

VILNIAUS UNIVERSITETAS

MEDICINOS FAKULTETAS

Biomedicinos mokslų institutas (Farmacijos ir farmakologijos centras)

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

Fenolinių junginių ir taninų kiekių palyginimas Ericaceae šeimos augaluose, ekstrakcijai naudojant skirtingų koncentracijų etanolį, metanolį ir acetoną.

Studentė: Ūla Rimkevičiūtė V kursas, III grupė

Darbo vadovė: asist. dr. Kristina Ložienė

parašas

Farmacijos ir farmakologijos centro vadovė:
doc. dr. Kristina Garuolienė

parašas

Biomedicinos mokslų instituto direktorius:
prof. dr. Algirdas Edvardas Tamošiūnas

parašas

Darbo įteikimo data: 2024 05 14

Registracijos Nr. _____

Studento elektroninio pašto adresas:

ula.rimkeviciute@mf.stud.vu.lt

2024

TURINYS

SANTRAUKA.....	5
SUMMARY	7
SANTRUMPOS.....	10
ĮVADAS.....	11
TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Fenoliniai junginiai	13
1.1.1. Fenolinių junginių klasifikavimas	13
1.1.2. Fenolinių junginių nauda	15
1.2. Flavonoidai	16
1.2.1. Flavonoidų reikšmė augalams	16
1.2.2. Flavonoidų reikšmė žmonėms	17
1.3. Fenolio rūgštys.....	17
1.3.1. Fenolinių rūgščių nauda.....	18
1.4. Taninai.....	19
1.4.1. Taninų svarba	20
1.5. Fenolinių junginių ekstrakcija	21
1.6. Tirpikliai ir jų koncentracijos.....	23
1.6.1. Etanolis	24
1.6.2. Metanolis	25
1.6.3. Acetonas.....	25
1.7. Erikinių šeima.....	26
1.8. Mėlynė (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	26
1.8.1. Mėlynės lapų ir vaisių cheminė sudėtis ir panaudojimas	27
1.9. Bruknė (<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.).....	32
1.9.1. Bruknės lapų ir vaisių cheminė sudėtis ir panaudojimas.....	33
1.10. Miltinė meškauogė (<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.)	38
1.10.1. Miltinės meškauogės cheminė sudėtis ir panaudojimas	40

1.11. Šilinis viržis (<i>Calluna vulgaris</i> L.)	42
1.11.1. Šilinio viržio cheminė sudėtis ir panaudojimas	43
2. TYRIMO METODIKA	47
2.1. Tyrimo objektas	47
2.2. Naudota aparatūra	47
2.3. Naudoti reagentai	48
2.4. Drėgmės kiekio ir sausosios medžiagos kiekio nustatymas augalinėje žaliavoje	48
2.5. Ekstraktų paruošimas	49
2.6. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas	50
2.7. Bendro taninų kiekio nustatymas	51
2.8. Statistinė analizė	53
3. TYRIMO REZULTATAI	54
3.1. Bendro fenolinių junginių ir taninų kiekio palyginimas rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrahcijai naudotų tirpiklių ir jų koncentracijų	54
3.1.1. Bendras fenolinių junginių kiekis rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrahcijai naudotų tirpiklių ir jų koncentracijų	54
3.1.2. Bendras taninų kiekis skirtingose rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrahcijai naudotų tirpiklių ir jų koncentracijų	57
3.2. Bendro fenolinių junginių ir taninų kiekio palyginimas miltinės mėškauogės lapuose	59
3.2.1. Fenolinių junginių kiekio palyginimas miltinės mėškauogės lapuose, ekstrahcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas	59
3.2.2. Taninų kiekio palyginimas miltinės mėškauogės lapuose, ekstrahcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas	64
3.3. Bendro fenolinių junginių ir taninų kiekio palyginimas mėlynės lapuose	66
3.3.1. Fenolinių junginių kiekio palyginimas mėlynės lapuose, ekstrahcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas	66
3.3.2. Taninų kiekio palyginimas mėlynės lapuose, ekstrahcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas	69
3.4. Bendro fenolinių junginių ir taninų kiekio palyginimas bruknės lapuose	71
3.4.1. Fenolinių junginių kiekio palyginimas bruknės lapuose, ekstrahcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas	71
3.4.2. Taninų kiekio palyginimas bruknės lapuose, ekstrahcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas	74

3.5. Bendro fenolinių junginių ir taninų kiekio palyginimas šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje	78
3.5.1. Fenolinių junginių kiekio palyginimas šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje, ekstraktacijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas	78
3.5.2. Taninų kiekio palyginimas šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje, ekstraktacijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas.....	82
4. IŠVADOS.....	85
5. REKOMENDACIJOS	87
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	88

SANTRAUKA

Ūlos Rimkevičiūtės baigiamasis darbas: **Fenolinių junginių ir taninų kiekių palyginimas Ericaceae šeimos augaluose, ekstrakcijai naudojant skirtingų koncentracijų etanolį, metanolį ir acetoną.**

Tyrimo tikslas: nustatyti ir palyginti fenolinių junginių ir taninų kiekius kai kurių Lietuvoje augančių Ericaceae rūšių augaluose, ekstrakcijai naudojant skirtingų koncentracijų etanolį, metanolį ir acetoną.

Uždaviniai:

1. Nustatyti ir palyginti fenolinių junginių ir taninų kiekius bruknės (*Vaccinium vitis-idaea*), mėlynės (*Vaccinium myrtillus*) ir miltinės meškauogės (*Arctostaphylos uva-ursi*) lapuose bei šilinio viržio (*Calluna vulgaris*) lapų ir žiedų mišinyje, nepriklausomai nuo naudojamo tirpiklio.
2. Nustatyti ir palyginti fenolinių junginių kiekius minėtų rūšių augalų žaliavose, ekstrahuojant skirtingų koncentracijų tirpikliais.
3. Nustatyti ir palyginti taninų kiekius minėtų rūšių augalų žaliavose, ekstrahuojant skirtingų koncentracijų tirpikliais.

Darbo metodika: Mėlynės ir bruknės lapai surinkti pietvakarių Lietuvoje, miltinės meškauogės lapai ir šilinio viržio lapai ir žiedai surinkti pietryčių Lietuvoje ir išdžiovinti kambario temperatūroje. Drėgmės kiekis augalinėje žaliavoje nustatytas terminio džiovavimo būdu. Ekstrakcija atlikta ultragarsu, tirpikliais naudojant 50 %, 70 % ir 100 % koncentracijų metanolį, acetoną ir etanolį. Bendras fenolinių junginių ir taninų kiekis mėlynės, bruknės, miltinės meškauogės lapuose bei šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje nustatytas Folin-Ciocalteu metodu spektrofotometriškai, paskaičiuotas pagal tanino rūgštį ir išreikštas procentais absoliučiai sausam žaliavos svoriui. Taninų kiekis apskaičiuotas iš bendro fenolinių junginių kiekio atimant fenolinius junginius, likusius po taninų prisijungimo prie polivinilpirolidono. Statistinė analizė atlikta STATISTICA® 7 ir Microsoft Excel 2023 programomis.

Rezultatai ir išvados: Nepriklausomai nuo ekstrakcijai naudotų tirpiklių ir jų koncentracijų, didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis nustatytas miltinės meškauogės lapuose ($32,4 \pm 8,2$ %), kuris buvo 5 kartus didesnis nei mėlynės lapuose ($6,6 \pm 3,3$ %) bei šilinio viržio lapų ir žiedų

mišinyje ($7,1 \pm 2,8$ %) ir 3 kartus didesnis nei bruknės lapuose ($12,3 \pm 3,5$ %). Didžiausias suminis taninų kiekis taip pat nustatytas miltinės meškauogės lapuose, kur jis sudarė 82 % bendro fenolinių junginių kiekio. Taninų mėlynės lapuose nustatyta 10, bruknės lapuose 3 bei šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje 5,5 karto mažiau nei miltinės meškauogės lapuose (atitinkamai $2,7 \pm 1,6$ %, $8,6 \pm 3,4$ %, $4,8 \pm 1,9$ % ir $26,6 \pm 7,2$ %). Didžiausias suminis fenolinių junginių ir taninų kiekis iš miltinės meškauogės lapų išekstrahuotas su 50 % etanoliu (šių junginių buvo nustatyta atitinkamai $42,9 \pm 3,7$ % ir $37,0 \pm 3,0$ %) ir 70 % etanoliu (atitinkamai $40,7 \pm 3,4$ % ir $34,4 \pm 1,6$ %); tiek fenolinių junginių, tiek taninų kiekiai, išekstrahuoti su šių koncentracijų etanoliais, tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė. Neskiestas acetonas buvo mažiausiai efektyvus iš miltinės meškauogės lapų ekstrahuojant tiek fenolinius junginius, tiek taninus. Nors didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis ($16,4 \pm 3,1$ %) bruknės lapuose nustatytas ekstrahuojant su 50 % etanoliu, jis reikšmingai nesiskyrė nuo kiekių, išekstrahuotų su 50 % acetonu ir 50 % metanoliu (atitinkamai $13,7 \pm 1,6$ % ir $14,3 \pm 0,9$ %). Tuo tarpu didžiausias taninų kiekis ($12,7 \pm 0,6$ %) bruknės lapuose nustatytas ekstrahuojant su 50 % metanoliu, tačiau jis taip pat reikšmingai nesiskyrė nuo taninų kiekių, gautų ekstrahuojant su 50 % acetonu (ir 50 % etanoliu (atitinkamai $12,0 \pm 1,2$ % ir $11,6 \pm 2,6$ %)). Mažiausiai fenolinių junginių ir taninų (atitinkamai $4,5 \pm 0,2$ % ir $2,1 \pm 0,5$ %) iš bruknės lapų išekstrahuota su neskiestu acetonu. Neskiestas metanolis, 50 % etanolis ir 50 % acetonas buvo labiausiai efektyvūs ekstrahuojant fenolinius junginius iš šilinio viržio žaliavos (fenolinių junginių nustatyta atitinkamai $9,0 \pm 0,4$ %, $8,9 \pm 0,1$ % ir $8,9 \pm 0,2$ %). Tačiau taninų iš šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio daugiausia išekstrahuota tik su 50 % acetonu (taninų nustatyta $7,5 \pm 0,2$ %). Iš šilinio viržio žaliavos ekstrahuojant fenolinius junginius ir taninus mažiausiai efektyvus buvo neskiestas acetonas. Fenolinius junginius iš mėlynės lapų efektyviausiai ekstrahavo tiek 50 % ir 70 % acetonas (šių junginių kiekis buvo atitinkamai $10,2 \pm 0,4$ % ir $9,1 \pm 0,3$ %), tiek 50 % ir 70 % etanolis (fenolinių junginių atitinkamai $9,4 \pm 0,4$ % ir $8,7 \pm 0,4$ %), nes skirtumai tarp jais išekstrahuotų fenolinių junginių kiekių buvo nereikšmingi. Daugiausia taninų iš mėlynės lapų išekstrahuota su 50 % acetonu. Mažiausiai efektyvūs fenolinių junginių ir taninų ekstrahavimui iš mėlynės lapų buvo neskiesti tirpikliai.

