



VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDRA

Rūta Mačiūnaitė

Farmacinė chemija

Magistro baigiamasis darbas

VAISTINIŲ AUGALŲ EKSTRAKTŲ FITOCHEMINIAI
TYRIMAI IR ANALIZĖ DUJŲ CHROMATOGRAFIJOS-MASIŲ
SPEKTROMETRIJOS METODU

Darbo vadovai:

Vyr. m. d. dr. Asta Judžentienė

Prof.(HB) dr. Stasys Tautkus

(leidimas ginti, data, parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

Vilnius, 2020

TURINYS

ĮVADAS	4
1. Literatūros apžvalga	7
1.1 Farmakologinis biologiškai aktyvių medžiagų veikimas.....	7
1.2 Vaistinė augalinė žaliava Lietuvoje ir pasaulyje	7
1.3 Kartusis kietis (<i>Artemisia absinthium</i> L.).....	8
1.3.1 Karčiojo kiečio veikliosios medžiagos ir biologinis aktyvumas	8
1.4 Paprastasis kietis (<i>Artemisia vulgaris</i> L.)	10
1.4.1 Paprastojo kiečio veikliosios medžiagos ir biologinis aktyvumas	10
1.5 Dirvoninis kietis (<i>Artemisia campestris</i> L.).....	11
1.5.1 Dirvoninio kiečio veikliosios medžiagos	11
1.5.2 Gydomosios <i>A. campestris</i> savybės.....	12
1.6 Paprastasis kaštonas (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.)	13
1.6.1 Paprastajam kaštonui būdingos veikliosios medžiagos ir gydomasis poveikis.....	13
1.6.2 Indikacijos <i>A. hippocastanum</i> žaliavai ir iš jos gaminami preparatai	14
1.7 Smiltyninis šlamutis (<i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench)	14
1.7.1 Smiltyninio šlamučio biologiškai aktyvūs junginiai	15
1.7.2 <i>H. arenarium</i> gydomosios savybės	15
1.8 Italinis šlamutis (<i>Helichrysum italicum</i> L.)	16
1.8.1 <i>Helichrysum italicum</i> gydomosios savybės ir būdingos veikliosios medžiagos	17
2. Tyrimo metodika.....	19
2.1 Naudojama įranga	19
2.2 Medžiagos ir reagentai.....	19
2.3 Eterinių aliejų analizė	19
2.3.1 Žaliavos džiovinimas	19
2.3.2 Žaliavos paruošimas hidrodistiliacijai.....	20
2.3.3 Hidrodistiliacija	20
2.3.4 GC-MS analizės sąlygos.....	21

2.3.5	Kokybinis eterinio aliejaus junginių nustatymas.....	22
2.4	Toksiškumo testas.....	22
2.5	Antioksidacinio aktyvumo tyrimas DPPH ⁺ metodu	23
2.6	Antioksidacinių savybių nustatymas elektrocheminiu metodu	24
3.	Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	26
3.1	Žaliavos surinkimas	26
3.2	<i>Artemisia</i> genties augalų <i>absinthium</i> , <i>vulgaris</i> , <i>campestris</i> eterinių aliejų sudėties nustatymas	27
3.3	Paprastojo kaštono (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.) žiedų eterinių aliejų komponentų nustatymas	30
3.4	<i>Helichrysum</i> genties augalų <i>arenarium</i> ir <i>italicum</i> eterinių aliejų sudėties nustatymas.....	33
3.5	Toksiškumo nustatymas Italinio šlamučio eteriniams aliejams.....	36
3.6	Antioksidacinio aktyvumo tyrimai	37
3.6.1	Antioksidacinio aktyvumo tyrimas spektrofotometriniu metodu, panaudojant DPPH ⁺ 37	
3.6.2	Antioksidacinio aktyvumo tyrimas ekstraktams elektrocheminiu metodu.....	39
	IŠVADOS.....	41
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	42
	SANTRAUKA	47
	SUMMARY	48
	PRIEDAI	49
	1 priedas.....	50
	2 priedas.....	53

ĮVADAS

Vaistiniai augalai tai pirmoji vaisto forma, kurią pradėjo vartoti žmogus. Nors augalinių vaistų vartojimas skirtingose šalyse skiriasi ir remiasi tradiciškumu bei ilgalaikę taikymo patirtimi, augalinės kilmės preparatai užima svarbią vietą ir vis dar yra naudojami [1]. Vaistiniai augalai yra biologinės įvairovės dalis, svarbi farmacijos ir botanikos specialistams, maisto ir kosmetikos pramonės atstovams bei odontologams. Neabejojama dėl vaistinių augalų gydomųjų savybių, kadangi jos yra aprašomos ir analizuojamos mokslo darbuotojų, naudojant naujausius tyrimų ir analizės metodus. Tai leidžia atrasti vis daugiau vaistinių augalų savybių, aptikti junginių, kurie ateityje gali būti naudojami vaistams gaminti [2]. Augaliniai vaistai dažnai pigesni, lengviau toleruojami, turi mažesnę pašalinį poveikį organizmui, net ir vartojant mažomis koncentracijomis veikia efektyviai ir lokalizuotai [3].

Fitoterapija Lietuvoje turi galias tradicijas ir yra populiari, todėl labai svarbu tirti Lietuvos teritorijoje augančius augalus, kurie naudojami kaip žaliava vaistiniams preparatams. Įvairūs augalai ir atskiros augalo dalys pasižymi skirtinga biologiškai aktyvių junginių sudėtimi, nuo kurios priklauso tam augalui ar tam tikrai augalo daliai būdingos gydomosios savybės. Iš žaliavos išgavus eterinius aliejus, ekstraktus galima identifikuoti tai žaliai būdingas veikliąsias medžiagas. Vaistiniai augalai yra naudojami dėl savo antibakterinių, priešgrybelinių, antioksidacinių, priešuždegiminių savybių. Daugumai augalų būdingos keletas gydomųjų savybių, tačiau dažnu atveju augalas tik dėl jam būdingo biologiškai aktyvių junginių rinkinio pasižymi stipriau išreikšta, tam augalui labiausia būdinga savybe ar poveikiu. *Artemisia* genties augalai *A. absinthium* ir *A. vulgaris* turi stipriai išreikštas insekticidines, toksines ir citotoksines savybes, *A. campestris* turi nuodų poveikį silpninančių savybių. *Helichrysum* genčiai priklausantis *H. arenarium* būdingos antinociceptinės t.y. skausmą mažinančios savybės, o *H. italicum* turi odą regeneruojančių savybių. *Aesculus hippocastanum* pasižymi priešuždegiminėmis savybėmis.

Tiriamąo darbo tikslas: Naudojant dujų chromatografijos/masių spektrometrijos metodą atlikti įvairių vaistinių augalų: karčiojo kiekčio (*Artemisia absinthium* L.), paprastojo kiekčio (*Artemisia vulgaris* L.), dirvoninio kiekčio (*Artemisia campestris* L.), paprastojo kaštono (*Aesculus hippocastanum* L.), smiltyninio šlamučio (*Helichrysum arenarium* L.) ir italinio šlamučio (*Helichrysum italicum* L.) eterinių aliejų analizę ir identifikuoti charakteringus junginius. Įvertinti antioksidacines ir toksiškumo savybes kai kuriems augalų ekstraktams.

Uždaviniai:

1. Surinkti Lietuvoje augančių vaistinių augalų žaliavas: Karčiojo kiekčio (*Artemisia absinthium* L.), paprastojo kiekčio (*Artemisia vulgaris* L.), dirvoninio kiekčio (*Artemisia*

campestris L.), paprastojo kaštono (*Aesculus hippocastanum* L.), smiltyninio šlamučio (*Helichrysum arenarium* L.).

2. Hidrodistiliacijos būdu išgauti aukščiau paminėtų Lietuvoje augančių vaistinių augalų eterinius aliejus (EA) ir ekstraktus bei išgytos vaistinės žaliavos italinio šlamučio (*Helichrysum italicum* L.) EA.
3. Atlikti išsamią išgautų EA analizę naudojantis dujų chromatografijos/masių spektrometrijos metodu (GC-MS), identifikuoti aliejams būdingus junginius.
4. Įvertinti kokybinės ir kiekybinės veikliųjų medžiagų sudėties skirtumus ir panašumus tos pačios genties ir rūšies augaluose, surinktuose skirtingose augavietėse.
5. Atlikti toksiškumo tyrimą *H. italicum* aliejams.
6. Nustatyti *H. italicum* ir *A. vulgaris* EA oksidacinį aktyvumą naudojant 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH⁺) laisvojo radikalo surišimo metodą.
7. Taikant elektrocheminį tyrimo metodą nustatyti antioksidacines savybes ekstraktams, išgautiems iš Lietuvoje surinktų augalų.

SANTUMPOS

BAJ	biologiškai aktyvūs junginiai
BHT	butilintas hidroksitoluenas
DIV	diferencinė impulsinė voltamperograma
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilas
EA	eterinis aliejus
EVA	Europos vaistų agentūra (angl. European Medicines Agency)
GC-MS	angl. gas chromatography-mass spectrometry, dujų chromatografija-masių spektrometrija
IC ₅₀	inhibitorinė koncentracija (slopinamoji koncentracija)
LC ₅₀	letalinė koncentracija, kuriai esant per tyrimo laikotarpį žūva 50% tiriamųjų organizmų
LC ₉₀	letalinė koncentracija, kuriai esant per tyrimo laikotarpį žūva 90% tiriamųjų organizmų
PSO	Pasaulinė sveikatos organizacija
MIK	minimali inhibitorinė koncentracija

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Farmakologinis biologiškai aktyvių medžiagų veikimas

Fitoterapinis ar fitofarmacinis preparatas yra apibrėžiamas kaip iš vaistinių augalinių žaliavų pagamintas vaistas, kurio sudėtyje yra cheminis junginys arba dažniau cheminių junginių kompleksas, kuris įtakoja žmogaus organizmo veiklą. Veikliosios medžiagos tai gryni cheminiai junginiai (šiuo atveju išskirti iš augalų), kurie naudojami medicininiais tikslais, dažniausiai žinoma ir nurodoma tiksli indikacija. Augaluose biologiškai aktyvios medžiagos yra skirstomos į dvi pagrindines gupes, tai: pirminiai ir antriniai metabolitai. Pirminiams metabolitams priklauso angliavandeniai, lipidai, aminorūgštys ir jų dariniai, nukleino rūgštys. Pirminiai metabolitai yra priskiriami prie maistinių medžiagų būtinų gyvūnams ir žmonėms, tačiau jie retai turi farmakologinį poveikį. Antriniai metabolitai, kiek šiuo metu yra žinoma, nėra būtini pirminiam augalo išgyvenimui, tačiau jie augalui svarbūs apsaugojimui nuo žoliaėdžių, kenkėjų bei ligų. Daugumai antrinių metabolitų yra būdingas farmakologinis aktyvumas. Antriniams metabolitams yra priskiriami terpenoidai (mono-, di-, seksvi-, tri-, tetra-, poli-), steroidai, azoto turintys junginiai (alkaloidai, gliukozinolatai), azoto neturintys fenilpropano junginiai (flavonoidai, kumarinai, ligninai, cinamono rūgšties dariniai), poliketidai (katechinai, favonoidai), poliinai, vašakai, augalinės rūgštys. [4]

1.2 Vaistinė augalinė žaliava Lietuvoje ir pasaulyje

Pasaulinės sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis iš viso gydymo tikslais gali būti naudojami 75000 rūšių augalai, tačiau šiuo metu yra naudojama apie 35000 rūšių. Europos farmacijos pramonėje kaip vaistinė žaliava yra naudojamos beveik 12000 rūšių augalų [5]. Dėmesys vaistažolininkystei vis stiprėja dėl populiarėjančių ekologinių ūkių, ekologiškų produktų gamybos ir vartojimo. Todėl per pastaruosius dešimtmečius vaistažolių verslas labai išaugo visoje Europoje. [2] Pagal PSO duomenis 2015 m. vaistinių augalų rinkos vertė pasaulyje buvo apie 43 milijardus JAV dolerių ir yra prognozuojamas kasmetinis 5-15% rinkos augimas. [6]

Lietuvoje paskutiniaisiais duomenimis 2013 m. buvo supirktas 8,3t vaistažolių. Didžiausias supirkimas (345t) užfiksuotas 1971 m., nuo tų metų vaistinės žaliavos supirkimas pradėjo sparčiai mažėti. Manoma, kad tam daugiausia įtakos turi iš kitų šalių importuojama pigesnė žaliava [7]. Nors supirkimas mažėja, vaistažolės yra auginamos ūkiuose, viename iš jų UAB „Jadvygos žolės“ yra išauginama ir surenkama apie 17t produkcijos kasmet. [8] Pagal Lietuvos Respublikos Aplinkos ministerijos statistikos duomenis Lietuvoje yra paruošiama 92,5t augalinės vaistinės žaliavos per metus [9]. Lietuvoje yra inventorizuota 1796 sporinių induočių augalų. Šiuolaikinėje ir liaudies medicinoje yra naudojami daugiau kaip 460 rūšių augalų, iš kurių 199 yra savaiminės. Pastarosioms rūšims priskiriama 13 medžių, 18 krūmų ir 168 žolių rūšys. Šio darbo tyrimams atlikti pasirinktos

žolės: kartusis, paprastasis, dirvoninis kiečiai bei smilgytinis šlamutis taip pat yra pirkiriamos savaiminėms rūšims [7].

1.3 Kartusis kietis (*Artemisia absinthium* L.)

Artemisia absinthium L yra daugiametis 60-110 cm aukščio aitriai kvepiantis žolinis augalas, apaugęs trumpais, tankiais, sidabrinio atspalvio baltais plaukeliais. Žiedai vamzdiški, smulkūs, geltonos spalvos, žydi liepos-rugsėjo mėnesiais. Sėklos subręsta rugsėjo mėnesį, vienas augalas užaugina iki 100 000 sėklų, kuriomis dauginasi. Sėklos yra apie 1mm ilgio, rusvos spalvos, pailgos, išilgai raukšlėtos formos. *A. absinthium* L. yra paplitęs Šiauriniame pusrutulyje, natūraliai auga Europoje, Azijoje ir Š. Afrikoje. Lietuvoje kartusis kietis randamas visoje šalyje, tai nereiklus augalas: auga panamėse, dykvietėse, sausuose šlaituose, šiukšlynuose, pakelėse, palaukėse, labiausiai mėgsta kalkingas dirvas [10]. Lietuvos tradicinėje medicinoje šis augalas naudojamas daugiausia dėl savo antihelmitinių savybių, taip pat kaip virškinimą gerinantis, apetitą didinantis, pilvo pūtimą mažinantis preparatas. Kartusis kietis gydo tulžies pūslės, inkstų ligas, nemigą, slopina uždegimus [11]. Pasaulyje augalas geriausiai žinomas kaip vienas iš ingredientų absento ir kitų alkoholinių gėrimų gamyboje, tokių kaip likerai, įvairūs aperityvai. Karčiojo kiečio antžeminė dalis (šakelės, lapai, žiedai) yra naudojami kulinarijoje dėl specifinio kvapo ir kartaus skonio [10].



1 pav. Kartusis kietis, būdinga augalo išvaizda

1.3.1 Karčiojo kiečio veikliosios medžiagos ir biologinis aktyvumas

A. absinthium būdingi BAJ yra EA, flavonoidai (rutinas, kvercetas), kavos rūgštis, chlorogeninė rūgštis, siringinė rūgštis, salicilio rūgštis, vanilino rūgštis, karotinoidai, kumarinai, tiofenas. Europos vaistų agentūros (EVA) pateiktoje ataskaitoje pateikiama, kad pelynas turi nuo 0,15% iki 0,4% karčiųjų medžiagų, jų kiekis priklauso nuo seskviterpenų laktonų kiekio, pagrindinis iš jų absintas (sudaro iki 0,28%), kiti anabsintas, artabsinas (0,04-0,16%) ir matricinas (0,007%). EVA nurodoma, kad vaistinė žaliava turi 0,2-1,5% eterinio aliejaus, kurio sudėtis

priklauso nuo augalo kilmės, chemotipo, sezoniškumo. Taip pat nurodoma, kad iš 1 kg lapelių ar žiedų arba šių žaliavų mišinio galima išgauti apie 2ml EA [12]. Pagrindiniai EA būdingi junginiai: α -, β -tujonai, (Z)-epoksi ocimenas, trans-sabinilo acetatas, bornilo acetatas, chrizantenilo acetatas, 1,8-cineolis, chamazulenai, kariofilenas [10],[12]. Lietuvos teritorijoje augančio pelyno, išgautiems EA būdingi junginiai: trans-sabinilo acetatas, tujonas, sabinenas, epoksi ocimenas, mircenas, β -pinenas, linalolis, chrizantenilo acetatas, trans-sabinolis, 1,8-cineolis [10][13]. *A. absinthium* aliejams būdinga tamsiai ruda, tamsiai žalia ar oranžinė spalva. Karčiojo kiekio EA pasižymi akaricidinėmis, insekticidinėmis, fitotoksinėmis, priešgrybėlinėmis, antibakterinėmis, animikrobinėmis, antioksidacinėmis, neurotropinėmis savybėmis [12][13]. Ekstraktams kaip ir aliejams būdingos įvairios biologinės savybės: antimaliarinės, citotoksinės, antiprotozoinės, antimikrobinės, antihelmitinės, uždegimą malšinančios savybės [10].

A. absinthium EA toksiškumas įrodytas atliekant tyrimus su krevečių lervomis (*Artemia sp.*), kurios buvo veikiamos tam tikroms EA koncentracijoms. Nustatytos mirtinos koncentracijos (LC₅₀ ir LC₉₅) krevečių lervoms parodė, kad stipresniu toksiškumu pasižymėjo EA, kuriuose didelis trans-sabinilo acetato kiekis (apie 50%) ir vidutinis kiekis (apie 12-15%) tujono. Manoma, kad būtent šie junginiai atlieka lemiamą vaidmenį, yra žinoma, kad tujonas pasižymi stipriu neurotoksiškumu, o sabinilo acetatas sukelia abortus, yra toksiškas žinduolių embrionams, dirgina odą. Taip pat buvo tirti *A. absinthium* EA mėginiai, kuriuose buvo toks pat kiekis sabinilo acetato, bet be tujono, vietoje jo turėjo panašų kiekį (Z)-epoksi ocimeno (12.8%), pasižymėjo žymiai mažesniu toksiškumu [14]. Buvo atlikti tyrimai su mielėmis (*Candida albicans* ir *Saccharomyces cerevisiae var. chevalieri*), kurių metu nustatyta, kad aliejai turintys nemažą kiekį (Z)-epoksi ocimeno slopino mielių augimą, kas patvirtina jų antimikrobinės savybes [15]. Kitas *A. absinthium* antimikrobinio aktyvumo tyrimas atliktas vykdant eksperimentą su laboratorinėmis žiurkėmis. Jo metu kiekvienai žiurkei buvo padaryta žaizda ir į ją suleidžiama atitinkamas kiekis (1×10^4 kolonijas formuojančių vienetų) auksinio stafilokoko (*S. aureus*) bakterijų. Viena žiurkių grupė buvo gydoma pelyno ekstraktu, tepant žaizdos vietą du kartus per dieną, kita žiurkių grupė nebuvo gydoma. Po 8 dienų, palyginus abi grupes buvo matyti, kad per pusę mažesnę bakterijų skaičių ant žaizdos turėjo pelyno ekstraktu gydytos žiurkės [16].

Karčiojo kiekio EA ir ekstraktų antioksidacinis aktyvumas įvertintas spektrofotometriškai, naudojant 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH⁺) laisvojo radikalo surišimo metodą. Atlikta studija parodė, kad abi formos ir ekstraktas ir EA pasižymi antioksidaciniu aktyvumu. Nustatytas 28,4%, DPPH⁺ radikalo surišimas metanoliniam ekstraktui, o EA - 45,6%. Kaip teigiama kontrolė buvo naudotas butilintas hidroksitoluenas (BHT), kuriam nustatytas 78,9% antioksidacinis aktyvumas [14]. Remiantis šioje studijoje gautais rezultatais, daroma išvada, kad EA pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu lyginant su ekstraktu.

1.4 Paprastasis kietis (*Artemisia vulgaris* L.)

Artemisia vulgaris L. labiausiai paplitęs Šiauriniame pusrutulyje, auga drėgnose ar pusiau drėgnose vietovėse. Šis augalas randamas visoje Lietuvos teritorijoje: atviruose laukuose, pakelėse, apleistose vietose. Užauga 50-150 cm aukščio, žydi rugpjūčio mėnesį, sėklas brandina rugsėjį. Šis kietis daugelyje šalių žinomas kaip prieskoninis augalas, tačiau yra naudojamas ir tradicinėje medicinoje. Yra žinomos virškinimą gerinančios šio augalo savybės, taip pat naudojamas karščiavimui, kosuliui slopinti, kepenų ligoms gydyti, odos infekcijoms, uždegimams malšinti. Koncentruotas augalo ekstraktas buvo naudojamas kaip antimaliarinis agentas [17], [18].



