29 \pm 0,66$  % ir  $9,15 \pm 0,52$  %).
2. Nepriklausomai nuo ekstrakcijos vandeniu metodo, didžiausias taninų kiekis tarp Ericaceae šeimos atstovų nustatytas miltinėje meškauogėje, mažiausias – šiliniame viržyje (atitinkamai  $4,21 \pm 1,00$  % ir  $2,77 \pm 0,55$  %). Priešingai nei fenolinių junginių atveju, taninų kiekis mėlynės lapuose (4,08 %) buvo labai artimas taninų kiekiui miltinėje meškauogėje. Taninų kiekis Rosaceae šeimos rūšyse varijavo tik 1,12–1,99 % ribose, ir didžiausias jų kiekis nustatytas paprastosios žemuogės lapuose.
3. Ekstrakcija karštu vandeniu buvo efektyviausias būdas išskirti fenolinius junginius iš Ericaceae rūšių augalų; maceracija kambario temperatūros vandeniu parą tamsoje buvo mažiausiai efektyvus būdas, ypač miltinei meškauogei: jos lapus maceruojant vandeniu, šių junginių nustatyta net 4 kartus mažiau nei ekstrahuojant karštu vandeniu. Tuo tarpu nebuvo vieno taninų ekstrahavimo vandeniu metodo, kuris tiktų visoms šios šeimos rūšims: ekstrakcija ultragarsu buvo efektyviausia miltinei meškauogei ir bruknei (taninų kiekis buvo atitinkamai  $6,54 \pm 1,72$  % ir  $4,83 \pm 0,72$  %), ekstrakcija virintu vandeniu – mėlynei ( $5,63 \pm 0,54$  %); iš šilinio viržio daugiausiai taninų buvo išskirta maceruojant, nors šiuo metodu nustatytas taninų kiekis patikimai nesiskyrė nuo taninų kiekio, nustatyto kitais dviem būdais.
4. Nebuvo vieno efektyvaus fenolinių junginių ekstrahavimo vandeniu metodo Rosaceae šeimos rūšims: ekstrakcija verdančiu vandeniu buvo efektyviausia ekstrahuojant vaistinės dirvuolės ir paprastosios žemuogės (fenolinių junginių kiekis atitinkamai  $14,15 \pm 1,45$  % ir  $10,16 \pm 0,55$  %), ekstrakcija ultragarsu – žąsinės sidabražolės ir paprastosios rasakilos lapus (atitinkamai  $12,77 \pm 0,79$  % ir  $15,00 \pm 1,10$  %). Maceracija kambario temperatūros vandeniu parą tamsoje buvo mažiausiai efektyvi visoms šios šeimos rūšims, tik iš vaistinės dirvuolės lapų mažiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas naudojant ekstrakciją ultragarsu. Išskiriant taninus iš Rosaceae rūšių augalų labiausiai efektyvus buvo maceracijos kambario temperatūros vandeniu parą tamsoje metodas, išskyrus vaistinę dirvuolę, kuriai šis metodas buvo tinkamas mažiausiai.

## 5. REKOMENDACIJOS

Vanduo, kaip saugus, pigus ir lengvai prieinamas tirpiklis, gali būti naudojamas fenoliniams junginiams iš miltinės meškauogės išskirti, ypač naudojant ekstrakciją verdančiu vandeniu bei ekstrahuojant ultragarsu. Kadangi vanduo nebuvo efektyvus tirpiklis išskirti taninus tiek iš Ericaceae, tiek iš Rosaceae rūšių augalų, siekiant išskirti didesnius taninų kiekius, rekomenduotina naudoti organinius tirpiklius, kad gauti optimalesnius rezultatus, kurie galėtų pasitarnauti farmacijos pramonėje. Taip pat būtų įdomu atlikti kokybinį fenolinių junginių ir taninų tyrimą su tyrime naudotais augalais.