SUMMARY

Ūla Rimkevičiūtė Master's Thesis: **Comparison of Amounts of Phenolic Compounds and Tannins in Ericaceae Plants, Extracted Using Different Concentrations of Ethanol, Methanol, and Acetone.**

The aim of the study: to determine and compare the amounts of phenolic compounds and tannins in some Ericaceae species, growing wild in Lithuania, using different concentrations of ethanol, methanol and acetone for extraction.

Objectives:

1. To determine and compare the amounts of phenolic compounds and tannins in the leaves of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*), blueberry (*Vaccinium myrtillus*), and bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) as well as in the leaves-flowers mixture of heather (*Calluna vulgaris*), irrespective of solvent used.
2. Determine and compare the amounts of phenolic compounds in the raw materials of plants of these species when extracted with different concentrations of solvents.
3. Determine and compare the amounts of tannins in the raw materials of plants of the above-mentioned species when extracted with different solvent concentrations.

Methods: The leaves of blueberry and lingonberry were collected in south-western Lithuania, the leaves of bearberry as well as the mixture of leaves and flowers of heather were collected in south-eastern Lithuania. All raw materials were dried separately at room temperature. The moisture content in the plant material was determined by the thermal drying method. Extraction was performed using ultrasound, with solvents including 50%, 70%, and 100% concentrations of methanol, acetone, and ethanol. The total amounts of phenolic compounds and tannins in leaves of blueberry, lingonberry, and bearberry as well as in mixture of leaves and flowers of heather were determined spectrophotometrically by the Folin-Ciocalteu method, calculated based on tannic acid and expressed as a percentage of the absolute dry weight of the raw material. The tannin content was calculated from the total amount of phenolic compounds by subtracting the phenolic compounds remaining after tannin binding to polyvinylpyrrolidone. The statistical data analysis was performed using STATISTICA® 7 and Microsoft Excel 2023.

Results and conclusions: Regardless of the solvents used for extraction and their concentrations, the highest amount of total phenolic compounds was found in the leaves of bearberry ($32.4 \pm 8.2\%$), which was 5 times higher than in the leaves of blueberry ($6.6 \pm 3.3\%$) and in a leaves-flowers mixture of heather ($7.1 \pm 2.8\%$), as well as 3 times higher than in the leaves of lingonberry ($12.3 \pm 3.5\%$). The highest amount of total tannins was also found in bearberry leaves, where it accounted for 82% of the total phenolic compounds. Tannins in blueberry leaves were found to be 10 times, in bilberry leaves 3 times, and in a leaves-flowers mixture of heather 5.5 times less than in bearberry leaves ($2.7 \pm 1.6\%$, $8.6 \pm 3.4\%$, $4.8 \pm 1.9\%$ and $26.6 \pm 7.2\%$ respectively). The highest amounts of total phenolic compounds and tannins were extracted from bearberry leaves with 50% ethanol ($42.9 \pm 3.7\%$ and $37.0 \pm 3.0\%$, respectively) and 70% ethanol ($40.7 \pm 3.4\%$ and $34.4 \pm 1.6\%$, respectively); both the amounts of phenolic compounds and tannins extracted with these concentrations of ethanol did not significantly differ from each other. Undiluted acetone was the least effective in extracting both phenolic compounds and tannins from bearberry leaves. Although the highest amount of phenolic compounds ($16.4 \pm 3.1\%$) in lingonberry leaves was determined after extraction with 50% ethanol, it did not significantly differ from the amounts extracted with 50% acetone and 50% methanol ($13.7 \pm 1.6\%$ and $14.3 \pm 0.9\%$ respectively). Meanwhile, the highest amount of tannins ($12.7 \pm 0.6\%$) in lingonberry leaves was determined after extraction with 50% methanol, yet it also did not significantly differ from the tannin amounts obtained by extraction with 50% acetone and 50% ethanol ($12.0 \pm 1.2\%$ and $11.6 \pm 2.6\%$ respectively). The lowest amounts of phenolic compounds and tannins ($4.5 \pm 0.2\%$ and $2.1 \pm 0.5\%$ respectively) were extracted from bilberry leaves using undiluted acetone. Undiluted methanol, 50% ethanol, and 50% acetone were the most effective in extracting phenolic compounds from heather raw material (phenolic compounds were determined to be $9.0 \pm 0.4\%$, $8.9 \pm 0.1\%$, and $8.9 \pm 0.2\%$ respectively). However, tannins from a leaves-flowers mixture of heather were predominantly extracted only with 50% acetone (tannins were determined to be $7.5 \pm 0.2\%$). Undiluted acetone was the least effective for extraction of phenolic compounds and tannins from heather raw material. The most effective extraction of phenolic compounds from blueberry leaves was achieved with 50% and 70% acetone (the amounts of these compounds were $10.2 \pm 0.4\%$ and $9.1 \pm 0.3\%$, respectively) as well as with 50% and 70% ethanol (phenolic compounds were $9.4 \pm 0.4\%$ and $8.7 \pm 0.4\%$, respectively). The highest amount of tannins from blueberry leaves was extracted with 50% acetone. Undiluted

solvents were the least effective for the extraction of phenolic compounds and tannins from blueberry leaves.

SANTRUMPOS

FJ – fenoliniai junginiai

EGC – epikagalokatechinas

EGCG – epigalokatechin-3-galatas

GR – galo rūgštis

GRE – galo rūgšties ekvivalentas

HHDP – heksahidroksidifenoilas

KE – katechino ekvivalentai

KRE – kofeino rūgšties ekvivalentai

KVE – kvercetino ekvivalentas

PE – pirogalolio ekvivalentas

PGG – penta-O-galoil- β -d-gliukopiranozė

RUE – rutino ekvivalentas

TE – trolokso ekvivalentas

TR – tanino rūgštis

TRE – tanino rūgšties ekvivalentas

IVADAS

Fenoliniai junginiai (FJ), pasižymintys antioksidacinėmis savybėmis, yra augaluose paplitusi gausi antrinių metabolitų grupė. Šie junginiai yra plačiai naudojami maisto pramonėje, kosmetikoje ir medicinoje, siekiant apsaugoti organizmą nuo oksidacinio streso (1). Didelę FJ grupę sudaro taninai (2). Jie taip pat pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis. Augalinės kilmės FJ ir taninai yra intensyviai tyrinėjama tema, daugėja įrodymų, patvirtinančių jų apsauginį aktyvumą nuo įvairių neinfekcinių žmogaus ligų (3,4).

Skirtingų rūšių augalai sintetina ir kaupia skirtingus antrinius metabolitus, kurie pasižymi nevienodomis cheminėmis savybėmis (5). Antriniams metabolitams iš augalų išskirti gali būti naudojama ekstrakcija. Yra daug ekstrakcijos būdų, keletas dažniausiai naudojamų yra Soksleto ekstrakcija, maceracija, ekstrakcija ultragarsu ar mikrobangomis. Kiekvienas iš šių būdų turi savo privalumus ir trūkumus (6,7). Todėl siekiant kuo selektyviau ir efektyviau iš augalinių žaliavų išskirti mus dominančius antrinius metabolitus, reikia parinkti ne tik tinkamą ekstrahavimo būdą, bet ir tinkamus tirpiklius bei jų koncentracijas. Veiksniai, į kuriuos atsižvelgiama renkantis tirpiklį augalinei medžiagai ekstrahuoti, yra poliškumas ir (arba) tirpumas, saugumas, darbo paprastumas su tirpikliu ir tirpiklio grynumas (6). Paprastai ekstrahuojant junginius yra naudojami poliniai tirpikliai, tokie kaip metanolis, etanolis, etilo acetatas, taip pat dažnai naudojamas acetonas, dichlorometanas (pastarasis turi saugumo apribojimų) (8).

Daug FJ bei taninų kaupia Ericaceae (Ericaceae) šeimai priklausantys augalai (9). Erikiniai yra rūšimis gausi augalų šeima: pasaulyje žinoma apie 4250 šios šeimos rūšių, suskirstytų į 124 gentis ir 9 pošeimius (4). Daugumos Ericaceae šeimos rūšių augalai nuo seno naudojami liaudies medicinoje (10). Nemažai šios šeimos atstovų auga ir Lietuvoje, pavyzdžiui, mėlynė (*Vaccinium myrtillus* L.), bruknė (*Vaccinium vitis-idaea* L.), miltinė meškauogė (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng) ir šilinis viržis (*Calluna vulgaris* L.). Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad šių augalų lapuose bei kitose antžeminėse dalyse kaupiasi įvairūs FJ, tame tarpe ir taninai (10–12). Todėl, siekiant iš šių rūšių augalų išskirti kuo daugiau FJ ir taninų, aktualu šių junginių ekstrakcijai parinkti labiausiai tinkamus tirpiklius bei jų koncentracijas.

TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: nustatyti ir palyginti fenolinių junginių ir taninų kiekius kai kurių Lietuvoje augančių Ericaceae rūšių augaluose, ekstrakcijai naudojant skirtingų koncentracijų etanolį, metanolį ir acetoną.

Uždaviniai:

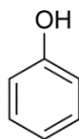
1. Nustatyti ir palyginti fenolinių junginių ir taninų kiekius bruknės (*Vaccinium vitis-idaea*), mėlynės (*Vaccinium myrtillus*) ir miltinės meškauogės (*Arctostaphylos uva-ursi*) lapuose bei šilinio viržio (*Calluna vulgaris*) lapų ir žiedų mišinyje, nepriklausomai nuo naudojamo tirpiklio.
2. Nustatyti ir palyginti fenolinių junginių kiekius minėtų rūšių augalų žaliavose, ekstrahuojant skirtingų koncentracijų tirpikliais.
3. Nustatyti ir palyginti taninų kiekius minėtų rūšių augalų žaliavose ekstrahuojant skirtingų koncentracijų tirpikliais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Fenoliniai junginiai

Augalų metabolitai skirstomi į dvi grupes: pirminius ir antrinius. Pirminiai metabolitai gali būti apibūdinami kaip junginiai, kurie yra būtini organizmui tinkamai funkcionuoti. Tai tokios medžiagos kaip baltymai, angliavandeniai, riebalų rūgštys ir nukleorūgštys. Antriniai metabolitai susidaro biosintezės metu iš pirminių metabolitų. Antriniai metabolitai, nors tiesiogiai ir nedalyvauja tokiuose augalų fiziologiniuose procesuose kaip fotosintezė ar kvėpavimas, yra būtini augalų išgyvenimui. Jų įvairi struktūra lemia skirtumus, lyginant su pirminiais metabolitais, ir dažniausiai yra atsakingi už augalų apsaugą (13,14).