2 pav. Paprastojo kiečio žaliava

1.4.1 Paprastojo kiečio veikliosios medžiagos ir biologinis aktyvumas

BAJ esantys žaliavoje - flavonoidai, kumarinai, seskviterpenų laktonai, eteriniai aliejai, inulinas, alkaloidai. Pagrindiniai junginiai randami EA yra šie: α -tujonas, kamparas, kamfenas, germakrenas D, 1,8-cineolis, kariofilenas. Šiaurės Lietuvoje augančio paprastojo kiečio EA daugiausia rasta trans-tujono (20,2%), germakreno D (10,6-15,1%), cis-tujono (12,9%), kiti dominuojantys komponentai chrizantenilo acetatas, 1,8-cineolis, sabinenas, β -pinenas, artemizija ketonas, kariofilenas. Lietuvoje augančio *A. vulgaris* EA išsiskiria savo chemine sudėtimi, nes turi chrizantenilo acetato, kuris kitų šalių šiuose augaluose dar nebuvo nustatytas [17].

EA yra naudojami dėl savo insekticidinių, antimikrobinių, antiparazitinių savybių. Antimikrobinės savybės yra patvirtintos daugelyje mokslinių publikacijų tiriant *A. vulgaris* ekstraktus bei EA [19] [20] [21]. Iš vakarinėje Turkijoje surinktos žaliavos buvo išgautas EA turintis α -tujono (56,13%), β -tujono (12,02%), kariofileno oksido (10,19%). Atliekant tyrimus buvo

lyginamos susidariusios slopinimo zonos veikiant EA 8 bakterijų rūšis ir vieną grybelio rūšį. Nustatytos zonos buvo didesnės arba sutapo su ceftazidimo (antibiotikas naudojamas gydyti bakterines infekcijas, kuris buvo naudojamas kaip standartas) slopinimo zonomis. EA stipriausiai paveikė *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538/P) ir *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) bakterijas. Teigiama, kad toks antimikrobinis poveikis pasireiškė dėl didelio α -tujono kiekio [20].

Viena iš galimų ir efektyvių naujų chemoterapinių vaistų kūrimo strategijų yra gamtinių junginių nustatymas ir analizė. Svarbu paminėti, kad dauguma vėžio terapijai naudojamų vaistų yra natūralios augalinės kilmės arba jų pagrindą sudaro naturalūs produktai. Vieni iš tokių vaistų, naudojamų daugelio rūšių vėžiui gydyti, yra „Vinkristinas“ ir „Vinblastinas“ išgaunami iš rausvojo kataranto (*Vinca rosea*), kamptotecinas, alkaloidas išskiriamas iš kiniško medžio (*Camptotheca acuminata Decsne*) ir kiti vaistai tokie kaip „Etopozidas“, „Doksetakselis“ ir „Paklitakselis“. *A. vulgaris* EA citotoksinis poveikis patvirtintas „BMC Complementary and Alternative Medicine“ žurnale. Atlikta studija parodė, kad šio augalo žiedų EA sukelia adaptozę HL-60 žmogaus leukemijos ląstelių linijai, nustatytos ir palygintos IC₅₀ vertės vėžinių ląstelių ir skirtingų žmogaus organų ląstelių kultūroms. Gauti rezultatai parodė, didesnę *A. vulgaris* EA aktyvumą būtent vėžinėms ląstelėms (IC₅₀ 0,5 µg/ml) (Jurkat linijai), Hep G2 ir PC-3 ląstelių linijoms – 0,72-0,74 µg/mL, HeLa ląstelėms -2,5 µg/mL. Tuo tarpu žmogaus odos fibroblasto ląstelėms nustatytas ženkliai mažesnis poveikis, gauta inhibitorinė koncentracija 17,75 µg/mL, žmogaus epitelio inkstų ląstelėms 13,24 µg/mL [22].

1.5 Dirvoninis kietis (*Artemisia campestris* L.)

Artemisia campestris tai daugiametis augalas labai dažnai sutinkamas ir paplitęs visoje Lietuvoje. Auga žvyruobėse, smėlynuose, ant geležinkelio pylimų, šlaituose, pakelėse, dykvietėse. Užaugina daug stiebų, kuriems būdinga raudona spalva, užauga nuo 20 iki 80 cm aukščio. Būdingi smulkūs lapeliai, kurie gali būti šakoti, augalo žydėjimo laikas liepos-spalio mėnesiai [23]. Pasaulyje *A. campestris* paplitęs Šiauriniame pusrutulyje, auga smėlinguose, molinguose dirvožemiuose.

1.5.1 Dirvoninio kietis veikliosios medžiagos

Dirvoniniam kietčiui būdingi BAJ alkaloidai, saponinai, terpenai, flavonoidai (pinostrobinas, pinocembrinas, sakuranetinas, naringeninas, hispidulinas) [24]. Lietuvoje augančio dirvoninio kietis EA yra ištirti ir identifikuoti pagrindiniai būdingi junginiai: kariofileno oksidas (8,5-38,8%), germakrenas D (≤15%), humuleno epoksidai II (≤8,1%), β -ilangenas (≤7,7%), spatulenolis (≤6,8%), β -elemenas (≤6,8%), β -kariofilenas (≤6,2%), junenolis (≤6,1%), α -; β -pinenai (≤5,5%). Italijoje, Portugalijoje, Pietryčių Tunise, Irane *A. campestris* EA daugiausia rasta α - ir β -pinenų, Prancūzijoje išgautas EA pasižymėjo didžiausiu γ -terpineno kiekiu [25].

1.5.2 Gydomosios *A. campestris* savybės

A. campestris būdingas farmakologinis poveikis: augalas pasižymi antihelmitinėmis, antiseptinėmis, antimikrobinėmis, priešuždegiminėmis, citotoksinėmis, detoksikacinėmis savybėmis. Tradicinėje medicinoje naudojamas nuodingiems įkandimams, igėlimams gydyti (ypatingai gyvačių ir skorpionų), virškinimo problemoms spręsti, nutukimui ir cholesterolio kiekiui mažinti [24]. Nuodų poveikio sumažinimas naudojant *A. campestris* įrodytas moksliniais tyrimais. Iš augalo žaliavos buvo pagamintas vandeninis ekstraktas. Suplanuoti trys tyrimo variantai, pirmuoju suleistas vandeninis ekstraktas žiurkėms, antruoju atveju žiurkėms suleistas vandeninis ekstraktas ir po 15 min suleisti skorpiono (*Buthus occitanus tunetanus*) nuodai, trečiuoju atveju žiurkėms suleisti tik nuodai. Visais atvejais buvo matuojamas arterinis kraujo spaudimas. Užfiksuoti duomenys parodė, kad ekstraktas sumažino kraujo spaudimą apie 30% (nuo pradinės vertės), o nuodai sukėlė staigius pulso svyravimus (maksimaliai 150% nuo pradinės vertės). Nuodai suleisti po 15 min nuo ekstrakto suleidimo leido išvengti didelio spaudimo svyravimų [26]. Su Lietuvoje augančio dirvoninio kiekio EA atliktas toksiškumo tyrimas naudojant krevečių lervas (*Artemia* sp). Nustatyta LC₅₀ 15-20 µg/mL koncentracija. Manoma, kad didžiausia įtaką tokiam poveikiui turėjo kariofileno oksido ir gerkakreno D junginiai [25].



3 pav. Išdžiuvusi ir šviežia *Artemisia campestris* žaliava

A. Akrouit ir L. A. Gonzalez *et al.* nustatė ir palygino *A. campestris* EA, 50% etanolinio ekstrakto ir vandeninio užpilo antioksidacinį aktyvumą [27]. Atliktas tyrimas naudojant (DPPH⁺) laisvojo radikalo surišimo metodą, parodė, kad didžiausią antioksidacinį aktyvumą turi vandeninis užpilas, mažesnę etanolis ekstraktas ir labai silpną EA, rezultatai buvo lyginami su askorbo rūgšties, BHT ir kvercetino standartais. Lygiagrečiai šiem tyrimams buvo atliktas ir aprašytas citotoksiškumo nustatymo tyrimas: HT-29 vėžinių ląstelių liniją veikiant EA, 50% etanoliniu ekstraktu bei vandeniniu užpilu. Šiame tyrime efektyviausiai HT-29 ląstelių augimą veikė EA, perpus silpniau

veikė etanolinis ekstraktas, o visiškai silpnai vandeninis užpilas. EA citotoksinis aktyvumas aiškinamas eteriniame aliejuje esančių α -pineno, β -pineno ir limoneno poveikiu [27].

1.6 Paprastasis kaštonas (*Aesculus hippocastanum* L.)

A. hippocastanum natūraliai paplitęs vakarų Indijoje ir Balkanų pusiasalio šalyse, taip pat auginamas parkuose, soduose, pakelėse daugelyje Europos šalių, Amerikoje, mažojoje Azijoje. Kaštonas užauga 25-30 m aukščio, jam būdingi pjūkliški lapai sudaryti iš 5-7 lapelių, žydi gegužės-birželio mėnesiais baltais žiedais, rugsėjo mėnesį subrandina sėklas [28].

1.6.1 Paprastajam kaštonui būdingos veikliosios medžiagos ir jų gydomasis poveikis

A. hippocastanum būdingi BAJ yra saponinai (α -escinas, β -escinas, kripto-escinas), flavonoidai (rutinas, kvercetas, izokvercetas, kempferolio ir jo darinių, hidroksikumarinai (eskulinas, fraksetinas, skopolaminas), steroliai, EA. Paprastojo kaštono žievė, vaisių žievelė savo sudėtyje turi toksinėmis savybėmis pasižymintį junginį eskuliną, vaisiuose šis junginys nėra aptinkamas [28] [29]. Kaip vaistinė žaliava yra naudojami kaštono vaisiai, žievė, žiedai, kiek rečiau naudojami lapai. Kaštono žaliavos gydomosios savybės buvo aprašomos dar XVIII a., skirtos gydyti karščiavimui, bronchitui ir hemarajui. Kaštonų žiedai naudojami ruošti arbatoms, tinktūroms. Prancūzijos farmakopėjoje aprašytas homeopatinis preparato (tinktūros) paruošimas kaip žaliavą naudojant kaštonų žiedus [30]. Pagrindinis biologiškai aktyvus komponentas randamas kaštono vaisių ekstraktuose yra glikozidas escinas, kuris atsakingas už daugelį gydomųjų savybių. Escinas didina venų tonusą, mažina kojų patinimą, sunkumą, mažina audinių brinkimą, slopina uždegimą. Escino, kaip veikliosios medžiagos, farmakologija ir farmakokinetika yra nustatyta, o terapinis aktyvumas patvirtintas, todėl naudojant šį aktyvų ingredientą yra gaminamos tabletės, geliai, skirti minėtiems simptomams gydyti. Preparatai su escinu tinka nėščioms moterims dėl mažo junginio toksiškumo [31],[32]. Kaštono žievėje ir lapuose yra glikozido eskulino, kuris nulemia priešūždegimines savybes [33]. Todėl preparatai paruošti iš šios žaliavos daugiausiai naudojami hemarajui, venų varikozei, kojų opoms gydyti [29],[34]. Preparatai su eskulinu turi būti vartojami atsižvelgiant į indikacijas, kadangi suvartojus per didelę dozę gali atsirasti diegliai, spazmai, viduriavimas, sutrikti orientacija [33]. Atlikti tyrimai patvirtino eskulino toksiškumą atliekant tyrimus su pelėmis, nustatyta $LD_{50}=1900$ mg/kg [35]. Atlikti tyrimai įrodė, kad *A. hippocastanum* ekstraktai stimuliuoja odos ląstelių regeneraciją, todėl yra naudojami kosmetikoje, daugiausia kremams, kurių paskirtis mažinti raukšles. Atlikta studija parodė, kad kaštono ekstraktas aktyvina fermentą kinazę, ko pasekoje yra sukeliama fibroblastų (jungiamojo audinio ląstelių, gaminančių kolageną ir elastines skaidulas) susitraukimas, dėl to greičiau gyja žaizdos, sumažėja raukšlės, nyksta randai [36].

Priešingai nei apie *A. hippocastanum* ekstraktus, publikacijų apie šio augalo žiedų ir vaisių EA chemotipus, būdingus junginius, yra vos keletas. 1994 m. buvo publikuotos *A. hippocastanum* vaisių ir žiedų EA studijos. Žaliava buvo surinkta Vienos mieste, aliejai išgauti atliekant distiliaciją garais. Žiedų EA identifikuoti būdingi junginiai: α -pinenas (21,8%), β -pinenas (17,2%), kamfenas (11,3%), dekanolis (7,2%), limonenas (6,1%), 1,8-cineolis (5,8%) ir nonanalis (4,3%). Vaisių EA nustatyti junginiai: nonanalis (5,3%), 3-heksen-1-olis(5,2%), nonano rūgštis (4,6%), benzilo alkoholis (3,9%), 2-hepnaolis (3,2%) [37],[38]. Paprastųjų kaštonų EA antimikrobinės, priešuždegiminės, antibakterinės, citotoksinės ir kitos galimos būdingos savybės kol kas nėra iširtos.



4 pav. *A. hippocastanum* žydėjimo periodu

1.6.2 Indikacijos *A. hippocastanum* žaliavai ir iš jos gaminami preparatai

Išleista ir šiais metais atnaujinta EVA monografija nurodo reikalavimus žaliavai, kuri bus naudojama vaistiniams preparatams gaminti. Vaistinės žaliavos ekstraktai turi būti ruošiami ekstrahentu naudojant 40-80% (v/v) etanolį, ekstraktai turi turėti 6.5-10% triterpenų glikozidų, skaičiuojamų kaip protoescigeninas. EVA pateiktoje monografijoje nurodoma, kad iš kaštono žievės (*A. hippocastanum cortex*) yra gaminamos kietosios tabletės, kurios kaip homeopatinis vaistas naudojamas Austrijoje, kaip maisto papildas - Italijoje. Įregistruotas tradicinis vaistinės žaliavos vartojimas Lenkijoje, Prancūzijoje, Ispanijoje. Kaip vaistinę žaliavą naudojant kaštonų vaisius (*A. hippocastanum semen*) gaminami sausi ekstraktai, kurie naudojami tablečių, kapsulių bei gelių gamybai. Pagal EVA duomenis preparatai parduodami Lenkijoje, Ispanijoje, Austrijoje, Danijoje, Norvegijoje, Slovėnijoje, Slovakijoje, Švedijoje, Vokietijoje [33], [35].

1.7 Smiltyninis šlamutis (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench)

Smiltyninis šlamutis (*Helichrysum arenarium*) – daugiametis 15–40 cm aukščio žolinis augalas, augantis šiek tiek rūgštiniame arba neutraliame, smėlingame dirvožemyje, paplitęs visoje Lietuvoje [39]. Auga miškuose, pamiškėse, pievose, šlaituose ir sauspievėse. *H. arenarium* auga Skandinavijos ir Balkanų šalyse, Rusijos Europinėje dalyje, Europos šalyse besiribojančiomis su Atlanto vandenynu, Sibijoje, Kaukaze, mažojoje ir centrinėje Azijoje, Mongolijoje ir Kinijoje [40]. Žydėjimo laikotarpis liepos-rugsėjo mėnesiai. Augalas krauna citrininės, citrininės-geltonos, ar gelsvai oranžinės spalvos žiedynus.



5 pav. Renkama *Helichrysum arenarium* žaliava Utenos rajone

1.7.1 Smiltyninio šlamučio biologiškai aktyvūs junginiai

Žiedai savo sudėtyje turi flavonoidų, eterinių aliejų, riebalų rūgščių, karotinoidų, steroidų, karčiųjų medžiagų, polifenolių, vitaminų ir mineralinių druskų. Lietuvoje augantis smiltyninis šlamutis savo EA sudėtyje turi 1,8-cineolio, β -kariofileno, γ -kadieno, δ -kadineno, oktadekano, heneikosano. Mokslinių publikacijų apie *H. arenarium* aliejų sudėtį nėra labai daug, kadangi dauguma straipsnių aprašo kitų *Helichrysum* genties rūšių, augančių Viduržemio jūros regionuose EA sudėtį. Apie *H. arenarium* eterinių aliejų sudėtį ir/ar savybes publikacijos išleistos Serbijos, Irano, Indijos, Vengrijos ir Lietuvos mokslininkų [39].

1.7.2 *H. arenarium* gydomosios savybės

Smiltyninio šlamučio žiedai tradicinėje medicinoje plačiai naudojami skrandžio, kepenų, tulžies sutrikimams, taip pat artritui ir cistitui gydyti, detoksikacijai. Žaliava yra vartojama ruošiant arbatas, nuovirus. Šlamutis pasižymi antioksidacinėmis, antimikrobinėmis, antibakterinėmis, priešuždegiminėmis savybėmis [39],[40],[41]. Atliekant tyrimus su mikroorganizmais, tokiais kaip bakterijos, mielės, grybeliai, buvo nustatytas smiltyninio šlamučio EA antimikrobinis aktyvumas. EA tyrimui atlikti buvo naudojami *H. arenarium* antžeminė dalis. Didžiausias EA poveikis buvo

tirtiems grybeliams *A. flavus* ir *A. parasiticus*, nustatyta minimali inhibitorinė koncentracija (MIK) 48.82 µg/ml. Šiek tiek mažesnis poveikis buvo nustatytas bakterijoms *E. coli* ir mielėms *S. cereviciae* MIK-97.65 µg/ml [42]. Antimikrobiniai tyrimai atliekami ne tik su EA, tačiau ir su šio augalo metanoliniais ir etanoliniais ekstraktais. Tyrimai parodė, kad didžiausias antimikrobinis aktyvumas pastebėtas su *E. coli* veikiant *H. arenarium* etanoliniu ekstraktu (MIK=7.81mg/mL). Atspariausios buvo *L. monocytogenes*, kurioms nustatyta dižiausia MIK - 62.5 mg/L [43]. Palyginus straipsniuose pateiktus EA ir ekstraktų duomenis matoma, kad EA yra efektyvesnė antimikrobinė priemonė.

Atliekant testus (writhing test) su laboratorinėmis pelėmis pastebėtos *H. arenarium* antinociceptinės, t.y. skausmo slopinimo savybės. Visoms pelėms buvo suleista p-benzochinono, o daliai jų dar buvo suleistos skirtingos *H. arenarium* vandeninio ekstrakto dozės. Gauti rezultatai patvirtino teigiamą ekstrakto poveikį pelėms, kadangi joms pasireiškė mažesnis kiekis traukulių lyginant su negydomomis pelėmis [44].

1.8 Italinis šlamutis (*Helichrysum italicum* L.)

Helichrysum italicum yra Viduržemio regiono augalas. Auga kaip visžalis puskrūmis, užaugę sumedėjantys stiebai siekia 50-70cm aukštį. Augalui būdingi sidabriškai pilki, adatiški lapeliai ir geltonos spalvos žiedynai. Auga saulėtose vietovėse ten kur sausas dirvožemis [45].



6pav. Italinio šlamučio žaliava žydėjimo periodu

Dėl savo priešuždegiminių, antibakterinių, antioksidacinių, priešgrybelinių, antivirusinių savybių skirtingos *H. italicum* farmacinės formos plačiai naudojamas tradicinėje medicinoje [45], [46]. Iš italinio šlamučio žaliavos (dažniausia žiedų) ruošiami užpilai, kurie naudojami dantų skausmui malšinti ir kaip burnos antiseptikas, kepenų, tulžies, virškinimo sutrikimams gydyti, odos uždegimui malšinti, užpilas ir garai naudojami kosuliui, peršalimui malšinti. Kita ruošiama vaistinė

forma yra nuoviras, kuris naudojamas židiniui nuplikimui, astmai gydyti, kosuliui ir skrandžio skausmams malšinti, helmintinei infekcijai gydyti. Iš antžeminės augalo dalies ruošiami milteliai naudojami žaizdų gydymui. EA pasižymi antimikrobinėmis ir insekticidinėmis savybėmis. Eterinis aliejus gaminamas iš antžeminės augalo dalies naudojamas grybelinėms odos ligoms gydyti. Be tradicinės medicinos, augalas naudojamas farmacijos srityje, *H. italicum* L. EA plačiai naudojami kosmetikos, kvepalų gamyboje [46].

1.8.1 *Helichrysum italicum* gydymosi savybės ir būdingos veikliosios medžiagos

Charakteringi *Helichrysum italicum* junginiai yra šie: flavonoidai (apigeninas, luteolinas, pinocembrinas), terpenai, kumarinai, steroidai, vaškai, tačiau didžiausią susidomėjimą turi EA. Vieni iš pagrindinių EA junginių: α -pinenas, nerilo acetatas, nerilo propanoatas, geraniolis, geraniolio acetatas, linalolis, limonenas, γ -kurkumenas, propiono rūgštis, 2-metilpropiono rūgštis, dodekano rūgštis, dekanas rūgštis [46].

Antimikrobinis aktyvumas priklauso nuo EA cheminės sudėties. Yra manoma, kad deguonies atomus turintys junginiai, tokie kaip nerilo acetatas, geraniolio acetatas, geraniolis, nerolis yra atsakingi už antimikrobinį aktyvumą [47]. Tyrimai su paprastojo kadagio (*J. communis*) EA turinčiais dideliais α -pineno ir sabineno bei dideliais α -pineno kiekiais slopina bakterijų, grybų ir mielių augimą [48]. Viduržemio jūros regione, Badžajos mieste, surinkta *H. italicum* žaliava ir gautas EA turintis α -kedreno (13.61%), α -kurkumeno (11.41%), geraniolio acetato (10.05%), limoneno (6.07%), nerolio (5.04%), nerilo acetato (4.91%) ir α -pineno (3.78%). Su šiuo EA buvo atlikti antibakteriniai tyrimai naudojant skirtingas bakterijų rūšis, kurie patvirtino, kad EA turi antibakterinių savybių. Apskaičiuotos minimalios inhibitorinės koncentracijos *H. italicum* EA, mažiausios vertės gautos bakterijoms *Enterococcus cereus* ATCC 2035 MIK-0.79 μ g/ml, didžiausia vertė gauta *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 MIK-50.6 μ g/ml. Toks antibakterinis aktyvumas siejamas su EA esančiais nemažais nerolio, nerilo acetato ir α -pineno kiekiais [49].