## 6. LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Hassanpour S, Maheri-Sis N, Eshratkhah B, baghbani mehmandar F. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *Int J Forest, Soil and Erosion*. 2011 Jan 1;1:47–53.
2. Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, et al. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules*. 2016 Oct 15;21(10):1374.
3. Ștefănescu BE, Szabo K, Mocan A, Crișan G. Phenolic Compounds from Five Ericaceae Species Leaves and Their Related Bioavailability and Health Benefits. *Molecules*. 2019 May 29;24(11):2046.
4. Nardini M. Phenolic Compounds in Food: Characterization and Health Benefits. *Molecules*. 2022 Jan 25;27(3):783.
5. Jing W, Xiaolan C, Yu C, Feng Q, Haifeng Y. Pharmacological effects and mechanisms of tannic acid. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Oct 1;154:113561.
6. Vasco C, Riihinen K, Ruales J, Kamal-Eldin A. Phenolic Compounds in Rosaceae Fruits from Ecuador. *J Agric Food Chem*. 2009 Feb 25;57(4):1204–12.
7. European Pharmacopoeia Online [Internet]. [cited 2023 May 10]. Available from: <https://pheur.edqm.eu/home>
8. Butkus V., Galinis V., Jankevičienė R., Kizienė B., Lazdauskaitė Ž., Lekavičius A., et al. Lietuvos TSR flora. Vol. V. Vilnius: Mokslas; 1976.
9. McGill CM, Tomco PL, Ondrasik RM, Belknap KC, Dwyer GK, Quinlan DJ, et al. Therapeutic Effect of Northern Labrador Tea Extracts for Acute Myeloid Leukemia. *Phytother Res*. 2018 Aug;32(8):1636–41.
10. Flórez N, Conde E, Domínguez H. Microwave assisted water extraction of plant compounds. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2015;90(4):590–607.
11. Chuo SC, Nasir HM, Mohd-Setapar SH, Mohamed SF, Ahmad A, Wani WA, et al. A Glimpse into the Extraction Methods of Active Compounds from Plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2022 May 19;52(4):667–96.

12. Kowalska K. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Fruit as a Source of Bioactive Compounds with Health-Promoting Effects—A Review. *Int J Mol Sci.* 2021 May 12;22(10):5126.
13. Vilkickyte G, Motiekaityte V, Vainoriene R, Raudone L. Promising cultivars and intraspecific taxa of lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea* L.): Profiling of phenolics and triterpenoids. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2022 Dec 1;114:104796.
14. Szakiel A, Pączkowski C, Koivuniemi H, Huttunen S. Comparison of the Triterpenoid Content of Berries and Leaves of Lingonberry *Vaccinium vitis-idaea* from Finland and Poland. *J Agric Food Chem.* 2012 May 16;60(19):4994–5002.
15. Ek S, Kartimo H, Mattila S, Tolonen A. Characterization of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*). *J Agric Food Chem.* 2006 Dec 1;54(26):9834–42.
16. Drózdź P, Šežienė V, Wójcik J, Pyrżyńska K. Evaluation of Bioactive Compounds, Minerals and Antioxidant Activity of Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Fruits. *Molecules.* 2018 Jan;23(1):53.
17. *Vaccinium vitis-idaea* L. Fruits: Chromatographic Analysis of Seasonal and Geographical Variation in Bioactive Compounds - PMC [Internet]. [cited 2023 Apr 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8535033/>
18. Grace MH, Esposito D, Dunlap KL, Lila MA. Comparative Analysis of Phenolic Content and Profile, Antioxidant Capacity, and Anti-inflammatory Bioactivity in Wild Alaskan and Commercial *Vaccinium* Berries. *J Agric Food Chem.* 2014 May 7;62(18):4007–17.
19. Drózdź P, Šežienė V, Pyrżyńska K. Phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Extracts from Wild Blueberries and Lingonberries. *Plant Foods Hum Nutr.* 2017 Dec 1;72(4):360–4.
20. Kylli P, Nohynek L, Puupponen-Pimiä R, Westerlund-Wikström B, Leppänen T, Welling J, et al. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) and European Cranberry (*Vaccinium microcarpon*) Proanthocyanidins: Isolation, Identification, and Bioactivities. *J Agric Food Chem.* 2011 Apr 13;59(7):3373–84.
21. Kowalska K, Olejnik A, Zielińska-Wasielica J, Olkowicz M. Inhibitory effects of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) fruit extract on obesity-induced inflammation in 3T3-L1