FJ sudaro vieną gausiausių ir plačiausiai paplitusių antrinių metabolitų grupę augaluose. Dėl savo cheminės struktūros įvairovės gamtoje yra aptinkama daug FJ (14). Šiuo metu žinoma daugiau kaip 8 000 FJ – nuo paprastų molekulių, tokių kaip fenolinės rūgštys, iki labai polimerizuotų junginių, tokių kaip taninai (15). Ši didelė fitocheminių junginių grupė pasižymi tuo, kad jų struktūroje yra bent vienas aromatinis žiedas, kuriame vienas ar daugiau vandenilio atomų yra pakeisti hidroksilo grupėmis (1 pav.) (16,17).



1 pav. Cheminė fenolio struktūra

1.1.1. Fenolinių junginių klasifikavimas

FJ gali būti klasifikuojami įvairiai, nes jų struktūros yra labai įvairios ir heterogeninės – nuo paprastų molekulių iki sudėtingų polimerizuotų junginių (16). Skirstymas pagal anglies grandinės struktūrą yra pagrindinis FJ klasifikavimo būdas. Pagal anglies grandinę FJ galima suskirstyti į 10 pagrindinių grupių (1 lentelė) (18).

1 lentelė. Fenolinių junginių suskirstymas pagal anglies grandinę (18)

Grupė	Anglies atomų skaičius
Paprastieji fenoliai, benzochinonai	C6
Fenolinės (hidroksibenzoinės) rūgštys	C6-C1
Hidroksicinaminės rūgštys, fenilpropanoidai	C6-C3
Acetofenonai, fenilacto rūgštys	C6-C2
Ksantonai	C6-C1-C6
Stilbenai, antrachinonai	C6-C2-C6
Flavonoidai, izoflavonoidai	C6-C3-C6
Lignanai, neolignanai	(C6-C3) ₂
Ligninai	(C6-C3) _n
Kondensuoti taninai (proantocianidinai arba flavolanai)	(C6-C3-C6) _n

Pagal fenolio žiedų skaičių ir struktūrinius elementus, jungiančius žiedus tarpusavyje, tokie junginiai grupuojami kaip paprasti fenoliai, fenolinės rūgštys (kitai dar vadinamos hidroksibenzoinėmis), hidroksicinaminės rūgštys, fenilpropanoidai, acetofenonai, fenilacto rūgštys, ksantonai, stilbenai ir antrachinonai, flavonoidai bei izoflavanoidai, lignanai, neolignanai, ligninai ir kondensuoti taninai. Kiekvienai grupei būdingi skirtingi veikimo mechanizmai, kurie yra susiję su jų struktūriniu specifiškumu ir suteikia junginiams antioksidacinių savybių. Šie mechanizmai veikia daugiausiai neutralizuodami reaktyvius deguonies, azoto ir chloro junginius bei surišdami metalo jonus. Toks antioksidantų veikimas pasireiškia tiek oksidacijos proceso pradžioje, tiek jo eigos metu (18,19).

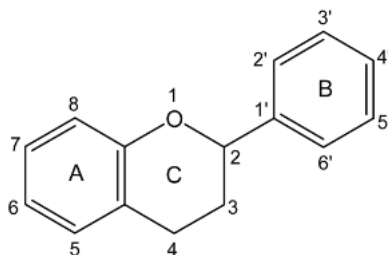
Literatūroje nurodama, jog augalinės kilmės FJ dar kitaip klasifikuojami kaip paprastieji fenoliai arba polifenoliai, atsižvelgiant į fenolio vienetų skaičių molekulėje. Paprastieji fenoliai, struktūrinėje molekulėje turintys vieną fenolio žiedą, apima kumarinus ir fenolines rūgštis (hidroksibenzenkarboksi ir hidroksicinamono) (20). Kita gerai žinoma FJ grupė, kurioje yra daugiau nei vienas fenolio žiedas, yra polifenoliai (21). Šiai yra priskiriami flavonoidai ir taninai, kurie būna kondensuoti arba hidrolizuoti (20).

1.1.2. Fenolinių junginių nauda

FJ yra plačiai tyrinėjami dėl jų savybės neutralizuoti oksidacinį stresą, nes lėtinis oksidacinis stresas yra susijęs su keliais medžiagų apykaitos sutrikimais ir įvairiomis ligomis, patologijomis, tokiais kaip nutukimas, diabetas ir širdies bei kraujagyslių ligos (19). Atsižvelgiant į atliktus mokslinius tyrimus, pastebima, kad FJ savybė sulaikyti laisvuosius radikalus ir vykdyti įvairias katalizės reakcijas yra aiškiai identifikuojama. Šie tyrimai leidžia išskirti skirtingas reakcijų kategorijas, kuriose pasireiškia vieno elektrono pernaša arba vandenilio atomo perdavimas (13). Be antioksidacinių savybių, literatūroje nurodoma, kad FJ taip pat pasižymi ir kitomis sveikatai naudingomis savybėmis, pavyzdžiui, antibakterinėmis, antihiperlipideminėmis, kardioprotekcinėmis, neuroprotektinėmis, priešvėžinėmis (22–25) ir antidiabetinėmis savybėmis (26). J. Riyaphan, D. Pham, M. Leong ir kt. (27) mokslininkai nustatė, kad iš natūralių šaltinių gaunami FJ yra potencialūs α -gliukozidazės ir α -amilazės fermentų inhibitoriai, galintys būti naudingi gydant II tipo cukrinį diabetą. D. Lin ir bendra autoriai (2016) panašiai aprašė ir polifenolių (įskaitant taninus) naudą: anot jų šie junginiai susiję su įvairiais medžiagų apykaitos reguliavimo aspektais, o polifenoliai reguliuoja angliavandenių ir lipidų apykaitą, todėl gali sušvelninti hiperglikemiją, dislipidemiją ir atsparumą insulinui (28). Be to, jie gali stimuliuoti insulino sekreciją, pagerinti β ląstelių funkciją, pagerinti riebalinio audinio metabolizmą ir sušvelninti oksidacinį stresą bei uždegiminiuosius procesus. Be to manoma, kad polifenoliai turi prevencinį poveikį ilgalaikėms diabeto komplikacijoms, įskaitant širdies ir kraujagyslių ligas, neuropatiją, nefropatiją ir retinopatiją (29). Kaip jau minėta, didelis antioksidantų kiekis augalinės kilmės maisto produktuose yra susijęs su oksidacinės pažeidimo sukeltų ligų slopinimu (20). Ir būtent įvairūs FJ atlieka svarbų vaidmenį apsaugant ląstelių sistemas nuo oksidacinės žalos (29). Epidemiologiniai duomenys rodo, kad vaisių ir daržovių vartojimas gali sumažinti riziką susirgti kai kuriomis vėžio formomis, širdies ir kraujagyslių ligomis, insultu. Anot R. Colomer ir kitų tyrėjų (2017) atlikta literatūros šaltinių ir duomenų bazių apžvalga apie polifenolius – natūralių ir sintetinių organinių cheminių medžiagų, turinčių fenolinių vienetų, struktūrinę klasę – patvirtina jų potencialą vėžio prevencijai ir gydymui (30). Be to, augalų audiniuose esantys FJ ne tik daro teigiamą poveikį žmogaus sveikatai, bet ir veikia kaip antioksidantai (31), aktyviai apsaugo augalus nuo bakterinių ir grybelinių infekcijų, ultravioletinių spindulių spinduliuotės, fizinių pažeidimų ir kitų stresą sukeliančių veiksnių (32).

1.2. Flavonoidai

Flavonoidai – didžiausia FJ grupė (33). Šiuo metu žinoma virš 6500 flavonoidų (34). Tai mažos molekulinės masės junginiai, turintys benzo- γ -pirono struktūrą. Flavonoidų pagrindą sudaro 15 anglies atomų skeletas (C₆-C₃-C₆), sudarytas iš heterociklinio benzopirano žiedo, prie kurio prijungtas aromatinis žiedas ir fenilo pakaitas (2 pav.) (35).



2 pav. Pagrindinė flavonoidų struktūra (A – aromatinis benzeno žiedas, B – fenilo pakaitas (propaninis fragmentas), C – heterociklinis benzopirano žiedas)

Flavonoidų molekulėje yra 2 benzeno žiedai, kuriuos jungia propaninis fragmentas (2 pav.). Dėl propaninio fragmento daugumoje flavonoidų susidaro heterociklas, kuris yra pirono arba γ -pirono darinys. Šių junginių pavadinimas kildinamas iš lotyniško žodžio „flavus“ (geltonas), nes jie buvo pirmieji iš augalų išskirti šios grupės geltonos spalvos junginiai (36). Nustatyta, kad flavonoidai pasižymi įvairiu biologiniu aktyvumu, įskaitant antimikrobinį, mitochondrijų adhezijos slopinamąjį, priešvėžinį, antiartritinį, antiangiogeninį, baltymų kinazių slopinamąjį ir t. t. (33). Pagal heterociklinio benzopirano žiedo struktūros skirtumus (skirtingas oksidacijos laipsnis ir pakaitai) išskiriami flavonoidų pogrupiai: flavonai, izoflavonai, flavanoliai, flavononai, chalkonai ir kt. (34). Labiausiai paplitę yra flavonai ir jų 3-hidroksi analogai (flavanoliai) (37). Flavonoidai dažniausiai būna hidroksilinti 3, 5, 7, 3', 4' ir (ar) 5' padėtyse. Dažniausiai viena arba kelios hidroksilo grupės būna metilintos, acetilintos ar sulfatuotos. Šie cheminiai procesai gali būti atsakingi už šių junginių įvairovę augaluose, kuri padeda jiems geriau prisitaikyti prie aplinkos. Konkretūs poveikiai priklauso nuo atliekamų modifikacijų tipo ir vietos molekulėje (38).

1.2.1. Flavonoidų reikšmė augalams

Flavonoidai apibūdinami kaip apsauginiai ir signaliniai cheminiai junginiai (39). Dėl judrumo stokos augalai yra išvystę daugybę prisitaikymo būdų, kaip galėtų augti ir prisitaikyti prie

nepalankių aplinkos sąlygų pasitelkiant įvairius apsauginius mechanizmus. Būtent flavonoidai ypač prisideda prie jų gebėjimo prisitaikyti. Šie junginiai turi svarbią reikšmę apsauginiuose mechanizmuose nuo šalčio. Pastebėta, jog sumažėjus temperatūrai, flavonoidai yra pernešami į epidermio vakuoles ir ten kontroliuoja osmosinį slėgį, kuris neleidžia ląstelėms užšalti ir taip padidina atsparumą žemai temperatūrai (39). Taip pat flavonoidai skatina sėklų dygimą ir augimą, suteikia apsaugą nuo patogenų ir plėšrūnų (14), spalvą suteikiantys antocianai privilioja vabzdžius, paukščius ir kitus gyvūnus, kurie padeda augalui daugintis ir plisti (40).