H. italicum EA pasižymi toksinėmis savybėmis. Tyrimui atlikti žaliava buvo surinkta Italijai priklausančioje Elbos saloje. EA gautas hidrodistiliacijos būdu, kurio pagrindiniai komponentai nerilo acetatas (25,3%), α -pinenas (14,5%), limonenas (12,3%), γ -kurkumenas (8,7%), nerilo propionatas (6,4%), nerolis (5,2%). Tyrimų metu nustatytas žymus *H. italicum* EA toksinis poveikis *A. albopictus* lervoms. Esant 300 ppm EA koncentracijai nustatytas 100% mirtingumas, apskaičiuotas LC₅₀= 78.1ppm, LC₉₀= 288.6 ppm. Mažiausias mirtingumas 5% nustatytas esant 50 ppm aliejaus koncentracijai. Pagal gautus ir straipsnyje aprašytus rezultatus teigiama, kad α -pinenas turi toksiškumą nulemiančių savybių [50].

Italinis šlamutis vis dažniau naudojamas kosmetikoje dėl odą regeneruojančių savybių. Yra teigiama, kad aliejus skatina ląstelių atsikūrimą, ramina jautrią ar pažeistą odą, mažina tinimus, strijas, padeda esant išsiplėtusioms venoms, gražina ląstelėms ir audiniams elastingumą [51],[52].

Teigiamas poveikis odai yra aiškinamas fermentų aktyvumu. Vieni iš jų yra kolagenazė atsakinga už kolageno skaidymą ir elastazė, kuri skaido jungiamojo audinio baltymą elastiną. Straipsnio autoriai atliko tyrimus su *H. talicum* EA, kurie buvo išgauti hidrodistiliacijos būdu, naudojant žaliavą surinktą Markės regione, Italijoje. EA pagrindiniai komponentai α -pinenas (8.21%); italdionas I (7.34%); β -selinenas (5.37%); γ -kurkumenas (4.83%); nerolis (4.75%); α -selinenas (4.68%); limonenas (4.55%); linalolis (4.42%). Tyrimo metu buvo vertinama, kokią įtaką fermentų aktyvumui turės EA ir atskiri komponentai, paruošti atitinkamai tokiais pat kiekiais, kurie buvo nustatyti išgautam EA naudojant įsigytus standartus. Nerilo acetatas, nerolis ir linalolis jokios įtakos fermentų veikimui neturėjo. Tiek α -pinenas, tiek limonenas fermentus veikė slopinamai, šiek tiek veiksmingesnis buvo α -pineno ir limoneno mišinys, gautos IC_{50} vertės kolagenazei 50.11 $\mu\text{g/mL}$, elastazei 153.91 $\mu\text{g/mL}$. Nustatyta *H. italicum* EA IC_{50} kolagenazei 36,99 $\mu\text{g/mL}$, elastazei 135,43 $\mu\text{g/mL}$, lygiagrečiai buvo lyginta su oleolio rūgšties IC_{50} vertėmis 23.61 $\mu\text{g/mL}$ ir 52.62 $\mu\text{g/mL}$. Oleonolio rūgštis yra natūralus odą saugantis triterpenas, naudojamas kaip standartinis kolagenazės ir elastano inhibitorius. Palyginus reikšmes buvo nustatyta, kad EA iš tiesų slopina fermentų veiklą ir gali daryti teigiamą poveikį odai. Tačiau visas EA veikė stipriau slopinamai nei atskiri komponentai, toks poveikis aiškinamas galimu sinergijos efektu [53].

2. TYRIMO METODIKA

2.1 Naudojama įranga

1. Klevendžerio tipo aparatas
2. Analizinės svarstyklės GR -200 – EC A&D instruments LTD (Japonija);
3. Ultragarsinė vonelė BANDELIN electronic Sonorex RK 100 H (Vokietija);
4. Mechaninė kintamo tūrio pipetė 10 – 100 µL Eppendorf Research (Vokietija);
5. Mechaninė kintamo tūrio pipetė 50 – 200 µL Biohit (Vokietija);
6. Mechaninė kintamo tūrio pipetė 100 – 1000 µL Eppendorf Reasearch PLUS (Vokietija);
7. pH-metras Orion 3 Star, pH Benchtop Thermo Electron Corporation (JAV);
8. Perkin Elmer UV/VIS spektrofotometras Lambda 25 (JAV);
9. Dujų chromatografas GC-2010Plus/GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japonija). Detektorius masių spektrometrinis. Chromatografinė kolonėlė Rxi-5MS, ilgis 33m, vidinis skersmuo (Restek, JAV). Nejudri fazė – metilpolisiloksanas, turintis 5 % fenilo grupių, nejudrios fazės sluoksnio storis – 0,25 µm. Nešančios dujos helis.
10. Potencio statas-galvanostatas PGSTAT 30 su kompiuterine programa GPES 4.9

2.2 Medžiagos ir reagentai

1. Dejonizuotas vanduo gautas Direct – Q 3UV Water purification system (Type 1) aparatu;
2. n – Heksanas (≥99,9%, Penta Chemicals, Čekija);
3. Dietilo eteris (≥99,7%, Penta Chemicals, Čekija);
4. 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchromano-2-karboksilinė rūgštis (Trolox) (97%, Sigma – Aldrich)
5. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilas, radikalas (DPPH) (≥90%, Sigma–Aldrich)
6. Metanolis (≥99,8%, Sigma–Aldrich);
7. Grafitas (Sigma–Aldrich)
8. Parafino aliejus (≥99,9%, Sigma–Aldrich)
9. Kalio chloridas (Sigma–Aldrich)
10. Krevečių (*Artemia sera*) lervų kiaušinėliai (Ocean Nutrition, Tailandas)

2.3 Eterinių aliejų analizė

2.3.1 Žaliavos džiovinimas

Žaliava buvo renkama į paprastą, be poligrafinių dažų popierinę dėžutę, o ne į plastikinę pakuotę (tai svarbu, nes augalai yra linkę kaupti ftalatus iš plastikų). Surinkta žaliava buvo atvežta į laboratoriją, paskleista plonu sluoksniu pavėsyje, kur nėra tiesioginių saulės spindulių, džiovinama

laboratorijos patalpoje, kurioje 20-25 °C. Džiovinimo etapas yra svarbus, nes jo metu iš žaliavos yra pašalinamas vanduo, todėl prailgėja žaliavos galiojimo laikas, taip pat fermentai nebegali suskaidyti augalo audiniuose esančių fenolių.

2.3.2 Žaliavos paruošimas hidrodistiliacijai

Planuojamos analizuoti žaliavos dalys (žiedai, stiebai, lapeliai, luobelės) atskiriamos. Tuomet žaliava yra susmulkinama, lapeliai ar žiedai smulkinami sutrinant rankomis, kietesnė žaliava, tokia kaip stiebai yra smulkinami naudojant elektrinį smulkintuvą. Susmulkinta žaliava sverama elektroninėmis svarstyklėmis, gauti parodymai užsirašomi.

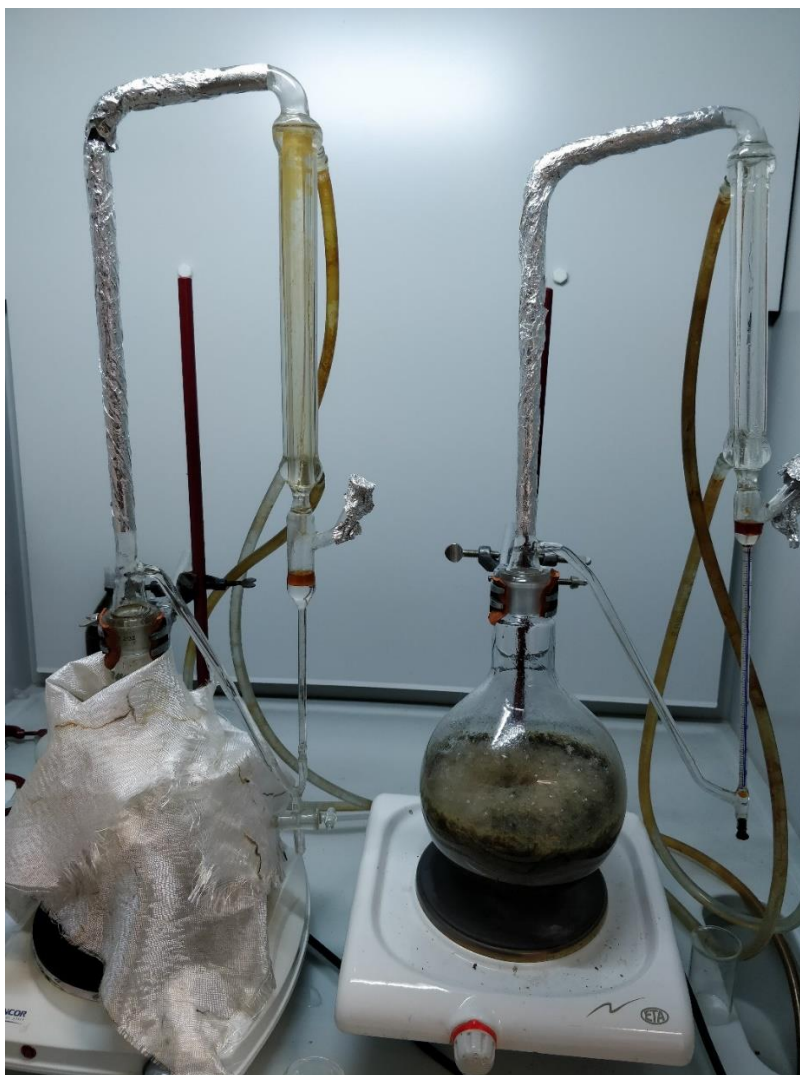
2.3.3 Hidrodistiliacija

Hidrodistiliacija yra tradicinis metodas naudojamas eterinių aliejų ekstrakcijai. Galimi trys hidrodistiliacijos būdai: vandens distiliacija, vandens ir garų distiliacija ir tiesioginė garų distiliacija. Vykdamas hidrodistiliaciją vyksta fizikocheminiai procesai tokie kaip hidro-difuzija, hidrolizė, termolizė. EA išskyrimui buvo pasirinktas ir vykdomas vandens ir garų distiliacijos metodas, proceso metu karštas vanduo ir garai veikia kaip pagrindinė terpė iš augalo išlaisvinanti biologiškai aktyvius junginius ir nešanti juos kartu. Netiesioginis šaldymas kondensuoja vandens garus nešančius EA su biologiškai aktyviais junginiais ir atskiria juos nuo vandens. Hidrodistiliacija yra vykdoma vandens virimo temperatūroje t.y. nestipriai verdant vandens ir žaliavos mišiniui.

Hidrodistiliacija vykdoma remiantis Europos Farmakopėjos rekomendacijomis. Atsverta žaliava suberiama į 2000 mL apvaliadugnę kolbą ir ant jos užpilama 10 kartų didesnis kiekis distiliuoto vandens nei žaliavos kiekis. Taip paruošta kolba tvirtinama ant elektrinės plytelės ir sujungiama su sistema t.y. su Klevendžerio tipo aparatu, įjungiama elektrinė plytelė (7pav). Fiksuojamas distiliacijos pradžios laikas, kuomet praėjęs kondensatorių nukrenta pirmas EA lašelis. Prasidėjus distiliacijai nedelsiant įpilama heksano ir dietilo eterio (1:1), kurie naudojami BAJ surinkti. Hidrodistiliacija vykdoma 2 valandas. Gautas EA po to surenkamas į chromatografinės analizės buteliuką. Buteliukai sandariai užsukami, papildomai apvyniojami „Parafilm“ sandarinimo plėvele ir laikomi šaldiklyje, iki -18 °C temperatūroje.

Vaistinis augalas	Augalo dalis naudota kaip žaliava hidrodistiliacijai
Kiečiai: kartusis, paprastasis ir dirvoninis	Hidrodistiliacija kartu: žiedai ir lapeliai
Paprastasis kaštonas	Žiedai
Smiltyninis šlamutis	Atskira hidrodistiliacija: žiedai; atskirai: stiebai
Italinis šlamutis	Žiedai

1 lentelė. Augalo dalys naudojamos EA išgauti



7 pav. Nuosekliai sujungta sistema, vykdoma karčiojo kiečio (*Artemisia absinthium*) hidrodistiliacija.

2.3.4 GC-MS analizės sąlygos

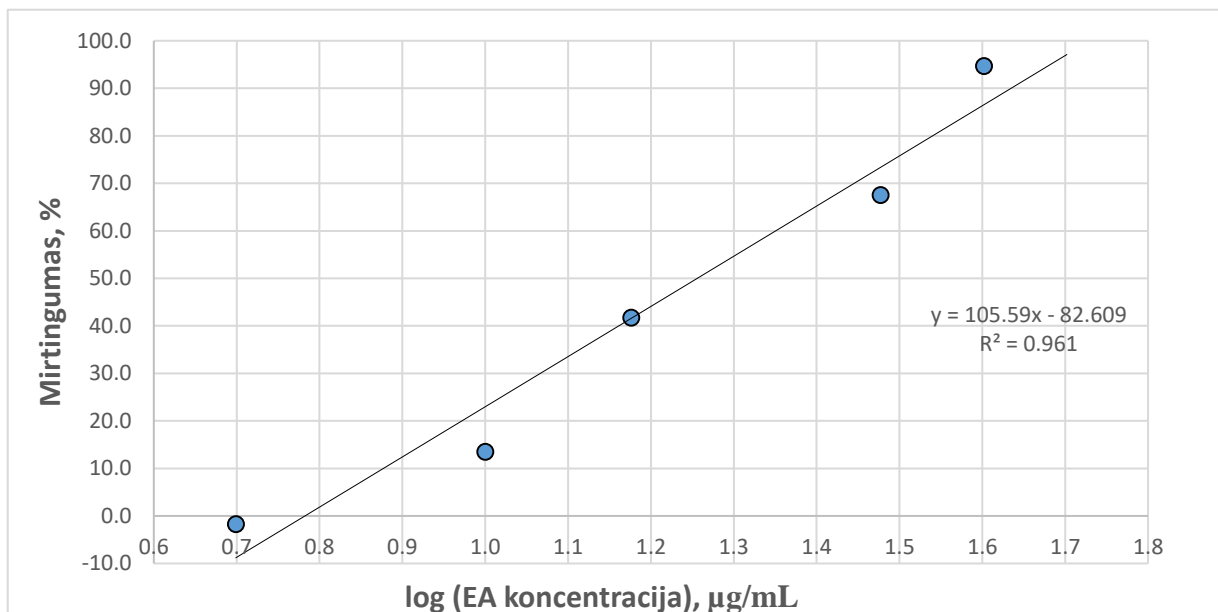
Nešančios dujos	Helis
Dujų srauto greitis	1ml/min
Temperatūrinis režimas	50 °C $\xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 160 °C $\xrightarrow{10^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 250 °C 1min 2min 4min
Injekcijos tūris	2μL
Garintuvo temperatūra	250 °C
Analizės trukmė	38min
Jonų šaltinio temperatūra	220 °C
Jonizacijos jėga	70eV
Skenuojama diapazone	33-400mz, kas 0,2 sek 2000 greičiu

2.3.5 Kokybinis eterinio aliejaus junginių nustatymas

Kokybinė eterinio aliejaus analizė atliekama analizuojant MS spektrus. Remiamasi kompiuterine programa, kuri pagal esančią masių spektrų bibliotekas („Willey“; „Flavour and fragrance natural and synthetic compounds“ bei „National institute of standards and technology“ (NIST)) pateikia geriausią junginio atitikmenį, kartu remiamasi žinyne [54] pateikta informacija: būdingais spektrais bei analičių sulaikymo indeksais. Identifikuoti junginiams dar yra atsižvelgiama į jų sulaikymo trukmę ir į literatūriniuose šaltiniuose pateiktus duomenis. Peržvelgus ir įvertinus šią visą informaciją yra nusprendžiama koks junginys yra gautas kiekviename masių spektre.

2.4 Toksiškumo testas

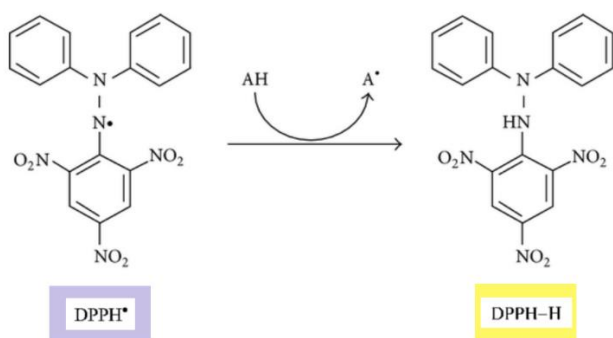
1. Paruošiamas jūros vanduo 38 g jūros druskos ištirpinant 1 litre geriamo vandens. Į atskirą indą įdedama krevečių kiaušinėlių (*Artemia sp*) ir ant jų atsargiai užpilama paruošto jūros vandens. Kad išsiritų krevečių lervos, kiaušinėliai paliekami jūros vandenyje 48 valandoms šiltoje patalpoje (apie 25°C).
2. Pasiruošiami skirtingos koncentracijos Italinio šlamučio EA tirpalai naudojant dimetilsulfoksido (DMSO) tirpalą. Skiedimo būdu pagaminami 5µg/ml, 10µg/ml, 15µg/ml, 30µg/ml, 40µg/ml koncentracijos EA tirpalai.
3. Po dviejų dienų, išsiritus krevečių lervoms, ruošiami atskiri bandiniai analizei. Bandymo serijai (vienam EA koncentracijos tyrimui) yra paruošiamos keturios atskiros stiklinėlės. Jos yra užpildomos 4 ml jūros vandens, į jį naudojant pipetę suleidžiamas tikslus kiekis krevečių lervų (10-13 vienetų) ir iš karto po to stiklinėlė pripildoma jūros vandeniu iki 5ml. Atitinkamai į kiekvieną paruoštą bandinio seriją suleidžiami 5µg/ml, 10µg/ml, 15µg/ml, 30µg/ml, 40µg/ml koncentracijos Italinio šlamučio EA tirpalai.
4. Kartu su EA bandymų serijomis, lygiagrečiai paruošiamos dvi kontrolinės bandinių serijos, užpildant po tris stiklinėles po 5ml jūros vandeniu ir dimetilsulfoksido (DMSO) tirpalu ir į juos pipete įleidžiant tikslų kiekį krevečių lervų. Viso tyrimo metu atidžiai prižiūrimas jūros vandens lygis stiklinėlėse, siekiant išvengti jūros vandens koncentracijos svyravimų, kurie galėtų turėti įtakos krevečių augimui.
5. Krevečių lervos su skirtingomis EA koncentracijomis bei kontrolinės bandinio serijos paliekamos 24 valandoms, po kurių skaičiuojama, kiek liko gyvų krevečių lervų kiekvienoje stiklinėlėje. Pagal gautus rezultatus atliekami skaičiavimai ir sudaroma kalibracinė kreivė.



8 pav. Krevėčių lervų mirtingumo priklausomybė nuo logaritminės Italinio šlamučio EA koncentracijos

2.5 Antioksidacinio aktyvumo tyrimas DPPH⁺ metodu

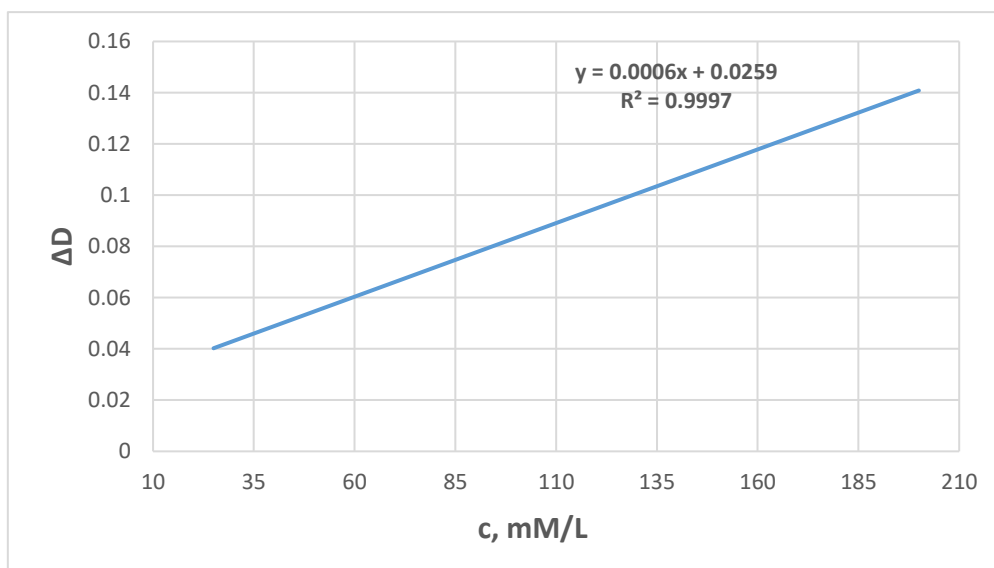
Antioksidacinio aktyvumo tyrimas buvo atliktas *Helichrysum italicum* ir *Artemisia absinthium* EA spektrofotometriniu būdu. Tyrimas pagrįstas reakcija, kuri pavaizduota 9 paveiksle. Reakcijos metu violetinės spalvos 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH⁺) radikalas yra surišamas: antioksidantas (AH) perduoda vandenilio atomą nesuporuotam azoto atomui ir stebimas tirpalo spalvos pasikeitimas iš violetinės į švelniai gelsvą spalvą.