- adipocytes and RAW 264.7 macrophages. *Journal of Functional Foods*. 2019 Mar 1;54:371–80.
22. McDougall GJ, Ross HA, Ikeji M, Stewart D. Berry Extracts Exert Different Antiproliferative Effects against Cervical and Colon Cancer Cells Grown in Vitro. *J Agric Food Chem*. 2008 May 1;56(9):3016–23.
  23. Vauzour D. Dietary Polyphenols as Modulators of Brain Functions: Biological Actions and Molecular Mechanisms Underpinning Their Beneficial Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012 Jun 3;2012:e914273.
  24. WFO The World Flora Online [Internet]. [cited 2023 Apr 26]. Available from: <http://www.worldfloraonline.org/>
  25. Sharma A, Lee HJ. Anti-Inflammatory Activity of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Curr Issues Mol Biol*. 2022 Sep 30;44(10):4570–83.
  26. Vaneková Z, Rollinger JM. Bilberries: Curative and Miraculous – A Review on Bioactive Constituents and Clinical Research. *Front Pharmacol*. 2022 Jun 29;13:909914.
  27. Vrancheva R, Ivanov I, Dincheva I, Badjakov I, Pavlov A. Triterpenoids and Other Non-Polar Compounds in Leaves of Wild and Cultivated *Vaccinium* Species. *Plants (Basel)*. 2021 Jan 5;10(1):94.
  28. Bujor OC, Tanase C, Popa ME. Phenolic Antioxidants in Aerial Parts of Wild *Vaccinium* Species: Towards Pharmaceutical and Biological Properties. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Dec 16;8(12):649.
  29. Ștefănescu BE, Călinoiu LF, Ranga F, Fetea F, Mocan A, Vodnar DC, et al. Chemical Composition and Biological Activities of the Nord-West Romanian Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Leaves. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jun 5;9(6):495.
  30. Kravchenko G, Krasilnikova O, Raal A, Mazen M, Chaika N, Kireyev I, et al. *Arctostaphylos uva-ursi* L. leaves extract and its modified cysteine preparation for the management of insulin resistance: chemical analysis and bioactivity. *Nat Prod Bioprospect*. 2022 Aug 12;12(1):30.
  31. Sugier P, Sęczyk Ł, Sugier D, Krawczyk R, Wójcik M, Czarnecka J, et al. Chemical Characteristics and Antioxidant Activity of *Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng. at the Southern

- Border of the Geographical Range of the Species in Europe. *Molecules*. 2021 Dec 20;26(24):7692.
32. Kurkin VA, Ryazanova TK, Daeva ED, Kadentsev VI. Constituents of *Arctostaphylos uva-ursi* Leaves. *Chem Nat Compd*. 2018 Mar 1;54(2):278–80.
  33. Yang L, Wen KS, Ruan X, Zhao YX, Wei F, Wang Q. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*. 2018 Apr;23(4):762.
  34. Cucu AA, Baci GM, Cucu AB, Dezsi Ş, Lujerdean C, Hegeduş IC, et al. *Calluna vulgaris* as a Valuable Source of Bioactive Compounds: Exploring Its Phytochemical Profile, Biological Activities and Apitherapeutic Potential. *Plants (Basel)*. 2022 Jul 30;11(15):1993.
  35. DURSUNOĞLU B, YUCA H, GÖZCÜ S, YILMAZ B, GÜVENALP Z. Qualitative and quantitative determination of the effective components of the plants in different herbal slimming products in Turkey by HPLC. *Turkish Journal of Chemistry*. 2019 Jan 1;43(3):825–33.
  36. Fühner C, Runge M. Are Fe and P availabilities involved in determining the occurrence and distribution of *Calluna vulgaris* (L.) Hull in semi-arid grasslands on calcareous soils? *Plant Soil*. 2009 Mar 1;316(1):161–76.
  37. Stângaciu S, Mărghitaş LAI, Dezmirean DS, Bonta V, Mărgăoan R, Bobiş O. Quality Parameters Needed for Bee Products Used in Apitherapy. *BUASVMCN-ASB*. 2015 Apr 19;72(1):66–71.
  38. Mandim F, Barros L, C. Calhelha R, V. Abreu RM, Pinela J, José Alves M, et al. *Calluna vulgaris* (L.) Hull: chemical characterization, evaluation of its bioactive properties and effect on the vaginal microbiota. *Food & Function*. 2019;10(1):78–89.
  39. García-Risco MR, Vázquez E, Sheldon J, Steinmann E, Riebesehl N, Fornari T, et al. Supercritical fluid extraction of heather (*Calluna vulgaris*) and evaluation of anti-hepatitis C virus activity of the extracts. *Virus Research*. 2015 Feb 16;198:9–14.
  40. Villanueva-Bermejo D, Vázquez E, Villalva M, Santoyo S, Fornari T, Reglero G, et al. Simultaneous Supercritical Fluid Extraction of Heather (*Calluna vulgaris* L.) and Marigold (*Calendula officinalis* L.) and Anti-Inflammatory Activity of the Extracts. *Applied Sciences*. 2019 Jan;9(11):2245.



41. Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*. 2011 Apr 1;49(4):396–402.
42. Vučić DM, Petković MR, Rodić-Grabovac BB, Stefanović OD, Vasić SM, Čomić LR. In vitro activity of heather [*Calluna vulgaris* (L.) Hull] extracts on selected urinary tract pathogens. *Bosn J Basic Med Sci*. 2014 Nov;14(4):234–8.
43. Rodrigues F, Moreira T, Pinto D, Pimentel FB, Costa ASG, Nunes MA, et al. The phytochemical and bioactivity profiles of wild *Calluna vulgaris* L. flowers. *Food Research International*. 2018 Sep 1;111:724–31.
44. Starchenko G, Hrytsyk A, Raal A, Koshovyi O. Phytochemical Profile and Pharmacological Activities of Water and Hydroethanolic Dry Extracts of *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Herb. Plants (Basel)*. 2020 Jun 15;9(6):751.
45. Pavlović RD, Lakušić B, Došlov-Kokoruš Z, Kovačević N. Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009 Oct 1;64(10):656–9.
46. Chepel V, Lisun V, Skrypnik L. Changes in the Content of Some Groups of Phenolic Compounds and Biological Activity of Extracts of Various Parts of Heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) at Different Growth Stages. *Plants (Basel)*. 2020 Jul 22;9(8):926.
47. Boroja T, Mihailović V, Katanić J, Pan SP, Nikles S, Imbimbo P, et al. The biological activities of roots and aerial parts of *Alchemilla vulgaris* L. *South African Journal of Botany*. 2018 May 1;116:175–84.
48. Butkus V., Galinis V., Jankevičienė R., Kizienė B., Lazdauskaitė Ž., Lekavičius A., et al. *Lietuvos TSR flora*. Vol. VI. Vilnius: Mokslas; 1980.
49. Smolyakova IM, Andreeva VYu, Kalinkina GI, Avdeenko SN, Shchetinin PP. Development of extraction techniques and standardization methods for a common lady's mantle (*Alchemilla Vulgaris*) extract. *Pharm Chem J*. 2012 Feb 1;45(11):675–8.
50. Duckstein SM, Lotter EM, Meyer U, Lindequist U, Stintzing FC. Phenolic Constituents from *Alchemilla vulgaris* L. and *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. at Different Dates of Harvest. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2012 Dec 1;67(11–12):529–40.

51. Šavikin K, Zdunić G, Menković N, Živković J, Čujić N, Tereščenko M, et al. Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-Western Serbia, Zlatibor district. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013 Apr 19;146(3):803–10.
52. Filippova EI. Antiviral Activity of Lady's Mantle (*Alchemilla vulgaris* L.) Extracts against Orthopoxviruses. *Bull Exp Biol Med*. 2017 Jul 1;163(3):374–7.
53. Tadić V, Krgović N, Žugić A. Lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L., Rosaceae): A review of traditional uses, phytochemical profile, and biological properties. *Lekovite sirovine*. 2020;(40):66–74.
54. Atef NM, Shanab SM, Negm SI, Abbas YA. Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. *Bull Natl Res Cent*. 2019 Sep 5;43(1):144.
55. Shilova IV, Suslov NI, Samylina IA, Baeva VM, Lazareva NB, Mazin EV. Neuroprotective Properties of Common Lady's Mantle Infusion. *Pharm Chem J*. 2020 Feb 1;53(11):1059–62.
56. Møller C, Hansen SH, Cornett C. Characterisation of tannin-containing herbal drugs by HPLC. *Phytochemical Analysis*. 2009;20(3):231–9.
57. Vlaisavljević S, Jelača S, Zengin G, Mimica-Dukić N, Berežni S, Miljić M, et al. *Alchemilla vulgaris* agg. (Lady's mantle) from central Balkan: antioxidant, anticancer and enzyme inhibition properties. *RSC Advances*. 2019;9(64):37474–83.
58. Zainal-Abidin MH, Hayyan M, Hayyan A, Jayakumar NS. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2017 Aug 1;979:1–23.
59. Kovač MJ, Jokić S, Jerković I, Molnar M. Optimization of Deep Eutectic Solvent Extraction of Phenolic Acids and Tannins from *Alchemilla vulgaris* L. *Plants (Basel)*. 2022 Feb 9;11(4):474.
60. Lee KH, Rhee KH. ANTI-NOCICEPTIVE EFFECT OF AGRIMONIA EUPATORIA EXTRACT ON A CISPLATIN-INDUCED NEUROPATHIC MODEL. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2016 Aug 12;13(5):139–44.