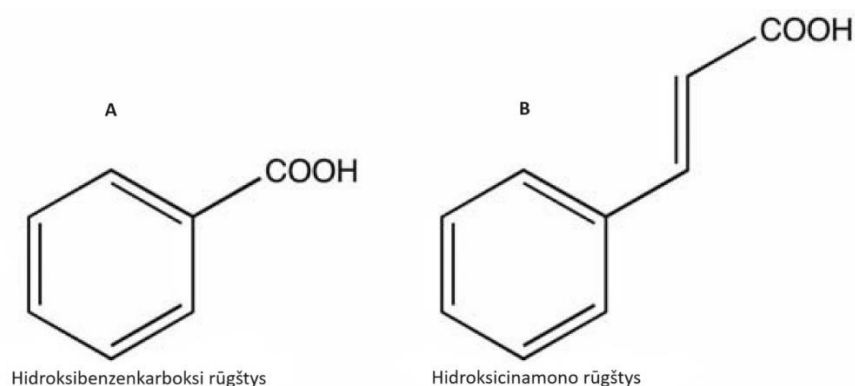
1.2.2. Flavonoidų reikšmė žmonėms

Įvairiuose moksliniuose šaltiniuose yra pabrėžiamas flavonoidų antioksidacinis, priešuždegiminis ir neuroprotekcinis poveikiai, kurie gali padėti atitolinti senėjimą ir pailginti sveiko gyvenimo trukmę. X. Fan ir kt. (2022) nurodo flavonoidų potencialą šalinant senstančias ląsteles, slopinant su senėjimu susijusius sekrecijos fenotipus ir palaikant medžiagų apykaitos homeostazę (41). Tyrimai, atlikti in vitro ir su ląstelių modeliais, parodė, kad flavonoidai gali slopinti prouždegiminių mediatorių sintezę ir veiklą, o tai rodo, kad šie junginiai pasižymi priešuždegiminiu poveikiu ir gali būti naudingi kovojant su uždegiminėmis būklėmis organizme (42). Be to, flavonoidai yra susiję su neuronų proliferacija ir išgyvenamumu, nes veikia įvairias ląstelių signalines kaskadas ir gali turėti teigiamą poveikį nervų ląstelių augimui ir išlikimui, padedant palaikyti sveikas neuronų funkcijas. Flavonoidai gali turėti įtakos mažinant oksidacinį stresą, taip pat gali prisidėti prie Alzheimerio ligos simptomų palengvinimo (43). Yra išskiriami tam tikri flavonoidai, kaip kvercetas ir stilbenas, resveratrolis, kurių vartojimas tiesiogiai susijęs su pagerėjusia širdies ir kraujagyslių būkle (44).

1.3. Fenolio rūgštys

Viena iš pagrindinių paprastųjų fenolių grupių augalų karalystėje – fenolio rūgštys (45). Šioms rūgštims yra būdinga, kad molekulėse yra benzeno žiedas, karboksilinė grupė ir viena ar daugiau hidroksilo ir (arba) metoksilo grupių (46). Fenolinės rūgštys sudaro monomerų pogrupį. Pogrupis dar skirstomas į dvi pagrindines grupes: hidroksibenzenkarboksi ir hidroksicinamono rūgštis bei jų darinius. Hidroksibenzenkarboksi rūgštys susideda iš septynių anglies atomų ir anglies grandinės pagrindą sudaro C1-C6 struktūra, hidroksicinamono rūgštys susideda iš devynių anglies atomų ir joms būdinga C3-C6 anglies grandinė (16) (3 pav.). Prie aromatinio žiedo prisijungusios skirtingos funkcinės grupės sudaro rūgščių darinius. Iš hidroksibenzenkarboksi

rūgštis darinių dažniausiai sutinkamos galo, vanilinė, siringinė ir protokatechuinė rūgštys (45), o dažniausi hidroksicinaminės rūgštis dariniai yra kavos, p-kumaro, ferulinė, sinapinė bei 3,4-dimetoksicinamo rūgštis (3,4-DMCA). Pastaroji dideliais kiekiais aptinkama augalų ląstelių sienelėse tarp kitų natūraliai randamų hidroksicinamoninių rūgščių (47). Paprastai šios rūgštys aptinkamos esterių, glikozidų arba amidų pavidalu, rečiau – laisvos formos.



3 pav. Pagrindinės fenolinių rūgščių struktūros

1.3.1. Fenolinių rūgščių nauda

Nors fenolinės rūgštys pasižymi antioksidaciniu aktyvumu, panašiu į flavonoidų, jų galimas poveikis sveikatai ir antioksidacinė nauda, palyginti su jų polimeriniais analogais, vis dar yra mažiau ištirta tema (20). A. Arceusz, M. Wesolowski ir P. Konieczynski (2013), apžvelgdami dešimtmečio (2003–2013) laikotarpyje taikytus fenolinių rūgščių ekstrakcijos ir nustatymo vaistiniuose augaluose metodus, teigė, jog pastaraisiais metais susidomėjimas šiomis rūgštimis augo dėl jų įvairių biologinių funkcijų (7). Fenolinės rūgštys yra junginių, pasižyminčių potencialiomis imunostimuliuojančiomis savybėmis, rinkinys. Jų yra įvairiuose vaistiniuose augaluose, be to jos plačiai naudojamos fitoterapijoje (48). Naujuosiuose tyrimuose augaliniai fenoliai apibūdinami kaip svarbi žmogaus mitybos raciono sudedamoji dalis, garsėjanti dideliu antioksidaciniu aktyvumu ir daugybe sveikatai naudingų savybių (49). Tai patvirtina ir Italijoje atlikto in vitro tyrimo rezultatai – fenolinės rūgštys turi potencialą stimuliuoti imuninę sistemą. Fenolinių rūgščių ir artimai susijusių jų darinių neuroprotekcinis poveikis 2022 metais buvo išsamiai aptartas G. Caruso ir bendraautorių apžvalgoje (50). Verta paminėti G. Budryn ir bendraautorių (2022) atliktą tyrimą, kuris parodė, kad hidroksibenzoinės rūgštys gali būti

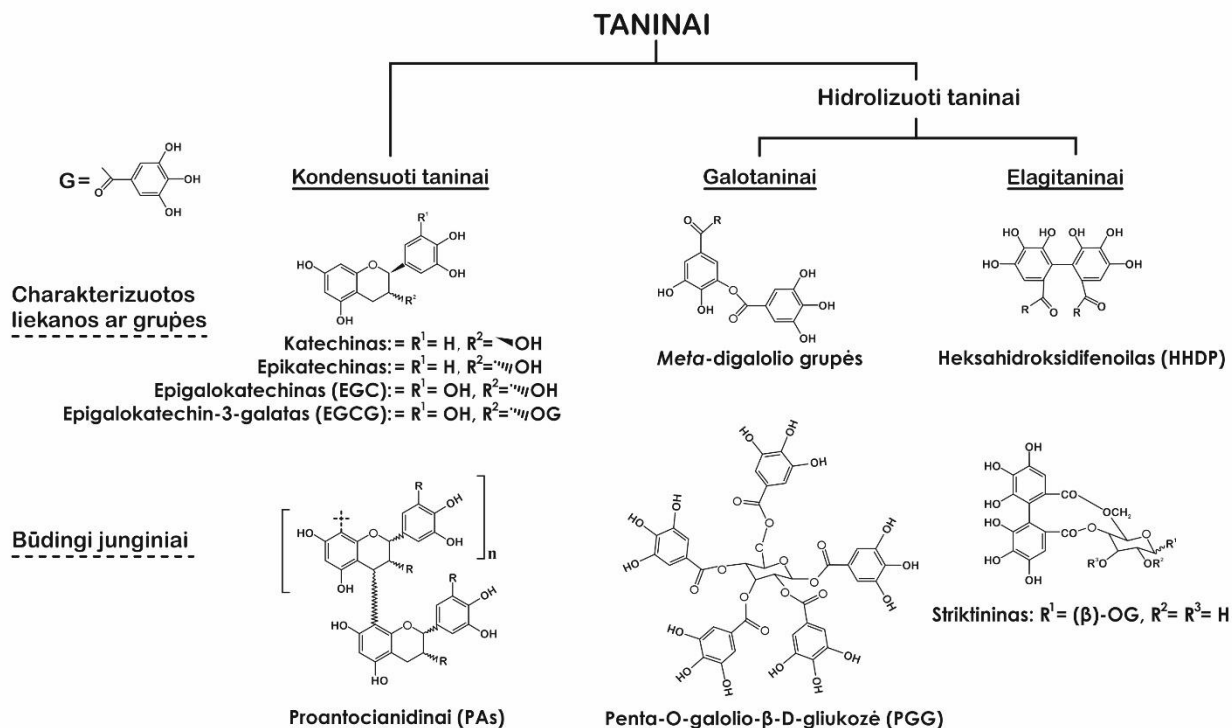
acetilcholinesterazės (AChE) inhibitoriai, o tai gali turėti įvairių poveikių, įskaitant kognityvinių funkcijų pagerinimą ir galimą fenolinių rūgščių naudojimą Alzheimerio ligos gydymui (48).

1.4. Taninai

Didelę FJ grupę sudaro taninai (2). Augaliniai taninai yra plačiai paplitę augalų karalystėje. Tai oligomeriniai arba polimeriniai polifenoliai, kurie pagal struktūrą ir biogenezę yra suskirstyti į dvi pagrindines grupes: kondensuotus taninus ir hidrolizuotus taninus. Taninų klasifikavimas su būdingais junginių pavyzdžiais pateiktas 4 paveiksle.

Kondensuoti taninai, dar vadinami proantocianidiniais (arba nehidrolizuojamais taniniais) (37), yra oligomeriniai arba polimeriniai flavan-3-oliai, kurie gali būti esterifikuojami, kad susidarytų flavan-3-olio galatai, pavyzdžiui, epikagalokatechinas (EGC) ir epigalokatechin-3-galatas (EGCG) (4 pav.). Šios medžiagos kaupiamos įvairių augalų sėklose, vaisiuose ir kituose audiniuose (51).

Hidrolizuoti taninai yra cukrų esteriai su fenolinėmis rūgštimis ir yra arba galotaninai (gliukozės galoilo esteriai, pvz., pentagalio gliukozė), arba elagitaninai (heksahidrodidifeninės rūgšties, gautos iš dviejų galo rūgšties vienetų, esteriai su gliukoze) (37). Pagal 4 lentelę taninų klasifikacija į hidrolizuojamus taninus apima du pagrindinius poklasius: galotanus ir elagitaninus. Šie poklasiai, kilę iš penta-O-galoil- β -d-gliukopiranozės (PGG), pasižymi skirtingomis struktūrinėmis savybėmis. Galotanimams būdingos meta-digalloilo grupės, o elagitanimams – heksahidroksidifenoilo (HHDP) liekanos. Pati PGG yra paprastos galotanimų formos, o striktininas – paprastos elagitanimų formos (4 pav.). Be to PGG atlieka pagrindinį vaidmenį kaip pirmtakas tiek galotanimų, tiek ir elagitanimų biosintezėje. Įvairūs vaisiai, pavyzdžiui, gervuogės, braškės, avietės ir granatai, yra gausūs galotanimų ir elagitanimų šaltiniai, o tai lemia ir antioksidacinį jų aktyvumą bei suteikia vaisiams ir daržovėms tam tikrą skonį. Tyrėjai nustatė bendrą abiejų šio poklasio taninų cheminę savybę, jog hidrolizės metu veikiant tanazėms, yra gaunamos atitinkamai galo rūgštis ir elago rūgštys, o tai yra naudinga analizuojant šiuos taninus augaluose (51).