9 pav. Supaprastintas DPPH⁺ radikalo surišimo principas

Ruošimas 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH): į tamsaus stiklo 100ml kolbą dedama 0,0236 g DPPH- ir skiedžiama iki 100ml grynu metanoliu (MeOH). Kolba statoma į ultragarsinę vonelę ir joje laikoma 30 minučių. Tirpalas išlieka nepakitęs vieną dieną. Trolokso 97% tirpalas ruošimas: į 100 ml kolbutę dedama 0,005 g Trolox ir skiedžiama iki 100ml MeOH ir distiliuotu H₂O mišiniu (70/30).

Kalibracinė kreivė sudaroma skiedimo būdu ruošiant skirtingų koncentracijų trolokso tirpalus (100; 50; 25; 12,5%). Į kiuvetę įpilama 0,1mL atitinkamos koncentracijos trolokso ir 3,9mL DPPH tirpalo. Užpildžius kiuvetes laukiama 30min ir matuojamas optinis tankis esant $\lambda=515\text{nm}$. Visos bandymų serijos kartojamos tris kartus.



10 pav. Trolokso ekvivalento kalibracinė kreivė

Antioksidacinio aktyvumo tyrimas buvo atliktas *Helichrysum italicum* ir *Artemisia absinthium* EA. Tyrimui tirpalai buvo ruošiami: 50 μL *H. italicum* EA ištirpinama 10mL MeOH ir 100 μL *A. absinthium* EA ištirpinta 10mL MeOH.

2.6 Antioksidacinių savybių nustatymas elektrocheminiu metodu

Elektrocheminis tyrimas atliekamas naudojant diferencinę impulsinę voltamperometriją. Analizės metu registruojamas srovės stiprio padidėjimas, jei tiriamajame tirpale/ekstrakte yra elektrochemiškai besioksiduojančių medžiagų.

Antioksidacinio aktyvumo tyrimas atliekamas celėje naudojant 3 elektrodų sistemą:

1. Didelio paviršiaus nesipolarizuojančio pagalbinio elektrodo. Naudotas Pt elektrodas.
2. Didelio paviršiaus nesipolarizuojančio lyginamojo elektrodo. Naudotas sidabro-sidabro chlorido elektrodas panardintas į 3 mol/l NaCl ($\text{Ag/AgCl/NaCl}_{3 \text{ mol/l}}$)
3. Indikatorinio elektrodo. Naudotas anglies pastos elektrodas suteikiamas potencialų intervalas nuo -250mV iki 250mV,

Analizei atlikti turi būti pasiruošiama:

- Augalų ekstraktai: atsisverinama 5g žaliavos, ant jos užpilama 50mL KCl (0,1M) tirpalo ir mišinys dedamas į ultragarsinę vonelę 30minučių. Iš viso buvo paruošta 10 ekstraktų. Kiečių– karčiojo, dirvonio ir paprastojo ekstraktai (Pasvalio ir Rokiškio

raj.), paprastojo kaštono žiedų ekstraktai (Vilniaus ir Pasvalio raj.), smiltyninio šlamučio žiedų ir stiebų ekstraktai.

- Grafito pasta: 200mg grafito miltelių grustuvėlėje ištrinama su 100 μ L parafininės alyvos.
- Darbinis elektrodas: kaip pagrindas naudojama varinė viela įvilta į plastmasinį apvaskalą. Konstruojant elektrodą plastmasinis apvaskalas yra pastumiamas aukštyn, tokiu būdu gaunama tuščia ertmė-šulinėlis, kurio gylis apie 3-4mm. Stengiantis išlaikyti kiek įmanoma panašesnę paviršiaus plotą, šulinėlio gylis sumažinamas (nupjaunant dalį plastmasinio apvaskalo) iki 2mm. Į šią ertmę rankiniu būdu prikemšama grafito pastos, gautas paviršius išlyginamas švelniai nušlifuojant paviršių.

Matavimui atlikti į elektrocheminę celę supilamas paruoštas ekstraktas, įstatoma elektrodų sistema, suteikiamas potencialų intervalas nuo -200mV iki 1000mV, sklaidimo dažnis 25Hz, žingsnis 4mV, amplitudė 50mV, paleidžiamas matavimas ir kompiuterio programoje braižoma voltamperograma.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Žaliavos surinkimas

Vaistinių augalų žaliava buvo surinkta skirtinguose rajonuose išsidėsčiusiuose rytinėje Lietuvos dalyje. Vietovės nurodytos žemiau pateiktame žemėlapyje (11pav) taip pat toliau pateikiama lentelė (nr.2) , su informacija, kokia konkrečiai žaliava buvo surinkta atitinkamoje vietoje.



11 pav. Vietovės Lietuvos teritorijoje, kuriose buvo renkami vaistiniai augalai

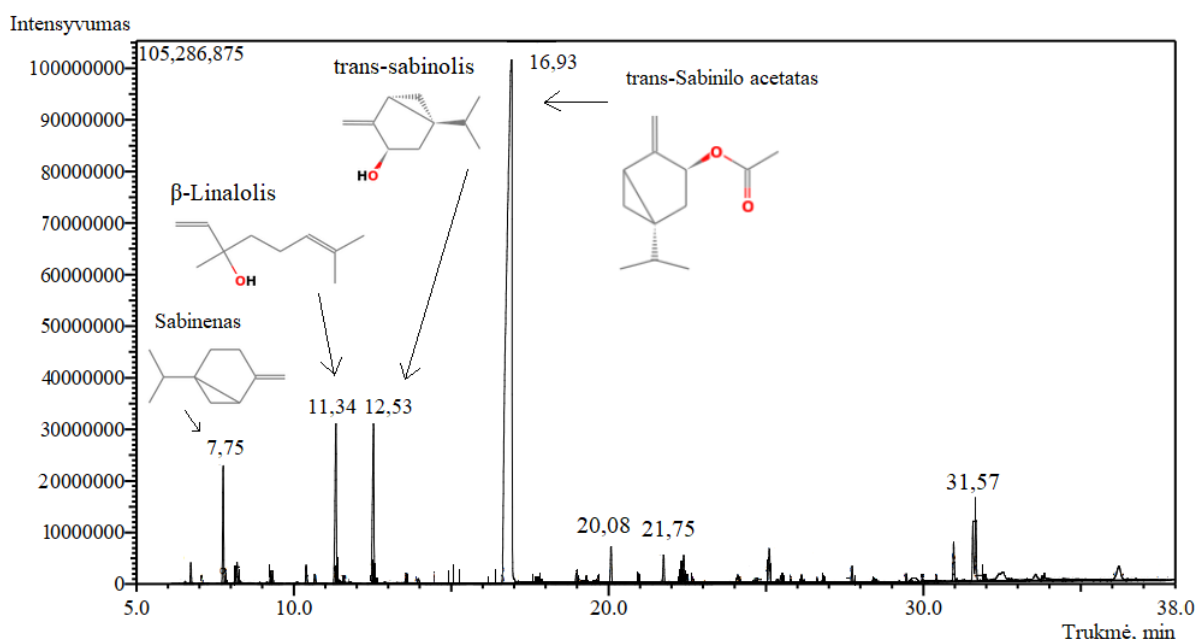
Vietovės pavadinimas	Vaistinio augalo pavadinimas
Kaštonų g., Pasvalio r.	Paprastasis kaštonas
Avižienių mokyklos teritorija, Vilniaus r,	Paprastasis kaštonas
Alekņų k., Rokiškio r.	Kiečiai: kartusis, paprastasis ir dirvoninis
Kalno k., Pasvalio r.	Kiečiai: kartusis, paprastasis ir dirvoninis
Sudeikiai, Utenos r.	Smiltyninis šlamutis

2 lentelė. Vietovių pavadinimai, kuriose buvo renkami vaistiniai augalai

Pastaba: italinio šlamučio žaliava (žiedai) buvo įsigyta Italijoje, vaistinėje. Gamintojas: „Farmalabor, farmacisti associati, elicriso fiori t.t.“ pavadinimas: „*Helichrysum italicum* flowers cut“.

3.2 *Artemisia* genties augalų *A. absinthium*, *A. vulgaris*, *A. campestris* eterinių aliejų sudėtis nustatymas

Analizuojant vaistinių augalų EA mokslinę literatūrą galima nesunkiai pastebėti, kad EA sudėtis priklauso ne tik nuo augalo genties ar rūšies, tačiau ir nuo augavietės, kurioje surinkta žaliava buvo naudota EA išgauti. Norint išvelgti ir palyginti EA sudėtis skirtumus, žaliava buvo renkama žydėjimo periodu skirtingose augavietėse. Kokybinė ir kiekybinė aliejų analizė atlikta naudojant GC-MS metodą, tyrimo metu identifikuoti kiekvieno augalo aliejui būdingi junginiai. Žemiau pateikiama karčiojo kiekio (Rokiškio raj.) EA chromatograma su struktūrinėmis formulėmis junginių, kurių procentinė dalis buvo didžiausia.



12 pav. Karčiojo kiekio (Rokiškio raj.) eterinio aliejaus chromatograma

Identifikuoti būdingi junginiai, kurių procentinė dalis daugiau nei 0,50%, pateikti 3 lentelėje, kartu pateikiama junginio sulaikymo trukmė (t_R), Kovačo sulaikymo indeksai (SI). Taip pat 1 priede pateikiama pilna lentelė su visais identifikuotais junginiais, jų procentinėmis dalimis, SI, t_R . Žemiau pateiktoje lentelėje aliejai, išgauti iš tam tikros žaliavos atitinkamai pažymėti: *Artemisia absinthium*: AAr (Rokiškio raj.), AAp (Pasvalio raj.); *Artemisia vulgaris*: AVr (Rokiškio raj.), AVp (Pasvalio raj.); *Artemisia campestris*: ACr (Rokiškio raj.), ACp (Pasvalio raj.).

Junginys	SI	AAr	AAp	AVr	AVp	ACr	ACp	t_R
α -Tujenas	931	–	–	2,57	–	–	–	6,55
α -Pinenas	939	0,42	0,37	2,54	0,15	3,83	1,82	6,7-7,1
Kamfenas	953	0,01	–	1,51	–	–	0,03	7,11
Sabinenas	976	2,44	1,15	7,45	0,34	0,36	0,21	7,75
β -Pinenas	980	0,16	0,14	0,65	–	2,31	6,74	7,85
β -Mircenas	991	0,50	0,52	–	–	0,94	0,53	8,2
Yomogi alkoholis	998	–	–	–	5,86	–	–	8,47

Junginys	SI	AAr	AAp	AVr	AVp	ACr	ACp	t _R
Dekanas	999	–	–	–	–	0,80	–	8,49
α-Terpinenas	1018	–	–	2,82	–	–	–	8,92
o-Cimenas	1022	0,05	0,54	–	–	3,41	2,19	9,15
p-Cimenas	1026	–	–	2,11	–	–	–	9,18
Limonenas	1031	–	–	–	–	1,88	1,51	9,28
1,8-Cineolis	1033	0,31	0,66	19,01	9,25	0,74	–	9,3-9,4
cis-β-Ocimenas	1040	–	–	0,06	–	0,66	–	9,79
Artemizija ketonas	1062	–	–	–	7,04	–	–	10,08
γ-Terpinenas	1062	0,05	0,07	4,41	–	1,07	–	10,10
Cis-Sabineno hidratas	1068	0,47	0,01	1,67	0,75	–	–	10,39
Artemizija alkoholis	1083	–	–	–	1,69	–	–	10,75
Terpinolenas	1088	0,02	0,05	1,03	–	–	–	10,95
trans-Sabineno hidratas	1097	–	–	1,46	1,47	–	–	11,28
β-Linalolis	1098	5,12	1,17	–	–	0,33	0,28	11,34
Undekanas	1099	–	–	–	–	0,61	–	11,42
cis-Tujonas	1102	0,01	1,21	–	1,76	0,72	–	11,47
Izoforonas	1118	–	–	–	1,52	–	–	11,82
Chrizantenonas	1123	–	–	–	9,63	–	–	11,92
trans-Pinocarveolis	1139	–	–	–	–	0,53	0,33	12,49
Kamparas	1143	–	–	6,25	17,73	–	–	12,49
trans-Sabinolis	1140	5,25	5,89	–	–	–	–	12,53
trans-Verbenolis	1144	–	–	–	–	0,59	0,04	12,67
Sabina ketonas	1156	–	–	0,63	1,36	–	–	12,95
cis-Chrizantenolis	1162	–	–	0,15	2,13	–	–	13,17
Barneolis	1165	–	–	2,89	6,78	–	–	13,28
4-Terpinolis	1177	0,13	1,13	8,02	6,40	1,66	0,2	13,5- 13,6
p-Cimen-8-olis	1183	–	–	0,12	–	0,56	0,05	13,82
α-Terpineolis	1189	0,16	–	1,19	1,75	0,36	0,14	13,96
Bornilacetatas;	1285	0,03	0,01	0,30	–	1,88	0,21	16,51
trans-Sabinilo acetatas	1291	61,56	59,64	–	–	0,53	0,37	16,7- 16,93
α-Kopainas	1376	–	–	–	–	0,81	0,07	18,96
β-Burbonenas	1384	–	0,59	–	–	–	0,21	19,27
β-Elemene	1391	–	–	2,65	0,52	0,42	0,73	19,54
α-Gurjunenas	1409	–	–	0,70	–	–	–	19,78
trans-Kariofilenas	1419	1,02	0,30	–	–	7,43	1,15	20,08
α-Humulenas	1454	0,15	–	–	–	1,84	0,62	20,93
trans-β-Farnezenas	1458	–	–	–	–	3,28	0,34	20,90
γ-Murolenas	1477	–	–	0,71	2,06	0,82	0,88	21,09
Germakrenas D	1480	–	–	1,89	–	22,79	–	21,61
α-Kurcumenas	1483	–	1,49	–	–	–	0,84	21,66
Viridiflorenas	1493	0,87	0,10	2,24	–	–	2,45	21,75
α-Selinenas	1494	–	–	1,76	–	–	–	21,96
α-Murolenas	1499	–	–	–	–	0,53	–	22,09
γ-Kadinenas	1513	–	–	0,23	–	0,44	0,45	22,37
δ-Kadinenas	1524	–	–	1,38	0,35	1,78	0,33	22,59
trans-Nerolidolis	1564	–	0,12	0,03	–	–	1,28	23,58
Ledolis	1565	–	–	0,61	–	–	–	23,75
Spatulenolis	1576	–	–	1,75	1,11	2,65	4,40	24,39
Kariofileno oksidas	1581	0,51	0,91	1,44	1,32	2,44	8,86	24,2- 24,4
Salvial-4(14)-en-1-onas (Mint ketonas)	?	–	–	0,22	–	1,17	2,86	24,41

Junginys	SI	AAr	AAp	AVr	AVp	ACr	ACp	t _R
Guajolis	1595	–	–	–	–	–	2,07	24,85
β-Kopaen-4-α-olis	1584	–	–	0,71	–	–	–	24,95
Humuleno epoksidai II	1606	–	–	0,10	0,67	0,16	1,44	25,14
1-epi-Kubenolis	1627	–	–	0,60	–	–	–	25,39
α-Akorenolis	1630	–	–	–	–	–	0,61	25,54
epi-α-Kadinolis	1640	–	–	–	–	–	5,03	25,44
epi-α-Murololis	1641	–	–	–	–	0,96	1,40	25,86
Selin-11-en-4-α-olis	1652	–	2,89	–	–	–	–	26,38
α-Kadinolis	1653	–	–	0,09	–	2,60	3,64	25,77
epi-α-Bisabololis	1683	–	4,04	–	–	–	–	26,87
Germakra-4(15),5,10(14)-triene-1-α-olis (?)	1775	–	–	–	–	5,30	4,18	26,92
Fitolis	?	–	–	–	–	0,59	1,10	29,49
Nuciferolio acetatas	?	1,01	–	–	–	–	–	30,97
Heksadekanoinė rūgštis	?	–	–	–	–	4,20	2,96	31,39
cis-Nuciferolis	1758	3,49	1,33	–	–	–	–	31,57
n-Nonadekanas	1900	1,61	0,05	0,02	–	–	0,31	32,53
n-Eikosanai	2000	1,38	0,10	0,22	–	–	–	33,49
Bendras kiekis:		88,12%	86,69%	87,15%	83,19%	84,99%	65,20%	
*Identifikuoti junginiai, kurių procentinė dalis mažesnė nei 0,50% (pateikiami SI didėjimo tvarka): Santolina trienas, Triciklenas, Tuja-2,4(10)-dienas, 1-Okten-3-olis, 3-Okstanolis, α-felandrenas, Silvestrenas, trans-Linalolio oksidas, 2-Nonanolis, α-Thujonas, 1-Okten-3-acetatas, trans-Tujonas, Izo-3-Tujanolis, Nopinonas, cis-Verbenolis, Kamparas, Umbelulonas, Tuj-3-en-10-olis, Cis-piperitolis, Mirtenalis, Mirtenolis, Verbenonas, Trans-Piperitolis, trans-Karveolis, Izobornilo formatas, γ-Izogeraniolis, Heksil 2-metilbutiratas, p-Kumino aldehidai, Karvonai, Geraniolis, Timolis, Trans-Pinokarvilo acetatas, δ-Elemenai, α-Terpinilo acetatas, α-Cubebenai, Nerilo acetatas, α-Ilangenai, Isoledenai, cis-Jazmonai, β-Kubebenai, α-Akoradienai, β-Chamigrenai, Dehidro-Seskvicineolis, α-Kuprenenai, trans-α-Farnesenai, Geranilo butiratas, α-Kadinenai, α-Kalakorenai, β-Kalakorenai, Geranilo izovaleratas, Epiglobulolis, Heksahidrofarnesilo acetatas, n-Heptadekanai, α-trans-Bergamotolis, n-Heneikosanai, n-Dokosanai								

3 lentelė. Identifikuoti *Artemisia* genties augalų EA junginiai

Atlikus EA analizę buvo identifikuoti karčiojo kiekio junginiai, kurių bendras kiekis Rokiškio rajone–88,1% ir Pasvalio rajone– 86,7%. *A. absinthium* aliejuose vyraujantys junginiai yra trans-sabinilo acetatas ir trans-sabinolis, jų kiekiai abiejose augavietėse gana artimai sutampa, Rokiškio ir Pasvalio rajonuose atitinkamai 61,64% ir 59,64% trans-sabinilo acetato, 5,25% ir 5,89% trans-sabinolio. Karčiojo kiekio eteriniai aliejai pagal pirmą vyraujančią komponentą gali būti priskirti trans-sabinilo acetato chemotipui. Karčiojo kiekio aliejams taip pat identifikuoti junginiai, kurie Rokiškio rajone vyrauja didesne procentine dalimi, buvo nustatyta 5,12% β-linalolio, 3,49% cis-nuciferolio, 2,44% sabineno. Pasvalio rajono žaliavoje atitinkamai rasta 1,17% β-linalolio, 1,33% cis-nuciferolio, 1,15% sabineno. Tačiau yra matomi ne tik kiekybiniai, bet ir kokybiniai skirtumai, kadangi AAp aliejus savo sudėtyje turi oksiduotų seskviterpenų selin-11-en-4-α-olio, epi-α-bisabololio bei junginio α-kurkumeno, kurie AAr nebuvo nustatyti net ir mažais kiekiais.

Mokslinėje publikacijoje išleistoje Records of Natural Products žurnale, pateikiamas Lietuvos miestuose– Klaipėdoje ir Druskininkuose surinktų EA tyrimas, didžiausią aliejaus

procentinę dalį taip pat sudarė trans-sabinilo acetatas 33,0-45,2%, o trans-sabinolio rasta 0,4-1,5%, sabineno 1,6-6,5%, linalolio 1,6-2,2% [14]. Svarbu pastebėti, kad šis junginys taip pat vyrauja Estijos ir Latvijos teritorijoje ištirtuose *A. absinthium* aliejuose. Iš Estijos teritorijoje surinktos žaliavos išgauto EA vyraujančio sabinilo acetato procentinė dalis 70,5%, o Latvijoje 23,6% [10].

A. vulgaris aliejai tarpusavyje skiriasi labiau nei *A. absinthium*, kadangi *A. vulgaris* EA neturi būdingo bendro junginio abiems aliejams, kurio procentinė dalis būtų žymiai didesnė lyginant su kitais junginiais. Rokiškio rajone surinktos žaliavos aliejui būdingi junginiai: 1,8-cineolis (19,01%), 4-terpinolis (8,02%), sabinenas (7,45%), kamparas (6,25%), γ -terpinenas (4,41%), barneolis (2,89%), α -terpinenas (2,82%), β -elemenas (2,65%), α -tujenas (2,57%), α -pinenas (2,54%). Pagrindiniai *A. vulgaris* būdingi junginiai Pasvalio rajone: kamparas (17,73%), chrizantenonas (9,63%), 1,8-cineolis (9,25%), artemizija ketonas (7,04%), barneolis (6,78%), 4-terpinolis (6,40%), yomogi alkoholis (5,86%), cis-chrizantenolis (2,13%), γ -murolenas (2,03%).