61. Malheiros J, Simões DM, Figueirinha A, Cotrim MD, Fonseca DA. *Agrimonia eupatoria* L.: An integrative perspective on ethnomedicinal use, phenolic composition and pharmacological activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2022 Oct 5;296:115498.
62. Benvenuto M, Focaccetti C, Ciuffa S, Fazi S, Bei A, Miele MT, et al. Polyphenols affect the humoral response in cancer, infectious and allergic diseases and autoimmunity by modulating the activity of TH1 and TH2 cells. *Current Opinion in Pharmacology*. 2021 Oct 1;60:315–30.
63. Yoon SJ, Koh EJ, Kim CS, Zee OP, Kwak JH, Jeong WJ, et al. *Agrimonia eupatoria* protects against chronic ethanol-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2012 Jul 1;50(7):2335–41.
64. VASILENKO T, KOVÁČ I, SLEZÁK M, ĎURKÁČ J, PERŽELOVÁ V, ČOMA M, et al. *Agrimonia eupatoria* L. Aqueous Extract Improves Skin Wound Healing: An In Vitro Study in Fibroblasts and Keratinocytes and In Vivo Study in Rats. *In Vivo*. 2022 May 3;36(3):1236–44.
65. Huzio N, Grytsyk A, Raal A, Grytsyk L, Koshovyi O. Phytochemical and Pharmacological Research in *Agrimonia eupatoria* L. Herb Extract with Anti-Inflammatory and Hepatoprotective Properties. *Plants (Basel)*. 2022 Sep 11;11(18):2371.
66. PALUCH Z, BIRICZOVÁ L, PALLAG G, MARQUES EC, VARGOVÁ N, KMONÍČKOVÁ E. The Therapeutic Effects of *Agrimonia eupatoria* L. *Physiol Res*. 2020 Dec 1;69(Suppl 4):S555–71.
67. Malheiros J, Simões DM, Antunes PE, Figueirinha A, Cotrim MD, Fonseca DA. Vascular Effects of Polyphenols from *Agrimonia eupatoria* L. and Role of Isoquercitrin in Its Vasorelaxant Potential in Human Arteries. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 May 22;15(5):638.
68. Muruzović MŽ, Mladenović KG, Stefanović OD, Vasić SM, Čomić LR. Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activities. *J Food Drug Anal*. 24(3):539–47.
69. Olennikov DN, Kashchenko NI, Chirikova NK, Kuz'mina SS. Phenolic Profile of *Potentilla anserina* L. (Rosaceae) Herb of Siberian Origin and Development of a Rapid Method for Simultaneous Determination of Major Phenolics in *P. anserina* Pharmaceutical Products by Microcolumn RP-HPLC-UV. *Molecules*. 2014 Dec 24;20(1):224–48.

70. Mari A, Lyon D, Fragner L, Montoro P, Piacente S, Wienkoop S, et al. Phytochemical composition of *Potentilla anserina* L. analyzed by an integrative GC-MS and LC-MS metabolomics platform. *Metabolomics*. 2013;9(3):599–607.
71. Tomczyk M, Latté KP. *Potentilla*—A review of its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009 Mar 18;122(2):184–204.
72. Kovaleva AM, Abdulkafarova ER. Phenolic compounds from *Potentilla anserina*. *Chem Nat Compd*. 2011 Jul 1;47(3):446–7.
73. Angielczyk M, Baczek K, Geszprych A, Przybyl J, Weglarz Z. Chemical diversity of silverweed (*Potentilla anserina* L.) growing at the edges of arable fields. *Plant Breeding and Seed Science*. 2010;61:41.
74. Piwowarski JP, Granica S, Zwierzyńska M, Stefańska J, Schopohl P, Melzig MF, et al. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014 Aug 8;155(1):801–9.
75. Dias MI, Barros L, Sousa MJ, Oliveira MBPP, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Enhancement of nutritional and bioactive compounds by in vitro culture of wild *Fragaria vesca* L. vegetative parts. *Food Chemistry*. 2017 Nov 15;235:212–9.
76. Dias MI, Barros L, Fernandes IP, Ruphuy G, Oliveira MBPP, Santos-Buelga C, et al. A bioactive formulation based on *Fragaria vesca* L. vegetative parts: Chemical characterisation and application in  $\kappa$ -carrageenan gelatin. *Journal of Functional Foods*. 2015 Jun 1;16:243–55.
77. Couto J, Figueirinha A, Batista MT, Paranhos A, Nunes C, Gonçalves LM, et al. *Fragaria vesca* L. Extract: A Promising Cosmetic Ingredient with Antioxidant Properties. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Feb 14;9(2):154.
78. Kubota M, Hosoya T, Fukumoto S, Miyagi T, Kumazawa S. Anti-melanogenic compounds in *Rubus croceacanthus*. *JBR*. 2014 Aug 16;4(3):127–35.
79. Ortiz-Ruiz CV, Berna J, Tudela J, Varon R, Garcia-Canovas F. Action of ellagic acid on the melanin biosynthesis pathway. *Journal of Dermatological Science*. 2016 May 1;82(2):115–22.
80. Fierascu RC, Temocico G, Fierascu I, Ortan A, Babeanu NE. *Fragaria* Genus: Chemical Composition and Biological Activities. *Molecules*. 2020 Jan;25(3):498.