4 pav. Taninų struktūros schema (51)

Taninai, randami įvairiuose augaluose ir gali būti kaupiami bet kurioje augalo dalyje. Sukauptų taninų kiekis priklauso nuo tokių veiksnių kaip augalų rūšis, augalo dalis, derliaus nuėmimo laikas ar apšvietimo intensyvumas. Dažniausiai sausumos augalų audiniuose yra tarp 2–5 % taninų šviežioje žaliavoje, o džiovintoje žaliavoje jų kiekis gali siekti iki 25 % (2). Be to, taninai randami ir pašariniuose augaluose bei jų produktuose (51). Taninai taip pat yra dažna daugelio vaistinių augalų sudedamoji dalis (37). Nėra universalių taninų ekstrakcijos sąlygų ir paprastai procedūros optimizuojamos atsižvelgiant į konkrečią augalinę žaliavą, konkretų mėginį (2).

1.4.1. Taninų svarba

Augaliniams polifenoliams priskiriami taninai atlieka svarbų vaidmenį augalų ir aplinkos sąveikoje. Dėl savo savybės jungtis su baltymais, šie junginiai veikia kaip augalų gynybos mechanizmas (52). Taip pat jie atbaido žolėdžius savo specifiniu skoniu. Augaluose kondensuoti ir hidrolizuoti taninai atlieka svarbų vaidmenį kovojant su biotiniu ir abiotiniu stresu. Šie vaidmenys apima antimikrobinį ir antiherbicidinį poveikį, pagalbą augalams kovojant su patogenais ir

konkuruojant dėl išteklių su kaimyniniais augalais (51). Tam tikri aplinkos veiksniai ir patologinės sąlygos, pavyzdžiui, vabzdžių antpuoliai ar druskingumas, gali padidinti taninų gamybą augaluose (2).

Svarbu atkreipti dėmesį į įvairias taninų panaudojimo sritis ir jų galimą naudą žmogaus sveikatai. Taninai literatūroje minimi kaip svarbūs augalų antriniai metabolitai, ypatingą dėmesį skiriant jų galimam priešvėžiniam poveikiui. Naujausiuose tyrimuose aptariamos iš vaistinių augalų išgautų taninų citostatinės ir priešvėžinės savybės, taip pat jų cheminės struktūros, veikimo mechanizmai ir biologinis prieinamumas. Yra pabrėžiama ir atskirų taninų junginių ir polifenolinių ekstraktų tyrimo svarba siekiant nustatyti jų potencialą vėžio prevencijai ir gydymui (53). Taninai vertinami dėl sutraukiančių savybių, kurios atsiranda dėl jų gebėjimo sąveikauti su baltymais. Ši sąveika tarp taninų ir baltymų sudaro apsauginį sluoksnį esant skrandžio opoms ir padidina atsparumą cheminiams ir mechaniniams pažeidimams, dirginimui. Be to, taninai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis ir padeda atkurti audinius. Nurodoma, kad jie pasižymi poveikiu prieš *Helicobacter pylori* ir dalyvauja prieš uždegiminiame procese virškinamajame trakte (54). Taninai, be jau minėtų savybių, pasižymi ir antimutageninėmis bei antimikrobinėmis savybėmis, slopindami įvairių grybelių, mielių, bakterijų ir virusų augimą. Tyrimai rodo, kad taninų vartojimas yra susijęs su įvairiais fiziologiniais poveikiais, tokiais kaip kraujo krešėjimo pagreitinimas, kraujospūdžio mažinimas ir serumo lipidų kiekio sumažinimas (55). Pavyzdžiui, 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-beta-D-glukozė, kaip vienas iš taninų atstovų, išsiskiria dideliu potencialu gydyti diabetą, nes yra pastebėta, kad jis pagerina gliukozės įsisavinimą (56).

Anksčiau buvo manyta, kad taninai visų pirma veikia virškinimą, nes trukdo efektyviai paversti įsisavintas maistines medžiagas naujomis medžiagomis organizme. Daug taninų turinčių maisto produktų, tokių kaip betelio riešutai ir žolelių arbatos, vartojimas buvo siejamas su padidėjusia tam tikrų vėžio rūšių, įskaitant stemplės vėžį, rizika, o tai leido manyti, kad taninai gali būti kancerogeniški (55).

1.5. Fenolinių junginių ekstrakcija

Ekstrahavimas – biologiškai aktyvių junginių išgavimas iš augalinės žaliavos (57). Ekstrakcijos procesas, kurio metu iš augalinių šaltinių gaunami FJ, pagrįstas difuzijos principu ir gali vykti tiek skysčio-skysčio, tiek kietojo kūno-skysčio sistemose. Ekstrakcijos metu susidaro

skirtingos koncentracijos tarp ekstrahuojamos žaliavos ląstelių vidaus ir išorės, o procesas laikomas baigtu, kai tirpalo koncentracija ląstelėse sutampa su tirpalo koncentracija jų išorėje (58).

Augaluose gali kauptis tiek monomeriniai, mažos molekulinės masės junginiai (pvz., fenolinės rūgštys, antocianidinai), tiek polimeriniai FJ (pvz., taninai). FJ taip pat gali būti susijungę su angliavandeniais ar baltymais. Dėl šios priežasties nėra universalios ekstrakcijos procedūros, tinkamos visiems FJ. Ekstrakcijai naudojama daugybė metodų, pradedant tradiciniais metodais, tokiais kaip Soksleto ekstrakcija ir maceracija, ir baigiant šiuolaikiniais metodais, tokiais kaip ekstrakcija ultragarsu ir ekstrakcija mikrobangų krosnelėmis (7). Kiti galimi ekstrakcijos būdai: ekstrakcija superkritiniu skysčiu, aukštos įtampos elektros iškrova, ekstrakcija impulsiniu elektriniu lauku, ekstrakcija fermentais ir kt. (59). Ekstrakcija skysčiu yra labiausiai paplitęs augalų FJ ekstrakcijos metodas, kuriam gali būti naudojami tokie tirpikliai kaip etanolis, metanolis, acetonas arba tirpiklių mišiniai (60). Šios ekstrakcijos pavyzdžiai yra Soksleto metodas ir maceracija (61), ekstrakcija ultragarsu taip pat priskiriama prie kietųjų ir skystųjų medžiagų ekstrakcijos metodų (62) (2 lentelė).

2 Lentelė. Dažniausiai naudojamų ekstrakcijos metodų palyginimas (63)

Metodas	Tirpiklis	Temperatūra	Slėgis	Laikas	Suvartojamo organinio tirpiklio tūris	Išskirtų gamtinių produktų poliškumas
Maceracija	Vanduo, vandeniniai ir nevandeniniai tirpikliai	Kambario temperatūra	Atmosfera	Ilgas	Didelis	Priklauso nuo ekstrahuojančio tirpiklio
Soksleto ekstrakcija	Organiniai tirpikliai	Šiluma	Atmosfera	Ilgas	Vidutiniškas	Priklauso nuo ekstrahuojančio tirpiklio
Ekstrakcija ultragarsu	Vanduo, vandeniniai ir nevandeniniai tirpikliai	Kambario temperatūra arba kaitinant	Atmosfera	Trumpas	Vidutiniškas	Priklauso nuo ekstrahuojančio tirpiklio

Apibendrinant 2 lentelę galima daryti išvadą, kad pagrindiniai trijų metodų skirtumai yra susiję su ekstrakcijos trukme ir organinių tirpiklių sąnaudomis. Ekstrakcija ultragarsu yra geresnė alternatyva tradiciniams metodams, tokiems kaip maceracija ir Soksleto ekstrakcija. Maceracijos

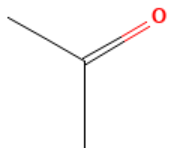
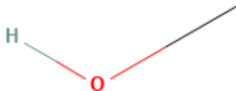

ir Soksleto ekstrakcijos procesai yra ilgesni, o naudojant ultragarso bangų energiją, ekstrakcija pagerėja, nes pagreitėja tirpinimas, difuzija ir šilumos perdavimas. Taip pat ekstrakcijos ultragasu metodas efektyvesnis, nes sunaudojama mažiau tirpiklio ir energijos bei užtrunka trumpiau (2 lentelė).

Po ekstrakcijos FJ identifikavimas ir jų kiekybinis įvertinimas atliekamas taikant skysčių chromatografiją, dažnai kartu su masių spektrometrija (7). Optimalus FJ Išgavimas iš skirtingų rūšių augalų priklauso nuo to, kokie konkrečiai FJ kaupiasi kiekvienos rūšies augaluose ir kokios savybės šiems junginiams yra būdingos. O ekstrakcijos procesui įtakos turi keli pagrindiniai parametrai, tokie kaip ekstrakcijos laikas, temperatūra, tirpiklio ir mėginio santykis, naudojamas tirpiklis (45). Be to, be optimalaus ekstrahavimo tirpiklio parinkimo FJ išėgai labai svarbūs laikas ir temperatūra: paprastai didėjantis laikas ir temperatūra skatina analitės tirpumą, tačiau dėl ilgesnio ekstrakcijos laiko ir aukštos temperatūros FJ pradeda irti arba pradeda vyksti nepageidaujamos reakcijos, tokios kaip fermentinė oksidacija. Nuo ekstrakcijos trukmės ir temperatūros priklauso galimas medžiagų skilimas ar nepageidaujamos reakcijos (64,65). Negalima išskirti ir pritaikyti tik vieno ekstrakcijos metodo visoms augalų rūšims, kadangi FJ augaluose yra pasiskirstę nevienodai, be to skiriasi ir jų stabilumas. Priklausomai nuo taikyto ekstrakcijos metodo ir pasirinktų tirpiklių, gaunami skirtingi rezultatai. Metodikos turėtų būti pritaikytos atsižvelgiant į mėginio ir norimų analizuoti medžiagų savybes, taip pat į tyrimo objektą, tyrimo tikslus (66).