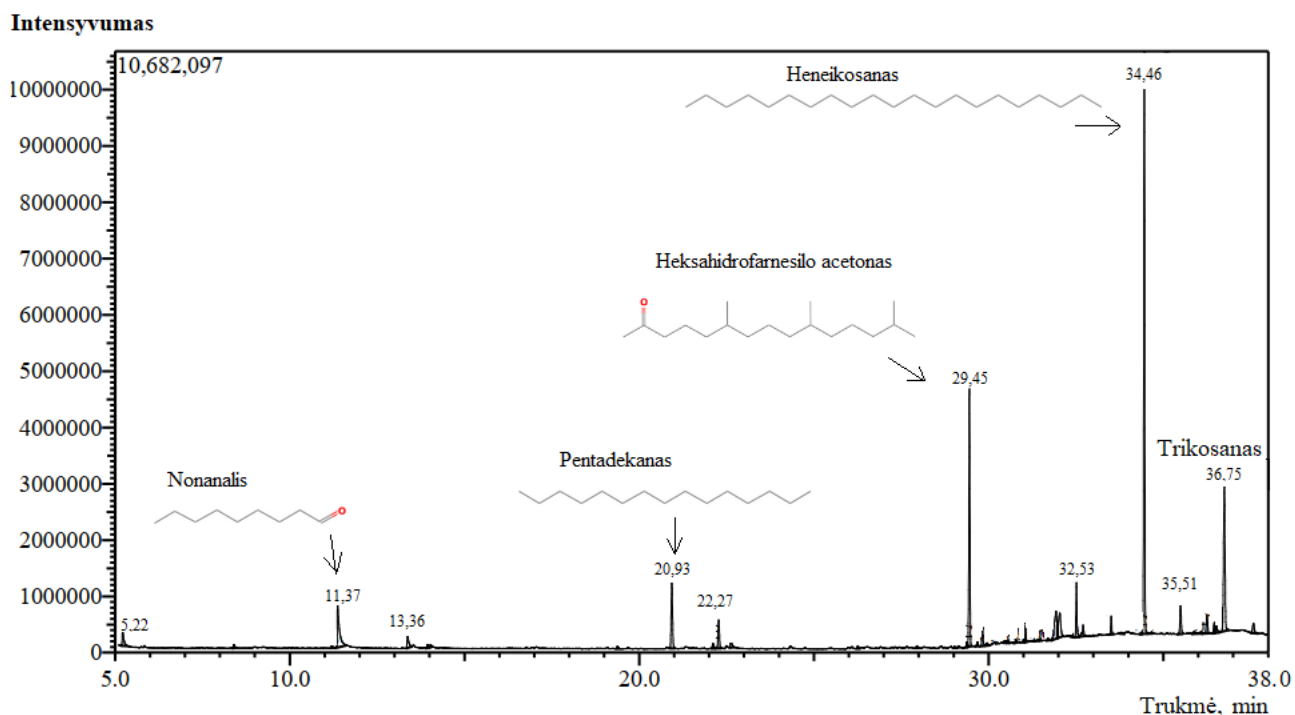
Atlikti moksliniai tyrimai taip pat patvirtina paprastojo kiekio vyraujančių junginių įvairovę. Publikacijoje pateikiama, kad Lietuvoje didžiausią procentinę dalį dažniausia sudaro sabinenas, 1,8-cineolis, trans-tujonas, artemizija ketonas, cis-chrizantenolio acetatas. Prancūzijoje vyraujantys junginiai yra barneolis ir α -tujonas, Italijoje, Sirijoje ir Indijoje - kamparas, Kroatijoje - cis-chrizantenolio acetatas, Kinijoje, Vietname, Serbijoje - 1,8-cineolis [55].

Analizuojant *A. campestris* aliejus, labiausia išsiskyrė Rokiškio rajono žaliava, kuriai nustatyta 22,79% germakreno D ir 7,43% trans- kariofileno. Tuo tarpu kitame aliejuje vyraujantis junginys yra kariofileno oksidas 8,86% ir epi- α -kadinolis 5,03%. Žvelgiant į kitus aliejų junginius matoma, kad dauguma junginių sutampa, labiau varijuoja procentinė jų sudėtis. Dirvoninio kiekio aliejams būdingi β -pineno (2,31-6,74%), spatulenolio (2,65-4,40%), heksadekanoinės rūgšties (2,96-4,20%), α -kadinolio (2,6-3,64%), α -pineno (1,82-3,83%), o-cimeno (2,19-3,41%) junginiai. Išleistoje publikacijoje, kur žaliava buvo renkama kitose Lietuvos vietovėse (Vilnius, Trakai, Klaipėda, Palanga, Šilutė) EA vyraujantis junginys buvo kariofileno oksidas (8,5-38,8%), tačiau visuose aliejuose buvo aptinkamas ir germakrenas D (3,5-15,0%). Kitose šalyse, tokiose kaip Italija, Portugalija, Tunisas, Iranas išgautuose kiekio EA vyraujantys junginiai yra α -; β - pinenai [25].

Bendrai žvelgiant į *Artemisia* genties augalų eterinius aliejus, kuriems išgauti žaliava buvo renkama Lietuvos teritorijoje, matoma, kad visiems aliejams būdingi šie junginiai: α -pinenas, sabinenas, 4-terpinolis, kariofileno oksidas. Gauti duomenys įrodo, kad EA būdingų junginių kompozicija priklauso nuo augalo genties, rūšies taip pat ir nuo pasirinktos augavietės.

3.3 Paprastojo kaštono (*Aesculus hippocastanum* L.) žiedų eterinių aliejų komponentų nustatymas

Šio darbo literatūrinėje dalyje (1.6 skyriuje) plačiai aprašytas paprastojo kaštono ekstraktų gydomasis poveikis. Kartu buvo pastebėta, kad priešingai nei apie *A. hippocastanum* ekstraktus, publikacijų apie šio augalo žiedų EA chemotipus, būdingus junginius, yra vos keletas, ir jos išleistos labai seniai, t.y. 1994 m. Todėl buvo nuspręsta padaryti šių EA analizę, o gauti rezultatai galėtų pasitarnauti ateityje rašant mokslinę publikaciją. Kokybinės ir kiekybinės sudėties tyrimas atliktas naudojant GC-MS metodą. Žemiau pateikiama paprastojo kaštono (Vilniaus raj.) EA chromatograma su struktūrinėmis formulėmis junginių, kurių procentinė dalis buvo didžiausia.



13pav. Paprastojo kaštono (Vilniaus raj.) eterinio aliejaus chromatograma

EA išgauti iš *A. hippocastanum* žaliavos surinktos Pasvalio rajone- AH1; Vilniaus rajone- AH2. Žemiau pateikta 4 lentelė su visais identifikuotais *A. hippocastanum* EA junginiais.

Pavadinimas	SI	AH1, %	AH2, %	t _R
p-Ksilenas	?	0,55	1,35	5,22
n-Nonanas	899	0,19	–	5,83
n-Heptanalis	899	0,28	–	5,88
Izo-Citronelenas	921	0,02	–	6,58
2,6-Dimetilo oktanas	?	0,02	–	6,65
Triciklenas	926	0,02	–	6,69
3-Metilo heptan-4-onas	929	0,18	–	7,14
4-Methylnonane	?	0,05	–	7,36
3-Oktanonas	986	0,12	–	7,98
2-Pentilo furanas	?	0,61	–	8,17
n-Dekanas	999	0,13	0,29	8,37
n-Oktanalis	1001	0,03	–	8,50
o-Cimenas	1022	0,01	–	9,10
Limonenas	1031	0,05	–	9,21
1,8-Cineolis	1033	0,01	–	9,28
Benzaldehidas	1043	0,36	–	9,66
γ-Terpinenas	1062	0,01	–	10,06
cis-Linalolio oksidas	1074	0,07	–	10,47

Pavadinimas	SI	AH1, %	AH2, %	t_R
Trans-linalolio oksidas	1088	0,06	–	10,91
n-Undekanas	1099	0,04	0,19	11,18
Nonanalis	1098	6,01	5,13	11,37
2-Furano acetaldehidus	?	0,06	–	12,45
Borneolis	1165	0,06	–	13,20
Umbelulonas	1171	–	1,22	13,36
Terpin-4-olis	1177	0,01	–	13,51
α-Terpineolis	1189	0,42	0,39	13,90
n-Dodekanas	1199	0,26	0,18	14,02
N-Dekanalis	1204	0,13	–	14,22
Geraniolis	1255	0,07	–	15,64
1H-Indolas	1288	0,23	–	16,87
Metilo tranilatas	1337	0,20	–	18,04
Eugenolis	1356	0,22	–	18,43
β-Damaskenonas	1359	0,15	–	19,07
n-Tetradekanas	1399	0,08	0,16	19,37
n-Dodekanalis	1407	0,12	–	19,64
2-butil-1-Oktanolis	?	0,13	–	20,77
n-Pentadekanas	1500	5,70	5,03	20,93
α-trans-Farnesenas	1508	0,24	0,43	22,10
Butilintas hidroksitoluenas	1512	0,52	2,06	22,27
α-Tujaplikinolis	1538	0,24	–	22,59
n-Tetradecanalis	1611	0,11	–	24,71
Benzofenonas	1628	0,06	–	25,34
α-Kedr-8(15)-en-9-ol	1644	0,11	–	25,63
Trans-metil-dihydrojazmonatas	1680	0,10	–	25,95
2-Heksildekanoilis	?	0,26	–	26,35
Heksil-Salicilatas	1675	0,11	–	26,51
n-Heptadecanalis	1700	0,11	–	26,89
cis-Farnesolis;	1713	0,10	–	27,42
trans-2-heksil-Cinamaldehydas	1745	0,07	0,14	27,93
2-Etilheksilo salicilatas	?	0,17	–	28,92
Heksaahidrofarnesilo acetonas	?	14,10	14,61	29,45
Heksahekanoinė rūgštis	?	16,10	–	31,43
n-Nonadekanas	1900	2,86	2,92	32,53
Fitolis	1944	1,51	0,95	32,72
n-Eikosanas	2000	2,94	0,97	33,55
n-Heneikosanas	2100	20,02	31,62	34,46
n-Dokosanas	2200	2,13	2,20	35,51
Oktadecanalas?	?	0,37	0,24	35,88
2-Metiloktakosanas	2200	1,31	1,44	36,26
n-Trikosanas	2300	7,28	11,91	36,75
Bendras kiekis:		87,54	83,12	

4 lentelė. Identifikuoti *A. hippocastanum* žiedų EA junginiai

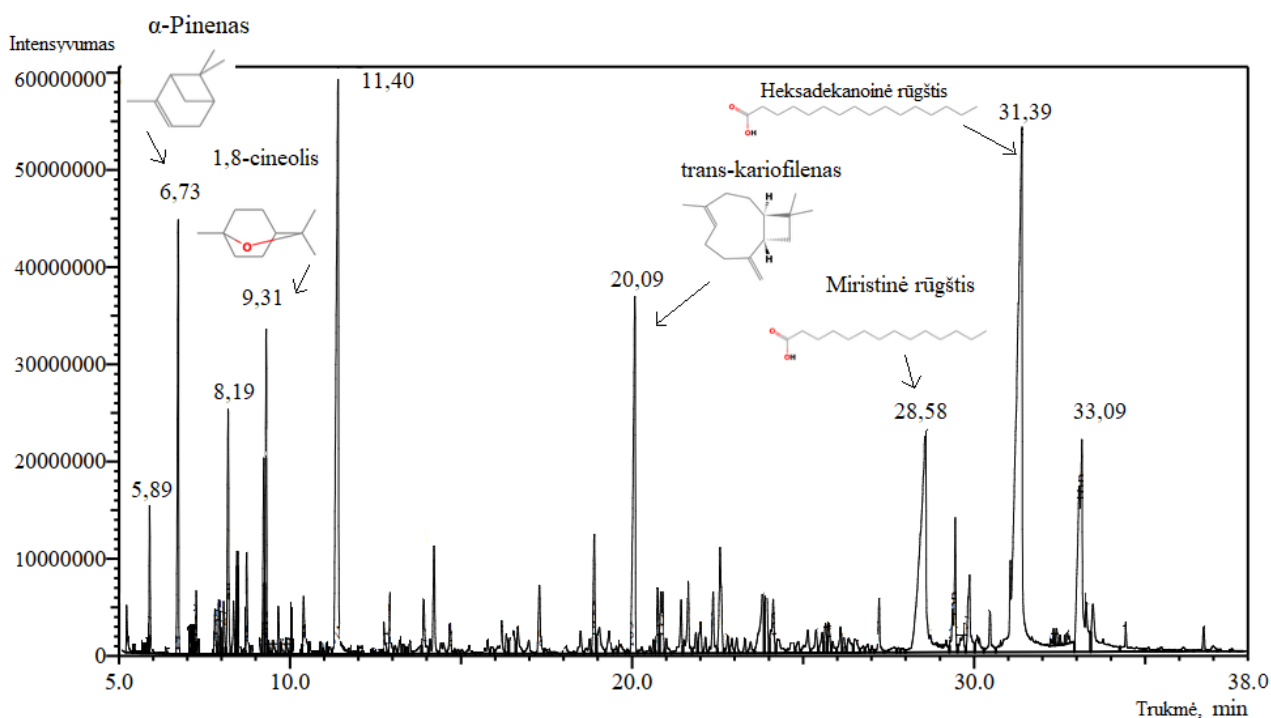
Atlikus EA analizę buvo identifikuotas šešiasdešimt vienas junginys, kurių bendras kiekis Pasvalio rajone–87,5% ir Vilniaus rajone–83,1%. Abiejose augavietėse surinktų kaštonų išgautuose EA didžiausią procentinę dalį sudaro n-heneikosanas: Pasvalio rajone – 20,02%, Vilniaus rajone – 31,62%. Taip pat abiejose augavietėse randamas panašus kiekis heksahidrofarnesilo acetono 14,10% ir 14,61%; nonanalio 6,01% ir 5,13% bei n-pentadekano 5,70% ir 5,03%. EA išgautas iš Pasvalio rajone surinktos žaliavos išsiskira heksadekanoine rūgštimi, kurios buvo rasta 16,10%. Taip pat abiejose žaliavose buvo rasti žymūs kiekiai n-Trikosano: Pasvalio rajone – 7,28%, Vilniaus

rajone – 11,91%. Svarbu paminėti, kad abiejose žaliavose artimais kiekiais aptinkami n-nonadekanas (2,86% ir 2,92%) bei n-dokosanas (2,13% ir 2,20%). Iš gautos sudėties matoma, kad didžiąją dalį sudėties sudaro alifatiniai angliavandeniliai: pentadekanas, nonadekanas, eikosanas, heneikosanas, dokosanas, trikosanas, taip pat alifatinis aldehidas nonanalis bei alifatinė rūgštis heksadekanoinė rūgštis.

3.4 *Helichrysum genties* augalų *H. arenarium* ir *H. italicum* eterinių aliejų sudėties nustatymas

Atliktos Lietuvoje augančio smiltyninio šlamučio ir vaistinėje pirktu italiniu šlamučio EA analizės. Tyrimams buvo tikslingai pasirinkta skirtingose regionuose auganti žaliava, kad būtų galima palyginti aliejų kompoziciją bei išgavą. Taip pat iš smiltyninio šlamučio žaliavos buvo gauti žiedų ir stiebų EA. Ankstesni šio darbo tyrimai parodė, kad EA sudėtis priklauso nuo augalo genties, rūšies, augavietės, kurioje buvo renkama žaliava. Todėl planuojant eksperimentus buvo daroma prielaida, kad skirtingose augalo dalyse turėtų kauptis skirtingi biologiškai aktyvūs junginiai ir buvo tikimasi išvelgti kokybinius ir kiekybinius skirtumus.

Kokybinė ir kiekybinė aliejų analizė atlikta naudojant GC-MS metodą. Žemiau pateikiama *H. arenarium* EA chromatograma su kai kuriomis junginių struktūrinėmis formulėmis.



14 pav. Smiltyninio šlamučio stiebų eterinio aliejaus chromatograma

Žemiau pateikta lentelė nr.5 su identifikuotais *Helichrysum* genties EA junginiais. *H. arenarium* žaliavos žymėjimas: HAs- stiebai, HAz- žiedai (Sudeikiai), *H. Italicum* žymėjimas: HI. Pilna lentelė su visiems junginiams būdingais SI ir t_R pridedama 2 priede.

Junginys	SI	HAs,%	HAz,%	HI,%	t _R
Heptanaldehydas	–	0,86	0,13	–	5,89
α-Pinenas	939	2,91	0,15	6,47	5,90-6,73
2-Pentilo furanas	998	1,87	0,81	–	8,19
trans-2-(2-Pentenilo)furanas	?	0,63	0,16	–	8,45
n-Oktanalis	1001	0,63	0,19	–	8,48
Limonenas	1031	1,56	0,14	1,58	9,24
1,8-Cineolis	1033	1,99	0,04	–	9,31
Linalolis	1098	–	0,17	2,10	10,88
Kamparas	1143	–	–	0,45	10,93
n-Nonanalis	1098	8,15	0,39	–	11,40
cis-2-Nonenalis	1162	0,54	0,24	–	12,93
α-Terpineolis	1189	0,66	0,29	0,80	13,92
n-Dekanalis	1204	1,14	0,46	–	14,22
Nerolis	1255	–	–	1,27	15,47
Perilo aldehydas	1271	0,47	–	–	16,19
Pelargonio rūgštis	1280	0,60	–	–	16,54
Trans-Anetolis	1283	–	–	1,06	16,58
(trans,trans)-2,4-Dekadienalis	1314	0,81	–	–	17,29
α-Kopaenas;	1376	1,19	0,71	–	18,90
Dekano rūgštis	?	0,58	0,62	–	19,05
Damaskenonas	1380	–	0,34	–	19,07
α-Funebrenas	1397	–	–	0,72	19,22
Tetradekanas	1400	–	0,84	–	19,37
Italicenas	1401	–	–	2,17	19,51
Heksahidropseudoionanas	?	0,1	–	–	19,55
n-Dodekanalis	1407	0,23	0,26	–	19,65
cis-α-Bergamotenas	1415	–	–	0,18	19,76
trans-Kariofilenas	1418	4,38	3,20	3,28	20,09
trans-α-Bergamotenas	1436	–	–	0,72	20,31
Aromadendrenas	1439	0,10	0,05	0,77	20,53
cis-Geraniolio acetonas	1453	0,66	0,24	–	20,75
Humulenenas	1454	–	0,46	–	20,80
β-trans-Farnesenenas	1458	1,04	–	–	20,85
Akoradienas	1463	–	–	0,53	21,00
γ-Murolenas	1477	0,63	0,25	–	21,44
γ-Kurkumenenas	1480	–	–	21,45	21,51
β-trans-Jononas	1485	0,87	0,11	–	21,65
β-Selinenas	1485	–	–	13,55	21,46
α-Selinenas	1494	–	–	8,13	21,71
γ-Kadinenas	1513	0,69	0,29	0,82	22,38
δ-Kadinenas	1524	1,41	0,83	1,30	22,58
6,11-Oksido-akor-4-dienas	1531	–	–	0,58	22,63
Kariofileno alkoholis	1568	1,36	–	–	23,82
Lauro rūgštis	1568	1,07	5,09	2,98	23,94
Spatulenolis	1576	–	–	1,04	24,05
β-Kariofileno oksidas	1581	0,82	0,33	1,01	24,13
Heksadekanas	1600	–	0,56	–	24,31
β-Eudesmolis	1649	–	–	8,34	26,01
α-Kadinolis	1653	0,33	0,45	–	26,09
Juniperio kamparas	1691	–	–	4,42	27,33
Guajolio acetatas	1724	–	–	0,84	27,47
Miristinė rūgštis	1749	8,44	13,18	–	28,58

Junginys	SI	HAs,%	HAz,%	HI,%	t _R
Heksahidrofarnesilo acetonas	?	1,42	2,38	–	29,39
n-Oktadekanas	1800	–	0,62	–	30,17
Heksadekanoinė rūgštis	?	19,16	21,39	–	31,39
Linolo rūgšties metilo esteris	?	5,83	5,27	–	33,09
n-Eikosanai	2000	1,62	0,57	–	33,49
α-Kaurenai	2034	–	–	0,71	33,75
n-Heneikosanai	2100	0,59	2,21	0,24	34,45
n-Dokosanai	2200	0,13	0,84	0,29	36,13
n-Trikosanai	2300	0,29	3,84	–	36,72
Bendras kiekis:		84,55%	73,75%	89,02%	