81. Cyboran-Mikołajczyk S, Męczarska K, Solarska-Ściuk K, Ratajczak-Wielgomas K, Oszmiański J, Jencova V, et al. Protection of Erythrocytes and Microvascular Endothelial Cells against Oxidative Damage by *Fragaria vesca* L. and *Rubus idaeus* L. Leaves Extracts—The Mechanism of Action. *Molecules*. 2022 Sep 10;27(18):5865.
82. Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Chapter 16 - Classification of Phenolic Compounds in Plants. In: Watson RR, editor. *Polyphenols in Plants (Second Edition)* [Internet]. Academic Press; 2019 [cited 2023 Apr 26]. p. 263–84. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128137680000268>
83. Vuolo MM, Lima VS, Maróstica Junior MR. Chapter 2 - Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In: Campos MRS, editor. *Bioactive Compounds* [Internet]. Woodhead Publishing; 2019 [cited 2023 Apr 26]. p. 33–50. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128147740000025>
84. Działo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016 Feb 18;17:160.
85. Cheynier V. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochem Rev*. 2012 Jun 1;11(2):153–77.
86. Ferreira O, Pinho SP. Solubility of Flavonoids in Pure Solvents. *Ind Eng Chem Res*. 2012 May 9;51(18):6586–90.
87. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2010 Dec;2(12):1231–46.
88. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 2013 Feb;18(2):2328–75.
89. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002 Jun 1;5(3):218–23.
90. Haslam E. Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*. 2007 Nov 1;68(22):2713–21.
91. Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*. 2009 Jun;14(6):2202–11.

92. Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*. 2010 Jul 1;153(3):895–905.
93. Lattanzio V. Phenolic Compounds: Introduction. In: Ramawat KG, Mérillon JM, editors. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013 [cited 2023 Apr 26]. p. 1543–80. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_57](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57)
94. Pu F, Ren XL, Zhang XP. Phenolic compounds and antioxidant activity in fruits of six *Diospyros kaki* genotypes. *Eur Food Res Technol*. 2013 Dec 1;237(6):923–32.
95. Sales PM, Souza PM, Simeoni LA, Magalhães PO, Silveira D.  $\alpha$ -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2012 Feb 10;15(1):141–83.
96. Moo-Huchin VM, Moo-Huchin MI, Estrada-León RJ, Cuevas-Glory L, Estrada-Mota IA, Ortiz-Vázquez E, et al. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*. 2015 Jan 1;166:17–22.
97. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. *Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis*. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011;50(3):586–621.
98. Tong Z, He W, Fan X, Guo A. Biological Function of Plant Tannin and Its Application in Animal Health. *Front Vet Sci*. 2022 Jan 10;8:803657.
99. Amoako D, Awika JM. Polyphenol interaction with food carbohydrates and consequences on availability of dietary glucose. *Current Opinion in Food Science*. 2016 Apr 1;8:14–8.
100. Figueroa-Espinoza MC, Zafimahova A, Alvarado PGM, Dubreucq E, Poncet-Legrand C. Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties. *Food Chemistry*. 2015 Jul 1;178:38–44.
101. Terrill TH, Rowan AM, Douglas GB, Barry TN. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1992;58(3):321–9.