1.6. Tirpikliai ir jų koncentracijos

FJ ekstrahuoti naudojami organiniai arba neorganiniai tirpikliai. Tirpiklių, tokių kaip vanduo, acetonas, etilacetatas, alkoholiai (metanolis, etanolis ir propanolis) ir jų mišiniai, pasirinkimas gali labai įtakoti FJ išėgą tiek kiekybiniu, tiek kokybiniu požiūriu (45). Alkoholiai etanolis ir metanolis yra apibūdinami kaip labiausiai universalūs tirpikliai (63). FJ cheminėje struktūroje dažnai turi ir hidrofiliųjų (polinių), ir hidrofobiųjų (nepolinių) sričių (67). Todėl jie gali tirpti vidutinio poliškumo tirpikliuose, pavyzdžiui, alkoholiuose (pvz., metanolyje ir etanolyje) ir acetone (68). Dėl šių savybių minėti tirpikliai yra veiksmingi ekstrahuojant FJ iš augalinių medžiagų ir kitų šaltinių.

3 lentelė. Tirpiklių palyginimo lentelė

Tirpiklis	Acetonas	Metanolis	Etanolis
Cheminės struktūros pavaizdavimas			
Cheminės struktūros aprašymas	Sudarytas iš trijų angliavandenilių grandinės, kurios centre yra karbonilo grupė (C=O)	Sudarytas iš metilo grupės (-CH ₃), sujungtos su hidroksilo grupe (-OH)	Sudarytas iš dviejų angliavandenilių grandinės (-CH ₂ CH ₃) su prijungta hidroksilo grupe (-OH)
Molekulinė formulė	C ₃ H ₆ O arba CH ₃ -CO-CH ₃	CH ₄ O arba CH ₃ OH	C ₂ H ₆ O arba CH ₃ CH ₂ OH
Šaltinis	(69)	(70)	(71)

1.6.1. Etanolis

Etanolis dėl savo universalių savybių, aprašytų literatūroje, yra optimalus tirpiklis. Jis pasižymi plačiu lydymosi ir virimo temperatūrų diapazonu (nuo –114 iki 78 °C), todėl gali būti naudojamas įvairiomis ekstrahavimo sąlygomis. Be to, etanolis yra vidutinio poliškumo (4,4) (72), todėl juo galima ekstrahuoti tokius junginius, kaip fenoliai, kurie yra žinomi dėl savo tirpumo vidutinio poliškumo aplinkoje (73). Hidroksilo grupės buvimas etanolio struktūroje padidina jo poliškumą, tirpumą ir gebėjimą sąveikauti su kitomis molekulėmis (3 lentelė). Etanolio hidroksilo grupė taip pat gali sudaryti vandenilinius ryšius su vandens molekulėmis, todėl etanolis gali maišytis su vandeniu ir tirpinti polinius tirpiklius (74). Ši etanolio savybė yra labai svarbi naudojant jį tokiuose procesuose, kaip ekstrakcija. Tirpiklių poliškumas, kurį taip pat lemia alkoholio kiekis ir hidratacijos lygis, vaidina svarbų vaidmenį nustatant jų ekstrakcijos efektyvumą ir gebėjimą ekstrahuoti polines molekules, pavyzdžiui, FJ (75). P. Subra-Paternault ir bendraautorų (2022) atliktas tyrimas su graikinių riešutų (*Juglans regia* L.) išspaudomis parodė, kad didėjanti etanolio tirpiklio hidratacija (didesnis vandens kiekis) teigiamai veikia FJ išėigą. O efektyviausias buvo ekstrakcijai panaudotas 58 % etanolis: FJ su juom buvo išekstrahuota daugiausiai (75). Tyrime su

Carménère veislės vynuogių išspaudomis didesnė etanolio koncentracija buvo susijusi su geresniu polifenolių (įskaitant FJ) tirpumu ir ekstrakcijos veiksmingumu (76). Grynas vanduo pasižymi didesniu poliškumu nei etanolis. Šis skirtumas gali lemti geresnį FJ išgavimą naudojant vandens ir etanolio mišinius, nes praskiedus etanolį sumažėja bendras tirpiklio poliškumas (76).

1.6.2. Metanolis

Metanolio struktūra, kuriai būdinga metilo grupė, sujungta su hidroksilo grupe (3 lentelė), suteikia molekulei didelį poliškumą, todėl metanolis labai gerai tirpsta vandenyje ir kituose poliniuose tirpikliuose. Hidroksilo grupė metanolio molekulėje yra polinė dalis ir gali sudaryti vandenilinius ryšius. Šis poliškumas palengvina vandenilinių ryšių sąveiką, todėl metanolis geriau maišosi su vandeniu (74). Dėl savo poliškumo ir gebėjimo tirpinti įvairius organinius ir neorganinius junginius jis tinka tiek polinėms, tiek nepolinėms medžiagoms ekstrahuoti.

A. Saha ir bendraautorių tyrimu (2021) buvo siekta palyginti skirtingų tirpiklių FJ ekstrakcijos iš (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) žolės efektyvumą ir nustatyta, kad iš visų tirtų polinių tirpiklių 50 % vandeninis metanolis pasižymėjo didžiausia FJ išeiga (77). T. Sultana ir kt. (2022) nustatė, jog skiestas 50% metanolis buvo geresnis tirpiklis ekstrahuojant FJ iš *Polygonum glabrum* Wild. lapų už neskiestą metanolį, be to geresnis tirpiklis ir už neskiestą ir skiestą acetoną (78).

1.6.3. Acetonas

Acetonas dėl savo savybių yra laikomas stipriu tirpikliu FJ iš augalų išskirti. Jo veiksmingumas siejamas su jo deriniu su vandeniu, kuris padidina ekstrahavimo galimybes, nes panaudoja poliarines vandens savybes. Nepaisant to, kad anksčiau acetonas buvo siejamas su mažiau polinių junginių ekstrakcija, jis pasirodė esąs labai veiksmingas ekstrahuojant polinius FJ (įskaitant taninus). Tyrimai rodo, kad ekstraktai, gaunami naudojant acetono ir vandens mišinį, pasižymi chemoprolifaktinėmis savybėmis prieš tam tikrus vėžinius susirgimus, o tai dar labiau pabrėžia acetono kaip galingo tirpiklio vaidmenį ekstrahuojant FJ (79).

Acetono struktūra su centrine karbonilo grupe ir trijų angliavandenilių grandine (3 lentelė), lemia jo vidutinį poliškumą, tirpumą vandenyje. Dėl karbonilo grupės acetonas yra poliškesnis, lyginant su nepoliniais angliavandeniliais (80). Acetonas gerai tirpsta vandenyje dėl savo gebėjimo

sudaryti vandenilinius ryšius su vandens molekulėmis (81). Nors acetonas ne taip gerai maišosi su vandeniu kaip metanolis, jis vis tiek gali ištirpti vandenyje, ypač žemesnėje temperatūroje (78).

Nustatyta, kad tirpalo poliškumas, kuriam įtakos turi acetono koncentracija, atlieka svarbų vaidmenį Ekstrakcijos efektyvumui. T. Vo ir bendraautorijų tyrime (2022), atliktame su *Citrullus lanatus* žieve, didesnis bendras FJ ir bendras flavonoidų kiekis buvo išekstrahuotas su 70 % acetonu, nei su 50 % acetonu. Tai siejama su tirpalo poliškumo sumažėjimu, dėl kurio padidėja FJ ir flavonoidų tirpumas. Tačiau acetono koncentraciją padidinus iki 90 %, ekstrakcijos efektyvumas sumažėjo, o tai siejama su neigiamu didelės acetono koncentracijos poveikiu, pavyzdžiui, baltymų denatūracija ir pektinų dehidratacija, kas galėjo trukdyti FJ ir flavonoidų, esančių matricoje, difuzijai į terpę (82). Nors šiame tyrime nustatyta, kad 70 % acetonas yra optimalus FJ ir flavonoidams iš arbūzo žievės išskirti, būtina pripažinti, kad kituose tyrimuose skirtingos tirpiklio koncentracijos gali duoti geresnių rezultatų, todėl ši išvada būdinga tik šiam tyrimui. Pavyzdžiui, tiriant *Eucalyptus camaldulensis* augalus acetonas pasižymėjo geresnėmis ekstrakcijos galimybėmis, palyginti su metanoliumi, etanoliumi ir vandeniu, todėl jis apibūdinamas, kaip labiausiai tinkančiu tirpikliu FJ iš tirtos augalo išskirti (79).

1.7. Erikinių šeima

Erikinių (Ericaceae) šeimai priklauso žolės, krūmai, krūmokšniai ir medžiai, dažniausiai augantys rūgščiuose ir nederlinguose dirvožemiuose. Žinoma apie 4250 šios šeimos rūšių, suskirstytų į 124 gentis ir 9 pošeimius (10). Šios šeimos atstovai dažniausiai turi visžalius lapus, kurių išsidėstymas ant stiebo gali būti pražanginis, priešinis arba menturinis. Žiedai keturnariai ar penkianariai, dvilyčiai, taisyklingi, susitelkę į žiedynus arba pavieniai. Vainiklapiai retai laisvi, daugiausiai suaugę. Vaisius – daugiasėklė dežutė, uoga arba mažasėklis kaulavaisiukas. Sėklos kabančios, paprastai labai mažos, išplatinamos vėjo (83). Visi erikiniai yra rūgščių dirvožemių – oligotrofinių pelkių, spygliuočių miškų, smėlynų – augalai, dažnai sudarantys sąžalynus (84). Ericaceae šeimai priklausantys augalai kaupia daug FJ bei taninų (9). Dėl kaupiamo gausaus FJ kiekio, Ericaceae šeimos augalai yra plačiai naudojami gydymo tikslais.

1.8. Mėlynė (*Vaccinium myrtillus* L.)

Mėlynė (*Vaccinium myrtillus* L.) (5 pav.) daugiametis (29), išsišakojęs 15 – 50 cm aukščio puskrūmokšnis, toli šliaužiančiu požeminiu stiebu ir kylančiomis žaliomis, keturbriaunėmis šakomis (83). Lapai atvirksčiai kiaušiniški, žalsvai žalios spalvos, jų viršūnė nusmailėjusi, pamatas

apskritas, trumpakočiai, pliki, lygiais kraštais. Žiedai – baltos arba rausvos spalvos (86) – pavieniai lapų pažastyse, kabantys ant trumpo žiedkočio (83). Taurelė suaugusi su mezgine, neryškiai penkiaskiautė, rečiau keturskiautė. Vainikėlis su penkiomis trumpomis, bukomis skiautelėmis. Vaisius – rutuliška, sultinga, daugiasėklė uoga, dažniausiai su apnašu, jos viršūnėje yra taurelės pėdsakai. Sėklos smulkios, rudos, šiek tiek pusmėnuliškos. Žydi gegužę – birželį. Mėlynės daugiausia auga būriais ne per daug ūksmėtuose, drėgnų, puveningų, bet rūgščių dirvožemių miškuose (83). Aptinkama dažniausiai pušnyuose su eglų priemaiša, pelkėtuose pušnyuose, tyrlaukiuose, mišriuose miškuose, aukštapelkėse ant kemsų, retmiškiuose, rečiau – lapuočių miškuose (83,85). Augalas plačiai paplitęs Europoje, Rusijos europinėje dalyje, Kaukaze, Vakarų ir Rytų Sibire (vietomis) (83), Azijoje, Kanadoje bei Šiaurės Amerikoje (87). *V. myrtillus* paplitusios visoje Lietuvoje, gausiausiai augaviečių yra pietinėje ir rytinėje šalies dalyse (88). Mėlyniniai pušynai kartu su mėlyniniais eglynais sudaro 25 % viso Lietuvos miškų ploto. Taip pat mėlynių pasitaiko ir beržnyuose (83). Šie puskrūmokšniai šalčiams neatsparūs – besniegėmis žiemomis nušąla šakelės, tačiau greitai atželia. Žydėjimo metu nuo šalnų nukenčia mėlynių lapai. Vaistinei augalinei žaliavai naudojami mėlynių lapai (*Myrtilli folium*), džiovinti mėlynių vaisiai (*Myrtilli fructus siccus*) ir švieži mėlynių vaisiai (*Myrtilli fructus recens*). Lapai skinami gegužės pabaigoje – liepą, kol dar būna visai žali, vaisiai renkami liepą – rugpjūtį (89).