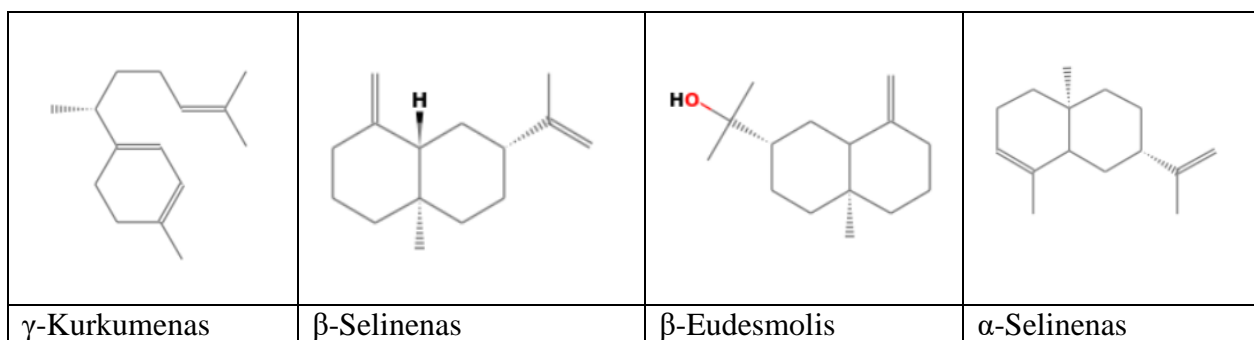
***Identifikuoti junginiai, kurių procentinė dalis mažesnė nei 0,45% (pateikiami SI didėjimo tvarka):** 2-Heptanalis, n-Nonanas, Kamfenas, β-Pinenas, 1-Okten-3-olis, 2-metil-3-Oktanonas, Sulkatonas, α-Terpinenas, p-Cimenas, 2,2,6-metil-cikloheksanonas, Okt-3-en-2-onas, Fenilo acetaldehidai, Acetofenonas, Terpinolenas, 2,5-metil-stirenas, α-Ciklocitralis, α-Kamfenolis, 2,6-Nonadienalis, Borneolis, trans-1,3,5-Undekatrienas, Terpinen-4-olis, cis,trans-1,3,5-Undekatrienas, n-Octanoinė rūgštis, n-Dodekanas, β-Šafranalai, n-Nona-2,4-dienalis, cis-3-Heksenilo valeratas, Cumino aldehidai, (Z)-2-Dekanalai, Nonanoinė rūgštis, 2-Undekanonas, Trans-cis-2,4-Dekadienalis, Tridekanas, Trans-2-tret-butil-cikloheksanolio acetatas, Eugenolis, Ciklosativenas, Dekanoinė rūgštis, α-Ilangenas, Damaskenonas, Heksahidropseudojonanas, n-Dodekanalis, cis-α-Bergamotenas, α-trans-iononas, γ-Dekalaktonas, Pentadekanas, α-Murolenas, Tridecinaldehidai, Butilintas hidroksitoluenas, cis-Kalamenenas, trans-kadina-1,4-dienas, α-Kadinenas, β-Kalakorenas, Trans-Nerolidolis, Tetradekanalis, Humuleno epoksidai II, 1,10-di-epi-Kubenolis, epi-α-Kadinalai, 1-epi-Kubenolis, α-Murololis, Metilo tetradekanoatas, n-Nonadekanas, Izofitolis,

5 lentelė. Identifikuoti *H. arenarium* ir *H. Italicum* EA junginiai

H. arenarium stiebų EA identifikuotų junginių bendras kiekis sudaro 84,6%. Pagrindiniai nustatyti junginiai, kurie sudaro didžiausią procentinę dalį heksadekanoinė rūgštis 19,16%, miristinė rūgštis 8,44%, n-nonanalis 8,15%, linolo rūgšties metilo esteris 5,83%, trans-kariofilenas 4,38% ir α-pinenas 2,91%. Žieduose kaip ir stiebuose buvo nustatyti heksadekanoinė rūgštis 21,39%, miristinės rūgštis 13,18%, linolo rūgšties metilo esterio 5,27% ir trans-kariofileno 3,20% junginiai, bendras nustatytas kiekis – 73,8%. Kaip ir buvo tikėtasi nesunkiai galima išvelgti kiekybinius junginių skirtumus. Žiedai turi daugiau alifatinių angliavandenilių: heneikosano ir trikosano, o stiebai – nonanalio, dekanalio ir eikosano. Stiebai pasižymi didesniu monoterpenoidų: α-pineno, limoneno ir 1,8- cineolio kiekiu, o žiedai turi didesnę kiekį lauro rūgštis. Žieduose buvo rasta daugiau alifatinių junginių, kadangi natūraliai juose yra vaškų, kurie taip pat lemia EA sudėtį. Toliau galima išvelgti kokybinius skirtumus, tačiau jie būdingi junginiams, kurių procentinės dalys yra mažesnės nei 1%. Publikacijoje, kuroje buvo tiriama Lietuvos teritorijoje surinktų *H. arenarium* žiedų EA sudėtis, didžiausią procentinę dalį sudarė oktadekanas, heneikosanas, γ-kadinenas, δ-kadinenas, β-kariofilenas, 1,8-cineolis [39].

Bendras nustatytų junginių kiekis *H. Italicum* žiedų EA 89,0%. Italinio šlamučio aliejus savo sudėtyje turi 21,45% γ-kurkumeno, 13,55% β-selineno, 8,34% β-eudesmolio, 8,13% α-selineno,

6,47% α -pineno, 4,42% juniperio kamparo. Mokslinėje literatūroje pateikiamuose tyrimuose dažniausiai vyraujantys junginiai yra nerilo acetatas (5,6-45,9%) ir α -pinenas (4,1-53,5%) [56]. Tačiau *H. Italicum* žiedų EA nustatyti junginiai itin sutampa su I. M. Fortunato, C. Montemurro *et al.* publikacijoje pateiktais rezultatais. Straipsnio autoriai surinko žaliavą iš 20 skirtingų vietų Italijoje ir Korsijoje, ir ištyrė gautus EA. Visuose aliejuose vyravo γ -kurkumeno(2,3- 41,0%), β -selineno (2,3-38%), α -selineno(0,8-26,5%), taip pat 17 aliejų savo sudėtyje turėjo italiceno (0,6-6,5%) [57]. *H. Italicum* žiedų aliejuje taip pat buvo identifikuotas italicenas, kuris sudaro 2,17% bendro kiekio.

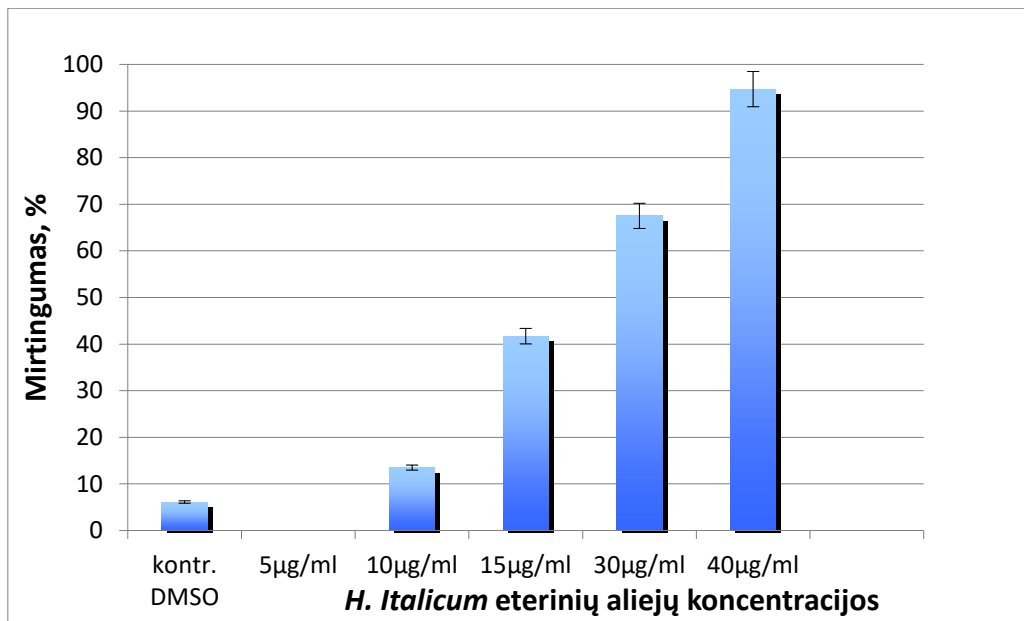


15pav. *H. Italicum* eteriniame aliejuje nustatytų junginių struktūrinės formulės, kurių rastas kiekis buvo didžiausias

Žvelgiant į abi *Helichrysum* žiedų EA matoma panašumų, aliejams būdingi trans-kariofileno, δ -kadineno, lauro rūgšties, ir kt. junginiai. Tačiau lyginant vyraujančius junginius matomi didesni skirtumai, italiniam šlamučiu būdingi seskviterpenai γ -kurkumenas, β -; α -selinenui, o smiltyniniam šlamučiu alifatiniai junginiai: heneikosanas, eikosanas, miristinė ir heksadekanoinė rūgštys.

3.5 Toksiškumo nustatymas Italinio šlamučio eteriniams aliejams

Moksliniuose straipsniuose pateikiama, kad italinis šlamutis pasižymi antioksidacinėmis, antimikrobinėmis, antibakterinėmis, priešuždegiminėmis, insekticidinėmis savybėmis. Šios savybės yra ištirtos ir įrodytos atliekant įvairius tyrimus su mikroorganizmais ir laboratoriniais gyvūnais. Šias savybes nulemia žaliavoje esančių biologiškai aktyvių junginių kokybinė ir kiekybinė sudėtis. Toksiškumo testas buvo atliktas pagal 2.4 aprašytą metodiką *H. Italicum* eteriniam aliejui, kurio sudėtis pateikta 5 lentelėje. Tyrimui atlikti buvo pasirinktos skirtingos 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$ italinio šlamučio EA tirpalų koncentracijos, kuriomis buvo veikiamos (*Artemia sp*) krevečių lervos. Gauti rezultatai pateikti 16 paveikslo diagramoje, didžiausias krevečių lervų mirtingumas– 94,7% užfiksuotas esant didžiausiai EA tirpalo koncentracijai– 40 $\mu\text{g/ml}$. Naudojantis 2.6 metodikoje pateikta kalibracine kreive apskaičiuota LC_{50} reikšmė– 18,2 $\mu\text{g/ml}$ ir LC_{90} reikšmė– 47,9 $\mu\text{g/ml}$.



16 pav. Krevečių lervų mirtingumas veikiant skirtingomis *H. italicum* EA koncentracijomis

Moksliniai straipsniai pateikia išvadas, kad EA pasižymintys dideliais α -pineno ir sabineno arba tik dideliais α -pineno kiekiais slopina bakterijų, grybų ir mielių augimą [48]. Yra manoma, kad deguonies atomus turintys junginiai tokie kaip nerilo acetatas, geraniolo acetatas, geraniolis, nerolis yra atsakingi už antimikrobinį aktyvumą [47]. Šio darbo literatūrinėje dalyje (1.8.1) aprašytame toksiškumo tyrime *A. albopictus* lervos buvo veikiamos italinio šlamučio EA, turinčiu 10,05% geraniolo acetato, 5,04% nerolio, 4,91% nerilo acetato ir 3,78% α -pineno. Straipsnyje buvo nurodoma, kad α -pinenas turi toksiškumą nulėmiančių savybių [50]. Atliktas tyrimas patvirtino *H. Italicum* EA toksiškumą. Kadangi aliejus savo sudėtyje turi 6,47% α -pineno, atsižvelgiant į literatūros duomenis, galime teigti, kad šis junginys nulėmė toksines EA savybes, tačiau įtakos galėjo turėti ir nerolis, kuris sudarė 1,27% aliejaus sudėties.

3.6 Antioksidacinio aktyvumo tyrimai

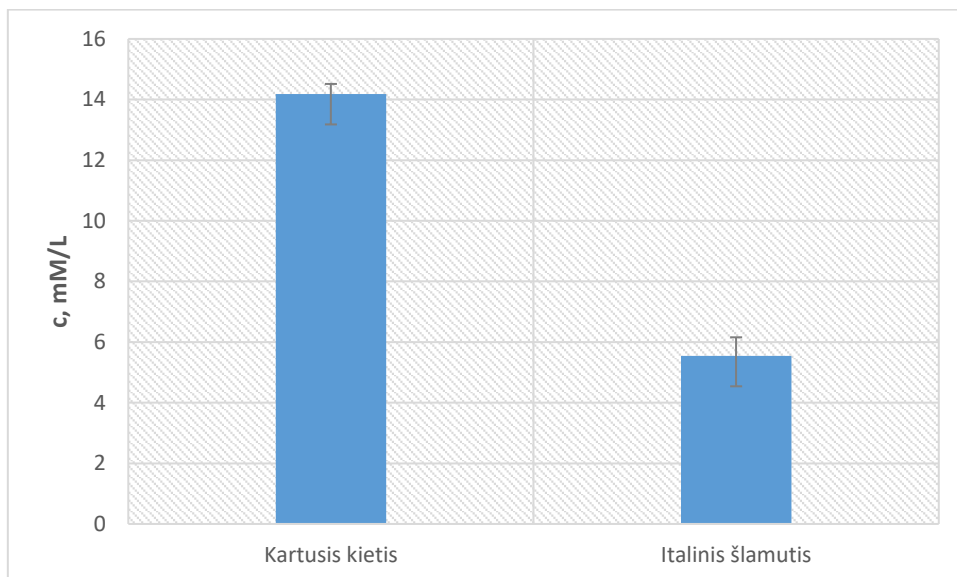
3.6.1 Antioksidacinio aktyvumo tyrimas spektrofotometrinio metodu, panaudojant DPPH⁺

Antioksidantai dažnai apibrėžiami kaip molekulės galinčios reaguoti su radikalais, taip pat, kaip junginiai, slopinantys arba atitolinantys oksidacinius procesus. Eteriniuose aliejuose antioksidacines savybes nulėmia fenoliniai junginiai, tokie kaip timolis, α -takoferolis, mentolis, 1,8-cineolis, p-cimenas ir kiti [58]. Yra žinomi ir stipriomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys ir efektyviai veikiantys sintetiniai antioksidantai tokie kaip butilhidroksianizolis, butilhidroksitoluenas, propilgalatas. Tačiau yra įtariama, kad jie gali būti kenksmingi žmogaus sveikatai t.y. slopinti imuninę sistemą, kauptis riebaliniame audinyje. Dėl šios priežasties yra tiriami EA ir ieškoma natūralios kilmės antioksidantų [59]. Antioksidacinio aktyvumo tyrimas buvo

nuspręstas atlikti aliejams, kurių gauta išgava buvo didžiausia, todėl pasirinkti karčiojo kiečio (Pasvalio raj.) ir italinio šlamučio EA, atitinkamai gautos išgavos 5% ir 0,2%.

Tyrimas buvo atliktas pagal 2.5 skyriuje aprašytą metodiką, kurioje taip pat pateikta sudaryta kalibracinė kreivė. Naudojantis kreivės duomenimis apskaičiuotos antiradikalinio aktyvumo vetės: karčiojo kiečio eterinis aliejus– 14,17mM/L, italinio šlamučio eterinis aliejus– 5,54 mM/L. Lyginant šias vertes matoma, kad karčiojo kiečio eterinis aliejus pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei italinis šlamutis. Tokį aktyvumą būtų galima paaiškinti skirtingu kiekiu fenolinių junginių, būdingų kiekvienam aliejui, pavyzdžiui, kartusis kietis turi 1,8-cineolio (0,66%), 4-terpineolio (1,13%), o italinis šlamutis anetolio (1,06%), α -terpineolio (0,80%). Deja ne viskas taip paprasta ir nustatyti, kas lemia antioksidacinį aktyvumą yra gana sudėtinga. Vienoje iš publikacijų tyrimo metu buvo išgautas *Artemisia* aliejus, kurio sudėtį sudarė daugiausia nefenoliniai junginiai, tačiau aliejus vis tiek pasižymėjo antioksidaciniu aktyvumu. Šioje publikacijoje kartu remiantis kitų mokslininkų tyrimais, buvo padaryta išvada, kad *Artemisia* genties eterinių aliejų antioksidacinį aktyvumą galima priskirti ir nefenoliniams junginiams [60]. Peržiūrėjus daugiau mokslinėje literatūroje pateikiamų duomenų, buvo pastebėta, kad antioksidacinį aktyvumą gali lemti, ar sustiprinti ir kiti junginiai tokie kaip α -terpinenas, limonenas, γ -terpinenas, linalolis, linalilo acetatas, β -kariofilenas. Nustatyti antioksidaciniai aktyvumai kiekvienam iš šių junginių taip pat yra skirtingi [61].

Norint detaliau išsiaiškinti išgautų EA būdingas antioksidacines savybes reikėtų atlikti atskirą studiją analizuojant kiekvienos genties vyraujančių komponentų antioksidacinius aktyvumus.

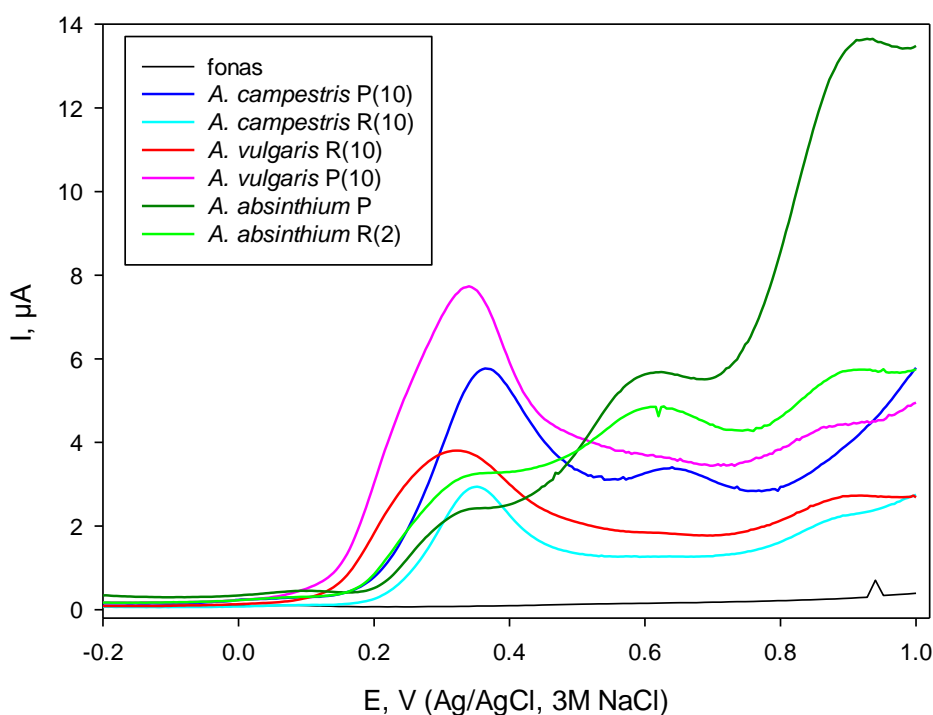


17 pav. Karčiojo kiečio ir italinio šlamučio antiradikalinio aktyvumo vertės

3.6.2 Antioksidacinio aktyvumo tyrimas ekstraktams elektrocheminiu metodu

Naturalūs antioksidantai suteikia naudą žmogaus sveikatai: apsaugo nuo laisvųjų radikalų poveikio, oksidacinio streso. Didelis radikalų kiekis daro neigiamą poveikį žmogaus organizmui: sukelia baltymų, lipidų ir DNR pažeidimus. Augalai – biologiškai aktyvių junginių šaltinis, kuriems būdingos antioksidacinės savybės. Vaistinių augalų ekstraktuose šias savybes gali nulemti flavonoidai, antocianinai, taninai, fenolinės rūgštys, vitaminai, karotinoidai. Identifikuojant junginius, svarbu nepamiršti, kad flavonoidai augaluose dažnai egzistuoja glikozidų ar aglikonų pavidalu [62].

Tyrimui atlikti buvo išgauti Lietuvoje augančių augalų ekstraktai ir kiekvienam iš jų užrašyta diferencinė impulsinė voltamperograma (DIV). Žemiau pateikiamos kiekvieno *Artemisia* genties augalo DIV, prie pavadinimo pateiktas skaičius (2; 10) nurodo, kad ekstraktas buvo skiestas 2 arba 10 kartų, o raidė (R, P) nurodo, kad ekstraktas buvo išgautas iš žaliavos surinktos Pasvalio, Rokiškio rajonuose.

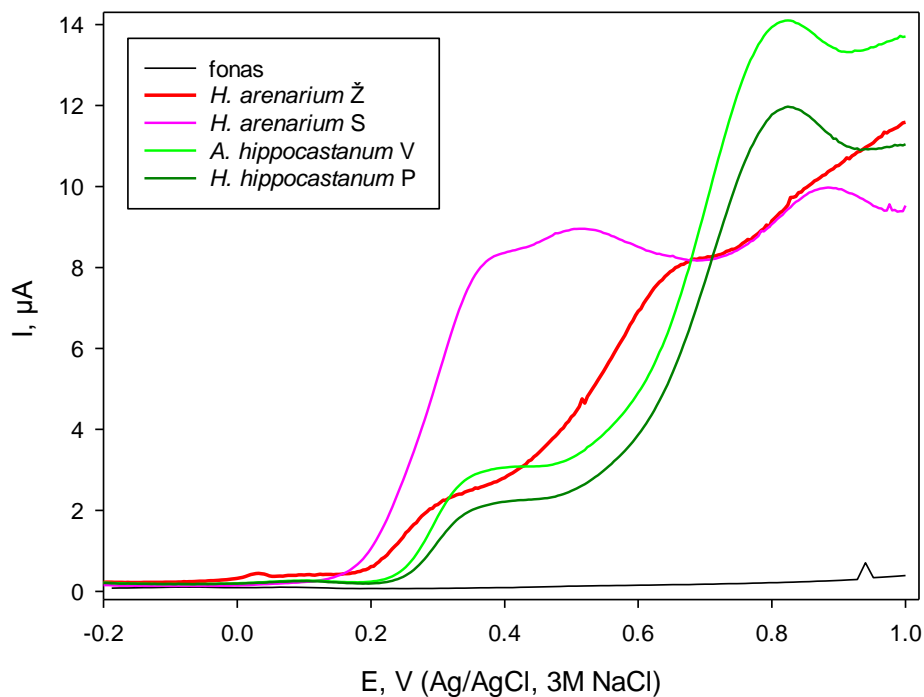


18 pav. *Artemisia* genties ekstraktų diferencinės impulsinės voltamperogramos

Iš pateiktos voltamperogramos matoma, kad oksidaciniai procesai vyksta ties tam tikra potencialo verte, kuri gali būti priskirta tam tikram junginiui/komponentui esančiam ekstrakto. Daugiausia srovės stiprio padidėjimų buvo užfiksuota *A. absinthium* ekstraktams – Pasvalio rajono žaliavos ties 0,31V, 0,60V ir 0,91V ir Rokiškio rajono – 0,33V, 0,62V, 0,91V. *A. vulgaris* žaliavose stebimi pikai taip pat artimai sutampa: Rokiškio raj.– 0,33V, 0,87V, o Pasvalio raj.– 0,34V, 0,86V. Kadangi potencialų vertės beveik sutampa, galima teigti, kad skirtingų augaviečių žaliavos

ekstraktuose yra stebimi tie patys besioksiduojantys junginiai. *A. campestris* srovės stiprio padidėjimai išsiskiria: Rokiškio rajono žaliavos – 0,35V, 0,87V, o Pasvalio rajono – 0,36V, 0,64V.