102. Jin L, Wang Y, Iwaasa AD, Xu Z, Schellenberg MP, Zhang YG, et al. Effect of condensed tannins on ruminal degradability of purple prairie clover (*Dalea purpurea* Vent.) harvested at two growth stages. *Animal Feed Science and Technology*. 2012 Sep 21;176(1):17–25.
103. Hasanvand A, Hosseinzadeh A, Saeedavi M, Goudarzi M, Basir Z, Mehrzadi S. Neuroprotective effects of tannic acid against kainic acid-induced seizures in mice. *Hum Exp Toxicol*. 2022 Jan 1;41:09603271221093989.
104. Szczurek A. Perspectives on Tannins. *Biomolecules*. 2021 Mar 16;11(3):442.
105. Lall RK, Syed DN, Adhami VM, Khan MI, Mukhtar H. Dietary Polyphenols in Prevention and Treatment of Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015 Feb;16(2):3350–76.
106. Squillaro T, Cimini A, Peluso G, Giordano A, Melone MAB. Nano-delivery systems for encapsulation of dietary polyphenols: An experimental approach for neurodegenerative diseases and brain tumors. *Biochemical Pharmacology*. 2018 Aug 1;154:303–17.
107. Türkan F, Taslimi P, Saltan FZ. Tannic acid as a natural antioxidant compound: Discovery of a potent metabolic enzyme inhibitor for a new therapeutic approach in diabetes and Alzheimer's disease. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2019;33(8):e22340.
108. Zhao W, Iyer V, P. Flores F, Donhowe E, Kong F. Microencapsulation of tannic acid for oral administration to inhibit carbohydrate digestion in the gastrointestinal tract. *Food & Function*. 2013;4(6):899–905.
109. Chao C yi, Mong M chin, Chan K chi, Yin M chin. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2010;54(3):388–95.
110. Jha AK, Sit N. Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2022 Jan 1;119:579–91.
111. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY. Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* [Internet]. 2011 [cited 2023 Apr 26];8(1). Available from: <https://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/60483>

112. Joana Gil-Chávez G, Villa JA, Fernando Ayala-Zavala J, Basilio Heredia J, Sepulveda D, Yahia EM, et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013;12(1):5–23.
113. Drosou C, Kyriakopoulou K, Bimpilas A, Tsimogiannis D, Krokida M. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*. 2015 Nov 30;75:141–9.
114. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. 2017 Dec;6(4):42.
115. Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020;12(1):1–10.
116. Pandey A, Tripathi S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug.
117. da Silva LC, Souza MC, Sumere BR, Silva LGS, da Cunha DT, Barbero GF, et al. Simultaneous extraction and separation of bioactive compounds from apple pomace using pressurized liquids coupled on-line with solid-phase extraction. *Food Chemistry*. 2020 Jul 15;318:126450.
118. da Silva LC, Viganó J, de Souza Mesquita LM, Dias ALB, de Souza MC, Sanches VL, et al. Recent advances and trends in extraction techniques to recover polyphenols compounds from apple by-products. *Food Chem X*. 2021 Sep 25;12:100133.
119. Tiwari BK. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015 Sep 1;71:100–9.
120. Marathe SJ, Jadhav SB, Bankar SB, Kumari Dubey K, Singhal RS. Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes. *Current Opinion in Food Science*. 2019 Feb 1;25:62–72.
121. Rodsamran P, Sothornvit R. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience*. 2019 Apr 1;28:66–73.



122. Pimentel-Moral S, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Arráez-Román D, Martínez-Férez A, Segura-Carretero A. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive compounds from *Hibiscus sabdariffa*. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2019 May 1;147:213–21.
123. Lavilla I, Bendicho C. Chapter 11 - Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. In: Dominguez González H, González Muñoz MJ, editors. *Water Extraction of Bioactive Compounds* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2023 Apr 26]. p. 291–316. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128093801000115>
124. Leonelli C, Veronesi P, Cravotto G. Microwave-Assisted Extraction: An Introduction to Dielectric Heating. In: Chemat F, Cravotto G, editors. *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2013 [cited 2023 Apr 26]. p. 1–14. (Food Engineering Series). Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4830-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4830-3_1)
125. Dias ALB, Arroio Sergio CS, Santos P, Barbero GF, Rezende CA, Martínez J. Effect of ultrasound on the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*). *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016 Jul 1;31:284–94.
126. Machado APDF, Pasquel-Reátegui JL, Barbero GF, Martínez J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*. 2015 Nov 1;77:675–83.
127. Mustafa A, Turner C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2011 Oct 3;703(1):8–18.
128. Alvarez-Rivera G, Bueno M, Ballesteros-Vivas D, Mendiola JA, Ibañez E. Chapter 13 - Pressurized Liquid Extraction. In: Poole CF, editor. *Liquid-Phase Extraction* [Internet]. Elsevier; 2020 [cited 2023 Apr 26]. p. 375–98. (Handbooks in Separation Science). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012816911700013X>
129. Hickey M, King C. *100 Families of Flowering Plants*. Second Edition. New York: Cambridge University Press; 1989. 160 p.
130. Aleksandravičiūtė B, Bagdonaitė A, Butkienė S, et al. *Lietuvos TSR flora*. Vol. IV. Vilnius: Mintis; 1971.