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

1.8.1. Mėlynės lapų ir vaisių cheminė sudėtis ir panaudojimas

Anot Ispanijos mokslininkų L. Gil-Martínez ir kitų (2023) mėlynių vaisiai ir lapai, pasižymi įvairiomis gydomosiomis savybėmis ir yra laikomi „supermaistu“. Tai reiškia yra turtingi

biologiškai aktyvių junginių, gyvybiškai svarbių gerai savijautai, šaltiniai. *V. myrtillus* lapai bei uogos nuo senovės naudojami medicinos praktikoje bei sveikatos stiprinime (90).

Mėlynių cheminė sudėtis yra gerai aprašyta dokumentuose ir yra pakankamai įrodymų, kad antocianinų sudedamosios dalys lemia farmakologinį mėlynių poveikį (37,91). *Vaccinium* genties rūšys yra geras FJ, tokių kaip antocianinų, proantocianidinų, kvercetino ir hidroksicinaminių rūgščių, šaltinis (10). Pastebėta, jog Šiauriniuose Europos regionuose, pavyzdžiui, Suomijoje, augančių mėlynių uogose ir lapuose yra gausu FJ, įskaitant didelį kiekį antocianinų (92).

Mėlynių lapuose yra kaupiama daug FJ, ypač hidroksicinaminių rūgščių, flavonolių, katechinų ir proantocianidinų (16). O pagrindinis FJ mėlynių lapuose buvo chlorogeninė rūgštis (17). Naudojant 70 % etanolį iš Juodkalnijoje augusių mėlynių lapų Soksleto metodu buvo išekstrahuota 173,19 mg GRE/g, o naudojant maceraciją – 217,59 mg GRE/g FJ; bendras taninų kiekis lapuose varijavo atitinkamai nuo 6,49 % iki 9,17 %, o bendras flavonoidų kiekis – nuo 1,46 % iki 2,38 % (29). Tų pačių mėlynių lapuose buvo identifikuota aštuoniolika skirtingų FJ ir šeši neidentifikuoti kvercetino, chlorogeninės rūgšties ir stilbenoidų dariniai. Šie rezultatai parodė, kad išekstrahuojamų FJ kiekis labai skyrėsi priklausomai nuo ekstrakcijos metodo. Vyraujanti fenolinė rūgštis mėlynės lapuose buvo chlorogeno rūgštis (nuo 45,51 mg/g (nustatyta maceracijos metodu) iki 59,70 mg/g (ekstrahuojant infuzijos metodu)). Fenolinės rūgštys pasižymėjo savybe, kad gali skatinti gliukozės pasisavinimą, panašiai kaip įprasti geriamieji hipoglikemizuojantys vaistai. Mėlynės lapuose taip pat aptikta protokatechininės rūgšties arba 3,4-dihidroksibenzenkarboksirūgšties 1,40 mg/g (maceruojant) iki 1,74 mg/g (infuzijos metodu). Kitų polifenolio rūgščių (galo, kavos, p-kumaro, sinapo ir ferulo rūgščių) buvo nustatyta mažiau (32).

Mėlynių lapuose be minėtosios chlorogeno rūgšties, kaupiasi kvercetino dariniai, proantocianidinai ir antocianinai, kurie yra svarbūs dėl jų antioksidacinių ir antidiabetinių savybių (93). Italijoje 40 % etanolinis *V. myrtillus* lapų ekstraktas parodė hipoglikeminį poveikį: gliukozės kiekis kraujo plazmoje dviem skirtingais diabeto etapais nuosekliai sumažėjo apie 26 %. Be to tyrime prieita prie išvados, jog mėlynės lapų sudėtis gali būti perspektyvi ir naudinga dislipidemijos gydymui, ypač dėl šio ekstrakto savybės mažinti lipidų kiekį kraujyje (94). Europos žolininkai diabeto gydymui dažnai skiria poliherbalinį mišinį, kurį sudaro *Rubus fruticosus* ir *V. myrtillus* lapai, *Potentilla erecta* šaknys, *Geum urbanum* antžeminės dalys ir *Phaseolus vulgaris* ankštys (95). Juodkalnijoje V. Madić su kitais mokslininkais (2021), naudojant didelio efektyvumo skysčių

chromatografiją su ultravioletine detekcija, nustatė, kad FJ esantys polihervaliniame mišinyje gali padėti sumažinti antrojo tipo diabeto riziką. Be to pažymėtina, kad mėlynių lapuose, lyginant su kitais augalais, susikaupia tokių FJ, kaip chino, galo ir kaftaro rūgštis, taip pat arbutinas, rutinas, trifolinas, astragalinas, hiperozidas, izokvercetas ir kvercitrinas, kurie yra siejami su galima nauda mažinant 2 tipo diabeto riziką. Taip pat tyrime buvo nustatyta, kad mėlynių lapų ekstrakto antioksidacinis aktyvumas buvo didesnis už etaloninį, o tai parodė jo galimą terapinį veiksmingumą (96). Rumunijoje augusius *V. myrtillus* lapus ekstrahuojant ultragarsu su 40 % etanoliu, gautas ekstraktas, kuris pasižymėjo antioksidacinėmis savybėmis. Tyrime buvo nustatytas selektyvus citotoksinis šio ekstrakto aktyvumas prieš įvairias vėžinių ląstelių linijas (žmogaus storosios žarnos adenokarcinomą, žmogaus krūties vėžį ir žmogaus gimdos kaklelio karcinomą) (97).

Europos šalyse mėlynių lapų ekstraktai tradiciškai vartojami kaip augaliniai vaistai šlapimo takams gydyti dėl jų sutraukiančių ir antiseptinių savybių. Manoma, kad šie ekstraktai pasižymi antibakteriniu, priešuždegiminiu, hipoglikeminiu ir hipolipideminiu poveikiu (94,98). Džiovintų mėlynių lapų antpilas pasižymi stipriomis sutraukiamosiomis savybėmis, skatina šlapimo skyrimąsi, stiprina organizmą, juo gydomos šlapimo takų ligos. Literatūroje nurodoma, kad lapų arbata naudinga sergantiems diabetu, ypač pradinėmis ligos stadijomis, ir priklausantiems šios ligos rizikos grupei. Lapuose esantys gliukochinonai mažina cukraus kiekį kraujyje. Tačiau verta paminėti, kad gydymo tikslais mėlynių lapų preparatų be pertraukos negalima vartoti ilgiau nei 3 savaites (89).

Įvairiuose tyrimuose nurodoma, kad FJ kiekis gali skirtis dėl įvairių aplinkos veiksnių ir ekstrahavimo metodų. Be to nustatomas bendras polifenolių junginių, taninų ir flavonoidų kiekis gali priklausyti ir nuo augalo amžiaus: pastebėta, kad polifenolių junginių, taninų ir flavonoidų didesnis kiekis nustatytas jaunuose lapuose, palyginti su senais lapais (99).

Kanadoje buvo nustatyta, kad bendro tirpių FJ, flavonoidų, antocianinų ir taninų kiekis mėlynės lapuose buvo reikšmingai ($p < 0,05$) didesnis, lyginant su mėlynės uogomis (100).

Skirtingai nei lapai, mėlynės šviežios arba šaldytos prinokusios uogos yra įtrauktos į Europos farmakopėją. Jų sudėtyje turi būti ne mažiau kaip 0,30 proc. antocianinų, išreikštų kaip cianidino 3-O-glukozido chloridas (101).

Literatūroje pateikti mėlynių uogų tyrimai rodo, kad jose gausu įvairių biologiškai aktyvių junginių. Pagrindinę uogose aptinkamų fitocheminių medžiagų grupę sudaro FJ (102). Jose randami taip pat flavonoidų glikozidai, antocianinai. Mėlynės uogose susikaupia nuo 300 iki 700 mg antocianinų 100 g šviežio svorio, skirtumus lemia tokie veiksniai kaip auginimo sąlygos ir sunokimo lygis (91). Tyrimai rodo, kad mėlynių uogose esantys antocianidai, pavyzdžiui, delfinidinas, cianidinas, peonidinas, petunidinas ir malvidinas (103), gali turėti teigiamą poveikį širdies ir kraujagyslių sistemai, pasižymi antioksidacinėmis savybėmis (91,104). Taip pat uogose susikaupia polifenolių, tokių kaip katechinas, epikatechinas ir taninai, kurie ypač svarbūs lėtinių ligų rizikos mažinimui. Kiti svarbūs junginiai, randami mėlynės uogose, yra pektinai (37), kurie žinomi dėl savo gebėjimo mažinti cholesterolio kiekį, reguliuoti cukraus kiekį kraujyje ir teigiamai veikti virškinimo sistemą, nes veikia kaip prebiotikai (105). Taip pat nustatyta, kad mėlynių uogose yra iridoidų. Šie biologiškai aktyvūs junginiai turi daug žadantį terapinį potencialą, todėl šiuo metu atliekami tolesni tyrimai, siekiant iširti jų veikimo mechanizmus ir panaudojimo galimybes prevencinėje ir terapinėje medicinoje (106). Mėlynės uogose yra 3–8 % (kartais iki 13 %) cukrų (fruktozės, gliukozės, galaktozės, sacharozės ir kt.), organinių rūgščių (88).