Žemiau pateikiamos *Aesculus* ir *Helichrysum* genties augalų DIV, prie pavadinimo pateikta raidė (V, P) nurodo, kad ekstraktas buvo išgautas iš žaliavos surinktos Vilniaus ir Pasvalio rajonuose, o raidės (Ž, S), kad ekstraktai buvo gauti iš žiedų ir stiebų.



19 pav. *Aesculus* ir *Helichrysum* genties ekstraktų diferencinės impulsinės voltamperogramos

Gautose voltamperogramose galima stebėti srovės stiprio padidėjimą, kuris parodo, kad tiriamuose ekstraktuose yra elektrochemiškai lengvai besioksiduojančių junginių. Iš pateiktos voltamperogramos matoma, kad *A. hippocastanum* ekstraktų potencialų vertės sutampa– 0,35V ir 0,82V. *H. arenarium* stiebuose pikai išryškėja ties 0,37V, 0,51V, 0,88V, o žiedų ekstrakto junginių oksidacija vyksta ties 0,04V, 0,30V ir 0,66V, todėl galima manyti, kad žiedų ir stiebų ekstraktuose antioksidacinį poveikį nulemia skirtingi junginiai.

Toks antioksidacinio aktyvumo nustatymas yra greitas ir sąlyginai nebrangus metodas. Šiai analizei atlikti nereikalingas ilgas mėginio paruošimas ar sudėtinga gautų duomenų analizė. Dėl antioksidacinių junginių įvairovės augaluose yra nerealu kiekvieną komponentą išskirti ir jį analizuoti individualiai, o naudojant elektrocheminį metodą nesunkiai galima pamatyti, ar išgautas ekstraktas pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Taip pat prieš planojant atlikti išsamią pasirinkto augalo analizę, naudinga patikrinti ekstrakto ar EA savybes, įsitikinant, kad žaliavoje egzistuoja oksidaciniu aktyvumu pasižyminčių komponentų. Tačiau norint nustatyti, kokie konkrečiai junginiai būdingi ekstraktams ir nulemia tokį poveikį reikėtų taikyti kitus metodus, vienas iš jų aukšto efektyvumo skysčių chromatografija.

IŠVADOS

1. Karčiojo kiekčio (*Artemisia absinthium* L.) eteriniuose aliejuose (EA) nustatyti vyraujantys junginiai trans-sabinilo acetatas (60,6%) ir trans-sabinolis (5,57%). Rokiškio rajone surinktos paprastojo kiekčio (*Artemisia vulgaris* L.) žaliavos aliejui būdingas 1,8-cineolis (19,01%), o Pasvalio rajone kamparas (17,73%). Analizuojant dirvoninio kiekčio (*Artemisia campestris* L.) aliejus labiausia išsiskyrė Rokiškio rajono žaliava, kuriai nustatyta 22,79% germakreno D, o Pasvalio rajono žaliava daugiausia turėjo kariofileno oksido 8,86%. Atlikti tyrimai patvirtino, kad biologiškai aktyvių komponentų kiekis priklauso nuo augalo rūšies ir augavietės.
2. Nustatyta, kad abiejose augavietėse (Pasvalio ir Vilniaus rajonai) surinktų kaštonų žiedų (*Aesculus hippocastanum* L.) EA didžiausią procentinę dalį sudaro n-heneikosanas (25,8%) ir heksahidrofarnesilo acetonas (14,4%).
3. Smiltyninio šlamučio (*Helichrysum arenarium* L.) žiedų EA ir stiebų EA didžiausią procentinę dalį sudaro heksadekanoinė rūgštis (20,3%) ir miristinė rūgštis (10,8%). Žiedų EA pasižymi didesniu alifatinių angliavandenilių kiekiu (heneikosanas, dokosanas), o stiebai didesniu monoterpenų (α -pineno, limoneno, 1,8- cineolio) kiekiu. Šie rezultatai parodė, kad skirtingos augalo dalys kaupia ne visiškai tokius pačius ir skirtingus kiekius biologiškai veiklių komponentų.
4. Įsigytos vaistinės žaliavos italinio šlamučio (*Helichrysum italicum* L) EA vyraujantis junginys γ -kurkumenas (21,45%). Nustatyta, kad *H. italicum* EA pasižymi toksinėmis savybėmis, apskaičiuotos mirtinos koncentracijos krevečių lervoms LC_{50} – 18,2 μ g/ml, LC_{90} – 47,9 μ g/ml.
5. Atliktas antioksidacinio aktyvumo tyrimas parodė, kad karčiojo kiekčio (*Artemisia absinthium*.) eterinis aliejus pasižymi stipresnėmis antioksidacinėmis savybėmis nei italinio šlamučio EA, nustatytos antiradikalinio aktyvumo vertės atitinkamai 14,17mM/L ir 5,54 mM/L.
6. Atliktas elektrocheminis tyrimas parodė, kad vaistinių augalų ekstraktai pasižymi antioksidaciniu aktyvumu.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] L. Jonaitienė, O. Ragažinskienė, E. Kizevičienė, and J. Daukšienė, Augaliniai vaistiniai preparatai ir maisto papildai žmogaus sveikatai, *Žmogaus ir gamtos apsauga* 1dalis, 116–119, (2015).
- [2] R. Balvočiūtė, S. Skunčikienė, and J. Balvočiūtė, Vaistažolininkystės plėtra Lietuvoje: problemos ir aktualijos, *Ekonomika ir vadyba: aktualijos ir perspektyvos*, 185–189, (2010).
- [3] Lietuvos Respublikos aplinkos ministerija, Laukinė augalija, teisės aktai, metodikos, rekomendacijos, Vilnius, (2000).
- [4] Lietuvos fitoterapijos sąjunga, Ovidijus Vyšniauskas, paskaita– Augalinės kilmės vaistinės medžiagos-1dalis, Vilnius, (2018-11-09).
- [5] L. Šveistytė, Vaistinių ir aromatinių augalų genetiniai ištekliai, *Lietuvos Respublikos aplinkos ministerija Augalų genų bankas*, Akademija, Kėdainių r., 4–5, (2011).
- [6] M. Gunjan and A. Ahmad, Marketing trends & future prospects of herbal medicine in the treatment of various disease, *World journal of pharmaceutical research*, 4, Nr. 9, 132–155, (2015).
- [7] V. Motiekaitytė and Z. Venckus, Laukinių vaistinių augalų naudojimo ir apsaugos teisinis reglamentavimas Lietuvoje, *Ekonomika ir vadyba: aktualijos ir perspektyvos*, 86–94, (2015).
- [8] Nuoroda: <https://minfo.lt/zmones/straipsnis/jadvygos-balvociutes-tikslas-atskleisti-lietuvos-gamtos-potencialas> (tikrinta: 2020-05-07).
- [9] O. Ragažinskienė, Vaistinių augalų tyrinėjimų raida VDU Kauno botanikos sode ir jų reikšmė vaistažolininkystės plėtrai Lietuvoje, *Botanikos sodo raštai*, 44–48, (2010).
- [10] A. Judžentienė, Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) oils, Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, *Elsevier Inc.*, 849–856 (2016).
- [11] Nuoroda: <https://gamtininkas.lt/augalai/kietis-kartusis-lot-artemisia-absinthium-2/> (tikrinta: 2020-05-07).
- [12] Assessment report on *Artemisia absinthium* L., herba Final. Nuoroda: www.ema.europa.eu/contact (tikrinta: 2020-05-08).
- [13] A. Judžentienė and J. Budiene, Chemical Composition of Lithuanian wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils, *Records of natural products*, 180–183, (2012).
- [14] A. Judžentienė, J. Budiene¹, R. Girycyte, V. Masotti, Toxic Activity and Chemical Composition of Lithuanian Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Essential Oils, *Rec. Nat. Prod.* 6:2, 180-183, (2012).
- [15] F. Juteau *et al.*, Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France, *Planta med*, 69, 158-161, (2003).

- [16] H. R. Moslemi, H. Hoseinzadeh, M. A. Badouei, K. Kafshdouzan, and R. M. N. Fard, Antimicrobial Activity of *Artemisia absinthium* Against Surgical Wounds Infected by *Staphylococcus aureus* in a Rat Model, *Indian Journal of Microbiology*, 52 Nr. 4, 601–604, (2012).
- [17] A. Judzientienė, J. Buzelytė, Chemical composition of essential oils of *Artemisia vulgaris* L. (mugwort) from North Lithuania, *Chemija*. T. 17. Nr. 1. P. 12–15, (2006).
- [18] S. Govindaraj, B. D. R. Kumari, P. L. Cioni, and G. Flamini, Mass propagation and essential oil analysis of *Artemisia vulgaris*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 105, Nr. 3, 176–183, (2008).
- [19] R. Gyawali *et al.*, Antibacterial and cytotoxic activities of high altitude essential oils from Nepalese Himalaya, *Journal of Medicinal Plants Research*, 7, Nr. 13, 738–743, (2013).
- [20] S. Baykan Erel, G. Reznicek, S. G. Senol, N. Ü. Karabay Yavaşoğlu, S. Konyalioglu, A. U. Zeybek, Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western anatolia, *Turkish Journal of Biology*, 36, Nr. 1, 75–84, (2012).
- [21] M. Mohan, A. K. Pandey, M. K. Nautiyal, and P. Singh, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Three *Artemisia vulgaris* (L.) Essential Oils from Uttarakhand, India, *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 6, Nr. 3, 266–271, (2016).
- [22] A. M. Saleh, A. Aljada, S. A. A. Rizvi, A. Nasr, A. S. Alaskar, and J. D. Williams, In vitro cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* L. essential oil is mediated by a mitochondria-dependent apoptosis in HL-60 leukemic cell line, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 2–15, (2014).
- [23] Kazimieras Vilkonis, *Lietuvos žaliasis rūkas*, leidykla „Lututė“, (2001).
- [24] A. E. Al-Snafi, Encyclopedia of the constituents and pharmacological effects of Iraqi medicinal plants Medicinal plants with antiviral activity View project pharmacology of medicinal plants View project, 1, 227–233, (2013).
- [25] A. Judzientiene, J. Budiene, R. Butkiene, E. Kupcinskiene, I. Laffont-Schwob, and V. Masotti, Caryophyllene Oxide-rich Essential Oils of Lithuanian *Artemisia campestris* ssp. *campestris* and Their Toxicity, *Natural product communications*, 5 Nr.12, 1981–1984, (2010).
- [26] N. H. Ben, T. S. Hammami, L. Mahmoudi, and K. Zeghal, Aqueous leaves extract of *Artemisia campestris* inhibition of the scorpion venom induced hypertension, *Journal of Medicinal Plants Research*, 8, Nr. 13, 538–542, (2014).
- [27] A. Akrouf, L. A. Gonzalez, H. el Jani, and P. C. Madrid, Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia, *Food and Chemical Toxicology*, 49, Nr. 2, 342–347, (2011).

- [28] G. S. Karatoprak, Horse chestnut, in *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, Elsevier, 295–299, (2018).
- [29] M. Dudek-Makuch and I. Matławska, Flavonoids from the flowers of *Aesculus hippocastanum*, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 68, Nr. 3, 403–408, (2011).
- [30] Horse chestnut (inflorescence) for homeopathic preparations *aesculus hippocastanum*, *The General Chapters and General Monographs of the European Pharmacopoeia and Preamble of the French Pharmacopoeia apply*, (2004).
- [31] Z. Zhang, S. Li, and X.-Y. Lian, An Overview of Genus *Aesculus* L.: Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacological Activities,” *Pharmaceutical Crops*, 1, Nr. 1, 24–51, (2014).
- [32] C. R. Sirtori, Aescin: Pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile, *Pharmacological Research*, 44, Nr. 3, 183–193, (2001).
- [33] HMPC, Community herbal monograph on *Aesculus hippocastanum* L., cortex Final Discussion in Working Party on Community monographs and Community list (MLWP) Adoption by Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) for release for consultation, (2011).
- [34] L. A. Mitscher, *Traditional Medicines*, University of Kansas, Lawrence, (2007).
- [35] E. Medicines Agency, Assessment report on *Aesculus hippocastanum* L., semen., nuoroda: www.ema.europa.eu/contact. (Tikrinta: 2020-05-10)
- [36] T. Fujimura, S. Moriwaki, Horse Chestnut Extract Induces Contraction Force Generation in Fibroblasts through Activation of Rho/Rho Kinase, *Biol. Pharm. Bull.* 29, Nr.6, 1075–1081 (2006).
- [37] G. Buchbauer, L. Jirovetz, M. Wasicky, and A. Nikiforov, Volatiles of common horsechestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) (Hippocastanaceae) peels and seeds, *Journal of Essential Oil Research*, 6, Nr. 5, 507–511, (1994).
- [38] G. Buchbauer, L. Jirovetz, M. Wasicky, and A. Nikiforov, Volatiles of common horsechestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) (Hippocastanaceae) blossoms, *Journal of Essential Oil Research*, 6, Nr. 1, 93–95, (1994).
- [39] A. Judžentienė, T. Charkova, and A. Misiūnas, Chemical composition of the essential oils from *Helichrysum arenarium* (L.) plants growing in Lithuanian forests, *Journal of Essential Oil Research*, 31, Nr. 4, 305–311, (2019).
- [40] R. Vanessa, B. Reidel, P. L. Cioni, B. Ruffoni, C. Cervelli, and L. Pistelli, Aroma Profile and Essential Oil Composition of *Helichrysum* species, *Natural product communication*, 12, Nr. 9, 1507–1512, (2017).

- [41] M. Babotă *et al.*, Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of helichrysum arenarium (L.) moench. and antennaria dioica (L.) gaertn. Flowers, *Molecules*, 23, Nr. 2, 1–15, (2018).
- [42] H. D. Moghadam, A. mohamadi Sani, and M. M. Sangatash, Inhibitory Effect of Helichrysum arenarium Essential Oil on the Growth of Food Contaminated Microorganisms, *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 17, Nr. 5, 911–921, (2014).
- [43] M. Babotă *et al.*, Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of helichrysum arenarium (L.) moench. and antennaria dioica (L.) gaertn. Flowers, *Molecules*, 23, Nr. 2, (2018).
- [44] E. Küpely, A. Tosun, and Ö. Bahadır, EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIES OF HELICHRYSUM GAERTNER SPECIES (ASTERACEAE), *Turkish J.Pharm. Sci*, 3, Nr. 3, 141 –149, (2006).
- [45] J. Mastelić, O. Politeo, and I. Jerković, Contribution to the Analysis of the Essential Oil of Helichrysum italicum (Roth) G. Don. – Determination of Ester Bonded Acids and Phenols, *Molecules*, Nr. 13, 795–803, (2008).
- [46] D. Antunes Viegas, A. Palmeira-De-Oliveira, L. Salgueiro, J. Martinez-De-Oliveira, and R. Palmeira-De-Oliveira, Helichrysum italicum: From traditional use to scientific data, *Journal of Ethnopharmacology*, 151, Nr. 1. Elsevier Ireland Ltd, 54–65, (2014).
- [47] V. K. Bajpai, A. Sharma, and K. H. Baek, Antibacterial mode of action of Cudrania tricuspidata fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens, *Food Control*, 32, Nr. 2, 582–590, (2013).
- [48] E. Majewska, M. Kozłowska, D. Kowalska, and E. Gruczyńska, Characterization of the essential oil from cone-berries of Juniperus communis L. (Cupressaceae), *Herba Polonica*, 63, Nr. 3, 48–55, (2017).
- [49] B. Djihane, N. Wafa, S. Elkhamssa, D. H. J. Pedro, A. E. Maria, and Z. Mohamed Mihoub, Chemical constituents of Helichrysum italicum (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and Candida albicans, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25, Nr. 5, 780–787, (2017).
- [50] B. Conti, A. Canale, A. Bertoli, F. Gozzini, and L. Pistelli, Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito Aedes albopictus (Diptera: Culicidae), *Parasitology Research*, 107, Nr. 6, 1455–1461, (2010).
- [51] Nuoroda: <https://aromata.lt/lt/shop/121/slamuciu-eterinis-aliejus-italiniu> (tikrinta: 2020-05-07).
- [52] Nuoroda: <https://lt.loccitane.com/overnight-reset-serumas,28,2,2125,1447304.htm> (tikrinta: 2020-05-07).

- [53] D. Fraternali, G. Flamini, and R. Ascrizzi, In Vitro Anticollagenase and Antielastase Activities of Essential Oil of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don, *Journal of Medicinal Food*, 22, Nr. 10, 1041–1046, (2019).
- [54] R.P. Adams, *Essential oil components by GC/MS*. Illinois: Allured publishing corporation, (1995).
- [55] A. Judzentiene and J. Budiene, Chemical Polymorphism of Essential Oils of *Artemisia vulgaris* Growing Wild in Lithuania, *Chemistry and Biodiversity*, 15, Nr. 2, (2018).
- [56] E. Guinoiseau *et al.*, Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, (2013).
- [57] I. Morone-Fortunato *et al.*, Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm, *Industrial Crops and Products*, 32, Nr. 3, 639–649, (2010).
- [58] R. Amorati, M. C. Foti, and L. Valgimigli, Antioxidant activity of essential oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, Nr. 46, 10835–10847, (2013).
- [59] M. S. Brewer, Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, Nr. 4, 221–247, (2011).
- [60] S. Kordali, A. Cakir, A. Mavi, H. Kilic, and A. Yildirim, Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, Nr. 5, 1408–1416, (2005).
- [61] A. B. Cutillas, A. Carrasco, R. Martinez-Gutierrez, V. Tomas, and J. Tudela, *Thymus mastichina* L. essential oils from Murcia (Spain): Composition and antioxidant, antienzymatic and antimicrobial bioactivities, *PLoS ONE*, 13, Nr. 1, (2018).
- [62] L. Barros, L. Cabrita, M. V. Boas, A. M. Carvalho, and I. C. F. R. Ferreira, Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants,” *Food Chemistry*, 127, Nr. 4, 1600–1608, (2011).

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

RŪTA MAČIŪNAITĖ

Vaistinių augalų ekstraktų fitocheminiai tyrimai ir analizė dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu

Gydymasis vaistiniais augalais įvairiose šalyse skiriasi, remiasi tradiciškumu bei ilgalaikę taikymo patirtimi. Lietuvoje fitoterapija yra populiari, turi galias tradicijas, todėl svarbu tirti Lietuvos teritorijoje augančius augalus, kurie naudojami kaip žaliava vaistiniams preparatams.

Šio darbo tikslas buvo ištirti įvairių vaistinių augalų eterinių aliejų sudėtį (EA) naudojantis dujų chromatografijos/masių spektrometrijos metodu (GC-MS), įvertinti ekstraktų ir kai kurių EA antioksidacines bei *H. Italicum* toksines savybes.

Tyrimui atlikti buvo pasirinktos *Artemisia*, *Aesculus* ir *Helichrysum* augalų gentys, kurių vaistiniai augalai surinkti skirtingose Lietuvos teritorijose. Aliejai buvo išgauti hidrodistiliacijos būdu. *Artemisia* genties *absinthium* EA vyravo trans-sabinilo acetatas, *vulgaris* aliejams buvo būdingi 1,8-cineolis ir kamparas, analizuojant *campestris* aliejus identifikuoti germakreno D ir kariofileno oksido junginiai. *Aesculus hippocastanum* žiedų EA didžiausią procentinę dalį sudarė n-heneikosanas ir heksahidrofarnesilo acetonas. *Helichrysum* genties *arenarium* žiedų EA ir stiebų EA didžiausią procentinę dalį sudarė heksadekanoinė ir miristinė rūgštys, tačiau žiedų EA pasižymėjo didesniu alifatinių angliavandenilių kiekiu (heneikosanas, dokosanas), o stiebai didesniu monoterpenų (α -pineno, limoneno, 1,8- cineolio) kiekiu. Įsigytos vaistinės žaliavos *Helichrysum italicum* EA nustatyti vyraujantys junginiai γ -kurkumenas ir β -selinenas. Atlikti tyrimai patvirtino, kad kokybinė ir kiekybinė būdingų junginių sudėtis priklauso nuo augalo rūšies, augavietės, pasirinktos augalo dalies žaliavai.

Fitocheminiai tyrimai parodė, kad *H. italicum* EA pasižymi toksinėmis savybėmis krevečių lervoms (*Artemia sp*). Atliekant antioksidacinio aktyvumo tyrimą spektrofotometriju metodu, panaudojant DPPH⁺ radikalą nustatyta, kad *A. absinthium* EA būdingos stipresnės antioksidacinės savybės nei *H. italicum* EA. Gautos diferencinės impulsinės voltamperogramos parodė, kad visų vaistinių augalų ekstraktai pasižymi antioksidaciniu aktyvumu.