131. Asensio E, Vitales D, Pérez I, Peralba L, Viruel J, Montaner C, et al. Phenolic Compounds Content and Genetic Diversity at Population Level across the Natural Distribution Range of Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*, Ericaceae) in the Iberian Peninsula. *Plants (Basel)*. 2020 Sep 22;9(9):1250.
132. Ștefănescu R, Laczkó-Zöld E, Ósz BE, Vari CE. An Updated Systematic Review of *Vaccinium myrtillus* Leaves: Phytochemistry and Pharmacology. *Pharmaceutics*. 2022 Dec 21;15(1):16.
133. Tian Y, Puganen A, Alakomi HL, Uusitupa A, Saarela M, Yang B. Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants. *Food Research International*. 2018 Apr 1;106:291–303.
134. Ivanov IG. Determination of biologically active substances with antioxidant potential in different extracts of *Fragaria vesca* L. leaves and flowers.
135. Granica S, Krupa K, Kłębowska A, Kiss AK. Development and validation of HPLC-DAD-CAD-MS3 method for qualitative and quantitative standardization of polyphenols in *Agrimoniae eupatoriae herba* (Ph. Eur). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013 Dec 1;86:112–22.
136. Ilyia Arina MZ, Harisun Y. Effect of extraction temperatures on tannin content and antioxidant activity of *Quercus infectoria* (Manjakani). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019 May 1;19:101104.
137. Cao-Ngoc P, Leclercq L, Rossi JC, Hertzog J, Tixier AS, Chemat F, et al. Water-Based Extraction of Bioactive Principles from Blackcurrant Leaves and *Chrysanthellum americanum*: A Comparative Study. *Foods*. 2020 Oct;9(10):1478.
138. Ivanov I, Petkova N, Denev P, Pavlov A. POLYPHENOLS CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES IN INFUSION AND DECOCTION EXTRACTS OBTAINED FROM *FRAGARIA VESCA* L. LEAVES. Vol. 19, *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*. 2015.
139. *Uva ursi* (*Arctostaphylos uva-ursi*) [Internet]. [cited 2023 Apr 26]. Available from: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:XOuIQitlA6wJ:https://kevaind.org/download/Arctostaphylos%2520uva-ursi%2520for%2520kidney.pdf&cd=1&hl=lt&ct=clnk&gl=lt>

140. Maier M, Oelbermann AL, Renner M, Weidner E. Screening of European medicinal herbs on their tannin content—New potential tanning agents for the leather industry. *Industrial Crops and Products*. 2017 May 1;99:19–26.
141. Tomczyk M, Bazylko A, Staszewska A. Determination of polyphenolics in extracts of *Potentilla* species by high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method. *Phytochemical Analysis*. 2010;21(2):174–9.
142. Farmacognozie. Produce Vegetale Cu Substante Bioactive - Ursula Stanescu | PDF [Internet]. Scribd. [cited 2023 Apr 26]. Available from: <https://www.scribd.com/document/538642257/Farmacognozie-Produce-vegetale-cu-substante-bioactive-Ursula-Stanescu>
143. Gupta C, Verma R. VISUAL ESTIMATION AND SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF TANNIN CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THREE COMMON VEGETABLE. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*.
144. Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.): chemical content and pharmacological activity. | Published in *Journal of Excipients and Food Chemicals* [Internet]. [cited 2023 Apr 26]. Available from: <https://jefc.scholasticahq.com/article/28811-bearberry-arctostaphylos-uva-ursi-l-spreng-chemical-content-and-pharmacological-activity>