SUMMARY
VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

RŪTA MAČIŪNAITĖ

Analysis of extracts from medicinal plants by phytochemical studies and gas chromatography-mass spectrometry

The use of the medicinal plants is based on tradition and long-term experience. Practices of traditional medicine vary greatly from country to country. Phytotherapy has deep traditions and is popular in Lithuania. Therefore it is important to study the plants growing in the territory of Lithuania, which are used as a raw materials for medicinal products.

The aim of the study was to investigate the chemical composition of the essential oil (EO) from various medicinal plants using gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). The study also aimed to evaluate the antioxidant properties of extracts and EO and to determine the toxicity of *H. Italicum* EO.

The genus of *Artemisia*, *Aesculus* and *Helichrysum* plants were selected for the study and were collected in different areas of Lithuania. The oils were extracted by hydrodistillation. The results of EO samples based on *Artemisia* genus showed that main constituent of *A. absinthium* oil was *trans*-sabinyl acetate, *A. vulgaris* EO were rich in 1,8-cineole and camphor, *A. campestris* oils were rich in germacrene D and caryophyllene oxide. The major components of *Aesculus hippocastanum* inflorescences were *n*-heneicosanone and hexahydrofarnesyl acetone. The hydrodistilled essential oil of aerial parts (inflorescences and stems) of *Helichrysum arenarium* contained large amounts of hexadecanoic acid and myristic acid. However, the volatile fraction of the inflorescences contained mainly aliphatic hydrocarbons (heneicosane, docosane), while the chemical composition of the stems presents higher content of monoterpenes (α -pinene, limonene, 1,8-cineole). The oils obtained from purchased *Helichrysum italicum* material were found to contain large amounts of γ -curcumene, β -selinene. Analysis of oils showed that quantitative and qualitative composition depends on different geographical locations, selected species and organs of medicinal plants.

Phytochemical studies revealed that EO from *H. Italicum* has a toxic effect against brine shrimp *Artemia sp.* (larvae). The EO from *A. absinthium* presents higher antioxidant activity against the DPPH⁺ radical compared to *H. Italicum*. Differential pulse voltammograms showed that all extracts from medicinal plants has electrochemical antioxidant activity.

PRIEDAI

- 1 Priedas. Identifikuoti *A. absinthium*, *A. vulgaris* ir *A. campestris* augalų eterinių aliejų junginiai
- 2 Priedas. Identifikuoti *H. arenarium* žiedų ir stiebų bei *H. italicum* eterinių aliejų junginiai

**IDENTIFIKUOTI *A. ABSINTHIUM*, *A. VULGARIS* IR *A. CAMPESTRIS* AUGALŲ
ETERINIŲ ALIEJŲ JUNGINIAI**

Junginys	SI	AA1r	AA2k	AV1r	AV2k	AC1r	ACk	tR
Santolina trienas	908	–	0,01	–	0,49	–	–	5,3-5,9
Triciklenas	926	0,05	0,05	–	–	–	0,11	6,55
α -Tujenas,	931	–	–	2,57	–	–	–	6,55
α -Pinenas;	939	0,42	0,37	2,54	0,15	3,83	1,82	6,7-7,1
Kamfenas	953	0,01	–	1,51	–	–	0,03	7,11
Tuja-2,4(10)-dienes	957	0,01	–	–	–	–	–	7,26
Sabinenas	976	2,44	1,15	7,45	0,34	0,36	0,21	7,75
β -Pinenas;	980	0,16	0,14	0,65	–	2,31	6,74	7,85
1-Okten-3-olis	978	0,08	0,14	–	–	–	–	7,97
β -Mircenas;	991	0,50	0,52	–	–	0,94	0,53	8,2
3-Oktanolis	993	0,02	–	–	–	–	–	8,41
Yomogi alkoholis	998	–	–	–	5,86	–	–	8,47
Dekanas	999	–	–	–	–	0,80	–	8,49
α -felandrenas	1005	0,01	0,01	0,28	–	–	–	8,58
α -terpinenas	1018	–	–	2,82	–	–	–	8,92
o-Cimenas	1022	0,05	0,54	–	–	3,41	2,19	9,15
p-Cimenas	1026	–	–	2,11	–	–	–	9,18
Silvestrenas	1027	0,20	–	–	–	–	–	9,27
Limonenas	1031	–	–	–	–	1,88	1,51	9,28
1,8-Cineolis	1033	0,31	0,66	19,01	9,25	0,74	–	9,3-9,4
cis- β -ocimenas	1040	–	–	0,06	–	0,66	–	9,79
Artemizija ketonas	1062	–	–	–	7,04	–	–	10,08
γ -Terpinenas	1062	0,05	0,07	4,41	–	1,07	–	10,10
Cis-Sabineno hidratas	1068	0,47	0,01	1,67	0,75	–	–	10,39
Artemizija alkoholis	1083	–	–	–	1,69	–	–	10,75
Terpinolenas	1088	0,02	0,05	1,03	–	–	–	10,95
trans-Linalolio oksidas	1088	–	–	–	–	0,46	0,09	10,98
trans-sabineno hidratas	1097	–	–	1,46	1,47	–	–	11,28
β -Linalolis	1098	5,12	1,17	–	–	0,33	0,28	11,34
2-Nonanolis	1098	–	–	0,39	–	–	0,35	11,36
Undekanas	1099	–	–	–	–	0,61	–	11,42
cis-Tujonas	1102	0,01	1,21	–	1,76	0,72	–	11,47
α -Thujonas	1102	–	–	0,17	–	–	–	11,76
1-okten-3-ilacetatas	1110	0,19	–	–	–	–	–	11,58
trans-Tujonas;	1114	0,11	–	–	–	–	–	11,78
Izoforonas	1118	–	–	–	1,52	–	–	11,82
Chrysanthenone	1123	–	–	–	9,63	–	–	11,92
Izo-3-Tujanolis	1133	0,01	–	–	–	–	–	12,37
Nopinonas	1137	–	–	–	–	–	0,08	12,39
trans-Pinocarveolis	1139	–	–	–	–	0,53	0,33	12,49
Kamparas	1143	–	–	6,25	17,73	–	–	12,49
trans-Sabinolis	1140	5,25	5,89	–	–	–	–	12,53
cis-Verbenolis	1140	0,06	–	–	–	–	–	12,65
Kamparas	1143	–	–	–	–	0,23	–	12,56
trans-Verbenolis	1144	–	–	–	–	0,59	0,04	12,67
Umbelulonas	1144	0,05	0,21	–	–	–	–	12,89
Sabina ketonas	1156	–	–	0,63	1,36	–	–	12,95
cis-Chrisantenolis	1162	–	–	0,15	2,13	–	–	13,17
Barneolis	1165	–	–	2,89	6,78	–	–	13,28
4-Terpinolis	1177	0,13	1,13	8,02	6,40	1,66	0,2	13,5- 13,6

Tuj-3-en-10-alis	1181	0,02	–	0,10	–	–	–	13,71
p-Cimen-8-olis	1183	–	–	0,12	–	0,56	0,05	13,82
α -Terpineolis	1189	0,16	–	1,19	1,75	0,36	0,14	13,96
Cis-piperitolis	1193	–	–	0,35	–	–	–	14,06
Mirtenalis	1193	–	–	–	–	–	0,26	14,07
Mirtenolis	1194	–	–	–	–	–	0,12	14,16
Verbenonas	1204	–	–	–	0,45	–	0,04	14,35
Trans-Piperitolis	1205	–	–	0,19	–	–	–	14,41
trans-Karveolis	1217	–	–	0,08	–	–	–	14,73
Izobornilo formatas	1233	–	–	0,09	–	–	–	14,91
γ -Izogeraniolis	1233	–	–	0,30	–	–	–	15,07
Heksil 2-metilbutiratas	1234	–	0,24	–	–	–	–	15,13
p-Kumino aldehidas	1239	–	0,25	0,17	–	–	–	15,30- 15,36
Karvonas	1242	–	–	0,18	–	–	–	15,37
Geraniolis;	1255	0,05	0,05	–	–	–	–	16,14
Bornilacetatas;	1285	0,03	0,01	0,30	–	1,88	0,21	16,51
Timolis	1290	–	–	0,01	–	–	–	17,15
trans-Sabinilo acetatas	1291	61,56	59,64	–	–	0,53	0,37	16,7- 16,93
Trans- Pinokarvilo acetatas	1297	–	–	–	–	–	0,20	16,89
δ -Elemenas	1339	–	–	0,05	–	–	–	17,85
α -Terpinilo acetatas	1350	–	–	0,14	–	–	–	18,16
α -Cubebenas	1351	–	–	–	–	–	0,17	18,24
Nerilo acetatas	1365	–	0,10	0,05	–	–	0,12	18,57- 18,99
α -Ilangenas	1372	–	–	–	–	–	0,03	18,83
Isoledenas	1373	–	–	–	0,24	–	–	18,84
α -Kopainas	1376	–	–	–	–	0,81	0,07	18,96
β -Burbonenas	1384	–	0,59	–	–	–	0,21	19,27
cis-Jazmonas	1388	0,04	–	–	–	–	–	19,51
β -Kubebenas	1390	–	–	–	–	–	0,08	19,53
β -Elemene	1391	–	–	2,65	0,52	0,42	0,73	19,54
α -Gurjunenas	1409	–	–	0,70	–	–	–	19,78
Trans- kariofilenas	1419	1,02	0,30	–	–	7,43	1,15	20,08
α -Humulenas	1454	0,15	–	–	–	1,84	0,62	20,93
Trans- β -Farnesenas	1458	–	–	–	–	3,28	0,34	20,90
α -Akoradienas	1463	–	–	0,42	–	–	–	20,05
β -Chamigrenas	1475	–	–	–	0,37	–	–	21,35
γ -Murolenas	1477	–	–	0,71	2,06	0,82	0,88	21,09
Dehidro-Seskvicineolis	?	–	0,35	–	–	–	–	21,28
Germacrenas D	1480	–	–	1,89	–	22,79	–	21,61
α -Kurcumenas	1483	–	1,49	–	–	–	0,84	21,66
Viridiflorenas	1493	0,87	0,10	2,24	–	–	2,45	21,75
α -Selinenas	1494	–	–	1,76	–	–	–	21,96
α -Murolenas	1499	–	–	–	–	0,53	–	22,09
α -Kuprenenas	1506	–	–	0,13	–	–	–	22,14
trans- α -Farnesenas	1508	–	–	–	–	0,42	–	22,20
Geranilo butiratas	?	–	0,12	–	–	–	–	22,26
γ -Kadinenas	1513	–	–	0,23	–	0,44	0,45	22,37
δ -Kadinenas	1524	–	–	1,38	0,35	1,78	0,33	22,59
α -Kadinenas	1538	–	–	0,02	–	–	0,12	22,93
α -Kalakorenas	1542	–	–	0,10	–	–	0,14	23,75
β -Kalakorenas	1563	–	–	0,06	–	–	–	23,79
trans-Nerolidolis	1564	–	0,12	0,03	–	–	1,28	23,58
Ledolis	1565	–	–	0,61	–	–	–	23,75
Spatulenolis	1576	–	–	1,75	1,11	2,65	4,40	24,39
Kariofileno oksidas	1581	0,51	0,91	1,44	1,32	2,44	8,86	24,2- 24,4

Salvia-4(14)-en-1-onas (Mintketonas)	?	–	–	0,22	—	1,17	2,86	24,41
Geranilo izovaleratas	1585	0,02	0,20	–	–	–	–	24,47
Guaiolis	1595	–	–	–	–	–	2,07	24,85
β -Kopaen-4- α -olis	1584	–	–	0,71	–	–	–	24,95
Epiglobulolis	1586	–	0,16	–	–	–	–	25,46
Humuleno epoksidas II	1606	–	–	0,10	0,67	0,16	1,44	25,14
1-epi-Kubenolis	1627	–	–	0,60	–	–	–	25,39
α -akorenolis	1630	–	–	–	–	–	0,61	25,54
epi- α -Kadinolis	1640	–	–	–	–	–	5,03	25,44
epi- α -Murololis	1641	–	–	–	–	0,96	1,40	25,86
Selin-11-en-4- α -olis	1652	—	2,89	–	–	–	–	26,38
α -kadinolis	1653	–	–	0,09	–	2,60	3,64	25,77
epi- α -Bisabolol	1683	–	4,04	–	–	–	–	26,87
germakra4(15),5,10(14)-triene-1- α -olis	1775	–	–	–	–	5,30	4,18	26,92
Hekсахidrofarnesilo acetonas	?	0,23	–	–	–	–	–	29,46
Fitonas	?	–	–	–	–	0,59	1,10	29,49
n-Heptadekanas	1700	–	–	0,12	–	–	–	30,18
α -trans-Bergamotolis	1693	–	0,32	–	–	–	–	30,47
Nuciferolio acetatas	?	1,01	–	–	–	–	–	30,97
Heksadekanoinė rūgštis	?	–	–	–	–	4,20	2,96	31,39
cis-nuciferolis	1758	3,49	1,33	–	–	–	–	31,57
n-Nonadekanas	1900	1,61	0,05	0,02	–	–	0,31	32,53
n-Eikosanas	2000	1,38	0,10	0,22	–	–	–	33,49
n-Heneikosanas	2200	0,10	–	0,06	–	–	0,23	34,49
n-Dokosanas	2200	0,13	–	0,23	–	–	–	36,13
		88,12%	86,69%	87,15%	83,19%	84,99%	65,20%	

**IDENTIFIKUOTI *H. ARENARIUM* ŽIEDŲ IR STIEBŲ BEI *H. ITALICUM* ETERINIŲ
ALIEJŲ JUNGINIAI**

Junginys	SI	HAs	HAz	HI	Sulaikymo trukmė
2-Heptanalis	–	–	0,25	–	5,67
n-Nonanas	899	0,18	0,19	–	5,85
Heptanaldehidai;	–	0,86	0,13	–	5,89
α -Pinenas	939	2,91	0,15	6,47	5,90-6,73
Kamfenas	953	0,18	–	–	7,86
β -Pinenas	980	0,36	0,02	–	7,81
1-Okten-3-olis	978	0,41	0,01	–	7,92
2-metil-3-Oktanonas	?	0,22	–	–	7,98
Sulkatonas	?	0,39	0,09	–	8,06
2-pentilfuranas	998	1,87	0,81	–	8,19
trans-2-(2-Pentenil)furanas	?	0,63	0,16	–	8,45
n-Octanalis	1001	0,63	0,19	–	8,48
α -Terpinenas	1018	0,12	0,11	–	8,88
p-Cimenas	1026	0,13	0,01	–	9,11
Limonenas	1031	1,56	0,14	1,58	9,24
1,8- cineolis	1033	1,99	0,04	–	9,31
2,2,6-metil-cikloheksanonas	?	0,10	–	–	9,37
Okt-3-en-2-onas	?	0,22	–	–	9,49
Fenilacetaldehidai	?	0,38	0,39	–	9,66
Acetofenonas	1065	–	0,21	–	10,32
Terpinolenas	1088	0,12	0,02	–	10,90
Linalolis	1098	–	0,17	2,10	10,88
Kamparas	1143	–	–	0,45	10,93
2,5-metil-stirenas	1096	0,05	–	–	10,95
n-Nonanalis	1098	8,15	0,39	–	11,40
α -Ciklocitralis	?	0,05	–	–	11,75
α -Kamfenolis	1125	0,04	–	–	11,99
2,6-Nonadienalis	?	0,29	0,07	–	12,74
Cis-2-Nonenalis	1162	0,54	0,24	–	12,93
Borneolis	1165	0,22	0,04	0,39	13,22
trans-1,3,5-Undekatrienas	?	–	0,06	–	13,33
Terpinen-4-olis	1177	0,15	–	–	13,50
cis,trans-1,3,5-Undekatrienas	?	–	0,12	–	13,58
n-Octanoinė rūgštis?	?	–	0,33	–	13,83
L- α -Terpineolis	1189	0,66	0,29	0,80	13,92
n-Dodekanas	1199	–	0,10	–	14,00
β -Šafranalis	1196	–	0,24	–	14,09
n-Decanalis	1204	1,14	0,46	–	14,22
n-Nona-2,4-dienalis	?	0,26	–	–	14,49
cis-3-Heksenilo valeratas	?	0,06	–	–	15,04
Cuminaldehidai	1239	0,17	–	–	15,25
Nerolis	1255	–	–	1,27	15,47
(Z)-2-Dekenalis	1261	0,24	–	–	15,78
Perilo aldehidai	1271	0,47	–	–	16,19
Nonanoinė rūgštis	1280	–	0,42	–	16,41
Pelargono rūgštis	1280	0,60	–	–	16,54
Trans-Anetolis	1283	–	–	1,06	16,58
2-Undekanonas	?	–	0,11	–	16,63
Trans-cis-2,4-Dekadienalis	1291	0,38	–	–	16,67
Tridekanas	1300	–	0,10	–	16,75
Trans-2-tret-butil-cikloheksanolio acetatas	1310	0,24	–	–	16,99

(trans,trans)-2,4-Dekadienalis;	1314	0,81	–	–	17,29
Eugenolis	1356	–	0,38	–	18,42
Ciklosativenas	1368	–	0,05	–	18,64
Dekanoinė rūgštis	1370	–	–	0,39	18,67
α -Ilangenas	1372	0,22	0,07	–	18,78
α -Kopaenas;	1376	1,19	0,71	–	18,90
Dekano rūgštis	?	0,58	0,62	–	19,05
Damaskenonas	1380	–	0,34	–	19,07
α -Funebrenas	1397	–	–	0,72	19,22
Tetradekanas	1400	–	0,84	–	19,37
Italicenas	1401	–	–	2,17	19,51
Heksahidropseudoionanas	?	0,1	–	–	19,55
n-Dodekanalis	1407	0,23	0,26	–	19,65
cis- α -Bergamotenas	1415	–	–	0,18	19,76
trans-Kariofilenas	1418	4,38	3,20	3,28	20,09
α -trans-iononas	1426	–	0,02	–	20,17
trans- α -Bergamotenas;	1436	–	–	0,72	20,31
Aromadendrenas	1439	0,10	0,05	0,77	20,53
cis-Geraniacetonas;	1453	0,66	0,24	–	20,75
Humulenai	1454	–	0,46	–	20,80
β -trans-Farnesenai	1458	1,04	–	–	20,85
Akoradienas	1463	–	–	0,53	21,00
γ -Dekalaktonas	1463	–	0,02	–	21,20
γ -Murolenas	1477	0,63	0,25	–	21,44
γ -Kurkumenai	1480	–	–	21,45	21,51
β -trans-Jononas	1485	0,87	0,11	–	21,65
β -Selinenai	1485	–	–	13,55	21,46
α -Selinenai	1494	–	–	8,13	21,71
Pentadekanas	1500	–	0,07	–	21,73
α -Murolenas	1499	0,42	0,24	–	22,01
Tridecinaldehidai	?	0,16	0,14	–	22,15
Butilintas hidroksitoluenai	1512	–	0,13	–	22,26
γ -Kadinenas	1513	0,69	0,29	0,82	22,38
cis-Kalamenenai	1521	–	–	0,43	22,58
δ -Kadinenas	1524	1,41	0,83	1,30	22,58
6,11-oksido-akor-4-dienai	1531	–	–	0,58	22,63
trans-kadina-1,4-dienai	1532	–	0,14	–	22,79
α -Kadinenas	1538	0,18	0,12	–	22,93
β -Kalakorenai	1542	0,17	0,09	–	23,07
Trans-Nerolidolis;	1564	0,17	0,10	–	23,47
Kariofileno alkoholis	1568	1,36	–	–	23,82
Lauro rūgštis	1568	1,07	5,09	2,98	23,94
Spatulenolis	1576	–	–	1,04	24,05
β -Kariofileno oksidas	1581	0,82	0,33	1,01	24,13
Heksadekanas	1600	–	0,56	–	24,31
Tetradekanalai	1611	0,31	0,40	–	24,71
Humuleno epoksidai II	1606	0,19	–	–	24,86
1,10-di-epi-Kubenolis	1614	0,35	–	–	25,39
epi-alfa-kadinolis	1640	0,38	–	–	25,75
1-epi-Kubenolis	1642	–	0,15	–	25,86
α -Murololis	1645	0,17	–	–	25,87
β -Eudesmolis	1649	–	–	8,34	26,01
α -Kadinolis	1653	0,33	0,45	–	26,09
Juniperio kamparas	1691	–	–	4,42	27,33
Methyl tetradecanoate	1724	–	0,04	–	27,42
Guaiolio acetatas	1724	–	–	0,84	27,47
Miristinė rūgštis	1749	8,44	13,18	–	28,58
Heksahidrofarnesilo acetonas	?	1,42	2,38	–	29,39
n-Oktadekanas	1800	–	0,62	–	30,17
Heksadekanoinė rūgštis	?	19,16	21,39	–	31,39

n-Nonadekanas	1900	–	0,29	–	32,51
Izofitolis	1944	0,19	0,22	–	32,74
linolo rūgšties metilo esteris	?	5,83	5,27	–	33,09
n-Eikosanas	2000	1,62	0,57	–	33,49
α -Kaurenas	2034	–	–	0,71	33,75
n-Heneikosanas	2100	0,59	2,21	0,24	34,45
n-Dokosanas	2200	0,13	0,84	0,29	36,13
n-Trikosanas	2300	0,29	3,84	–	36,72
Bendras kiekis:		84,55%	73,75%	89,02%	