Mėlynių vaisiai vertinami dėl biologiškai aktyvių antrinių metabolitų gausos, o jų naudos sveikatai tyrimai pabrėžia keturių pagrindinių polifenolinių fitocheminių medžiagų grupių svarbą. Tai hidroksicinamo rūgšties esteriai, flavonoliai, proantocianidinai ir antocianinai (107). Naujausi tyrimai rodo, kad su mėlynių vartojimu susijęs įvairus palankus poveikis sveikatai, apimantis priešuždegimines (108), antioksidacines (109), kardioapsaugines (110) ir hipoglikemizuojančias savybes (111). Iš ketvirtos lentelės matyti, jog šviežios mėlynės (*Myrtilli fructus recens*), naudojamos sausiems ekstraktams gaminti pagal Europos farmakopėjos standartus, daugiausia vertinamos dėl kaupiamų antocianinų kiekio ir galimo poveikio kraujagyslių sveikatai, taip pat uogos veikia kaip silpni vidurių laisvinamieji. O džiovintos mėlynės uogos (*Myrtilli fructus siccus*) pirmiausia naudojamos dėl jose esančio taninų kiekio, dažniausiai sprendžiant viduriavimo problemą ir kaip burnos skalavimo priemonė esant nedideliam burnos gleivinės uždegimui, nes džiovintų uogų nuoviras turi antibakterinių savybių ir yra tinkamas vartoti tiek paaugliams, tiek ir suaugusiems (4 lentelė) (103).

4 lentelė. Mėlynės (*Vaccinium myrtillus* L.) augalinių žaliavų terapinių indikacijų lentelė (89)

Augalinė žaliava	Terapinė indikacija	Augalinė žaliava ir (arba) preparatas nurodytas monografijoje	Vartojimo populiacija
<i>Myrtilli fructus recens</i> Švieži mėlynių vaisiai	Vartojamas odos kapiliarų trapumo simptomų mažinimui	Augalinis preparatas: sausasis ekstraktas (DER 153-76:1; ekstrakcijos tirpiklis: metanolis 70% (VV), turintis 36 % antocianozidų, atitinkančių 25 % antocianidinų	Suaugusiesiems
	Vartojamas diskomforto ir sunkumo kojose, atsirandančio dėl lengvo kraujotakos sutrikimo venose, mažinimui	Augalinis preparatas: sausasis ekstraktas (DER 153-76:1; ekstrakcijos tirpiklis: metanolis 70% (VN), turintis 36% antocianozidų, atitinkančių 25 % antocianidinų	Suaugusiesiems
<i>Myrtilli fructus siccus</i> Džiovinti mėlynių vaisiai	Simptominiam lengvo viduriavimo gydymui	Augalinė žaliava: subrendę, džiovinti vaisiai Augalinis preparatas: susmulkinta augalinė žaliava	Paaugliams Suaugusiesiems
	Lengvo burnos gleivinės uždegimo simptominiam gydymui	Augalinė žaliava: subrendę, džiovinti vaisiai Augalinis preparatas: susmulkinta augalinė žaliava	Paaugliams Suaugusiesiems

Šviežiose uogose yra kraujagysles plečiančių medžiagų, taip pat atliekami tyrimai, kaip mėlynių uogomis būtų galima gydyti išsiplėtusias kojų venas (103) ir padidėjusį kapiliarų laidumą (112). Iš uogų gaminami įvairūs maisto papildai regėjimui stiprinti. Uogų luobelėje yra daug antocianinų, kurie stiprina akis, jais gydomas vištakumas. Kartais uogas, kaip priešnuodį, vartoja žmonės, dirbantys kenksmingomis sąlygomis, pavyzdžiui, akmens anglių kasyklose (88).

1.9. Bruknė (*Vaccinium vitis-idaea* L.)

Bruknė (*Vaccinium vitis-idaea* L.) (6 pav.) – žemas, 5 – 15 cm aukščio krūmokšnis su požeminiais, šliaužiančias žvynuotais, išsisknijusiais ūgliais, augantis šiaurės pusrutulyje (83,113). Nauji ūgliai kyla iš šliaužiančiųjų ūglių pažastinių pumpurų. Jaunos šakelės plaukuotos, senosios nuplikusios. Lapai dažniausiai atvirksčiai kiaušiniški, viršūnėje įlenktai apskriti, visžaliai, odiški, lygiakraščiai arba šiek tiek karbuoti, raitytu pakraščiu, viršutinė pusė tamsiai žalia, blizganti, apatinė – blyškiai žalia, matiniai, neryškiai gysloti, trumpakočiai (83). Lapai žiemojantys. Apatinė lapo pusė taškuota (86). Bruknės žiedai truputi kvapnūs, tankiose kabančiose kekėse, balti, rausvo atspalvio. Taurelė keturskliautė, rečiau penkiaskliautė, plėniška, jos skiautės trikampiškos, blakstienotos. Vainikėlis atviras ir persisvėręs, varpiškas, išorėn lenktomis skiautėmis. Bruknės krūmokšnis žydi gegužės – birželio mėnesiais, kartais pakartotinai ir liepos mėnesį. Uogos iš pradžių baltos, vėliau ryškiai raudonos, blizgančios, apvalios, nelabai sultingos, daugiasėklės, viršuje yra taurelės liekana (83). Bruknės uogos sunoksta rugpjūčio mėnesį ir laikosi iki rudens (88). Sėklos raudonai rudos, kiek pusmėnuliškos; luobelė duobėtai tinkliška (83). Auga sausuose pušynuose, bet pasitaiko ir pušynuose su eglės pomiškiu, mišriuose spygliuočių miškuose, ypač su beržais, taip pat aukštapelkių ir tarpinio tipo pelkių sausesniuose pakraščiuose. Bruknės, palyginus su mėlynėmis, yra atsparesnės sausrai ir šalčiui. Tai dažnas augalas rūgščių smėlynų ir rūgščiųjų puvenų miškuose bei tarpinio tipo pelkėse (83). Bruknės paplitusios visoje Lietuvoje, bet nevienodai gausios. Didelius sąžalynus (7 pav.) jos sudaro ir gausiai dera pietiniuose bei rytiniuose šalies rajonuose, kitur bruknių gerokai mažiau ir uogų derlius būna menkas (88). Bendrai bruknė paplitusi šiauriniuose vidutinio klimato Europos ir Azijos regionuose, Azijoje ir Šiaurės Amerikoje (83,114).



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



7 pav. Bruknių sąžalynas

1.9.1. Bruknės lapų ir vaisių cheminė sudėtis ir panaudojimas

Vaistinei augalinei žaliavai gali būti naudojami ir bruknės lapai (*Folia Vaccinii vitis-idaea*) (12), ir bruknės vaisiai (13). Istoriskai Azijos ir Europos kultūrose *V. vitis-idaea* lapai ir vaisiai buvo tradicinis vaistas įvairioms sveikatos problemoms gydyti, dėl savo sudėties, jie buvo vertinami kaip natūrali priemonė šlapimo takų infekcijoms, virškinamojo trakto diskomfortui, neurodegeneracinės būklės ir kitų uždegiminių sutrikimų gydymui, dažniausiai susijusiu su oksidacinio streso ar tam tikrų patogenų buvimu organizme (115). Literatūroje nurodoma, kad kai kurių šalių liaudies medicinoje bruknių augaline žaliava gydoma gonorėja, šlapimo takų uždegimas, slopinamas viduriavimas (116).

Brukneje yra gausu FJ, įskaitant flavonolius, antocianidinus, katechinus ir jų glikozidus bei įvairius kavolio ir ferulo rūgšties konjugatus (117). S. Ek ir kiti tyrėjai (2006) Suomijoje augusių bruknių uogose ir lapuose nustatė 28 FJ. Šeši junginiai buvo būdingi tik uogoms, o likusieji rasti tiek uogų, tiek lapų mėginiuose. Aštuoni junginiai buvo naujai nustatyti bruknėse, įskaitant du visiškai naujai identifikuotus junginius. Tai rodo, kad bruknių FJ profilis yra įvairus ir gali turėti įtakos jų maistinei ir medicininei vertei, todėl svarbu tirti jų fitocheminę sudėtį ir naudą sveikatai (117).

Lietratūroje rašoma, jog taninų kiekiai bruknės lapuose ir vaisiuose pasiskirstę nevienodai (118), tačiau yra nustatyta, kad, naudojant 60 % acetoną, iš antžeminės *V. vitis-idaea* dalies išskirti taninai pasižymėjo įvairiomis antioksidacinėmis savybėmis ir gali būti naudojami periodonto ligų gydymui. Taninai, įskaitant procianidinus ir proantocianidinus, pasižymi įvairiu biologiniu aktyvumu, pavyzdžiui, priešvėžinėmis ir antivirusinėmis savybėmis bei lipidų peroksidacijos slopinimu. Rezultatai parodė, kad taninai turi radikalų susidarymą slopinantį poveikį, kuris gali būti naudingas esant išemijai ir edemai (116).

Verta paminėti, jog išsiskiriančių FJ kiekis ekstrakcijos metu gali skirtis priklausomai nuo ekstrakcijai naudoto metodo bei tirpiklio, nuo augalinės medžiagos rinkimo laiko. Pavyzdžiui, tiriant iš įvairių Lietuvos augaviečių surinktų bruknės uogų ir lapų žaliavą, joje nustatytų fenolinių ir triterpeninių junginių vidutinis kiekis buvo maždaug 1,5 karto didesnis mėginiuose, surinktuose rudens – pirmosios pavasario pusės metu, lyginant su antros pavasario pusės – vasaros metu surinkta augaline bruknės žaliava (119).

Analizuojant mokslinius šaltinius, galima pastebėti, kad bruknių lapų cheminė sudėtis pasižymi arbutino gausa. Rumunijoje tirtuose bruknės lapuose, ekstrahuojant ultragarsu su 55 % etanoliu, arbutinas sudarė 31–50 % bendro FJ kiekio (120). Lietuvoje atliktas tyrimas su šiaurinėje šalies dalyje augusiomis bruknėmis taip pat patvirtino hipotezę, jog arbutinas buvo gausiausias lapų FJ ir sudarė 41–78 % visų FJ (121). Šis junginys pasižymėjo antioksidaciniu aktyvumu, kuris *in vitro* tyrimuose prilygo net hidrochinono aktyvumui (122). Be to lapuose buvo aptikta nemažai kitų FJ, tokių kaip flavonolių ir monomerinių flavanolių. Aptiktos ir hidroksicinaminės rūgštys, bet jos sudarė tik nedidelę dalį (1–4 %) viso FJ kiekio. Šiame tyrime buvo pastebėta, jog FJ sudėtis bruknių lapuose skyrėsi tarp skirtingų bruknės veislių (121).

G. Vilkickytės ir L. Raudonės (2021) Lietuvoje augusių bruknių lapuose, juos ekstrahuojant ultragarsu su 80 % acetonu, nustatyti 43 junginiai, apimantys tokias antrinių metabolitų klases, kaip fenolinius ir triterpeninius junginius (30 fenolinių ir 13 triterpeninių junginių). Pagrindinę šių junginių dalį sudarė arbutinas (42–60 % visų nustatytų FJ). Pažymėtina, kad didžiausias arbutino kiekis nustatytas vasaros pabaigoje ir rudenį. Katechinai (įskaitant (+)-katechiną ir (-)-epikatechiną) ir proantocianidiniai sudarė atitinkamai iki 15 % ir 24 % visų nustatytų FJ (119). Kito tyrimo metu, atlikus Suomijoje augusių bruknių lapų ekstraktų, gautų ultragarsu ir naudojant 70 %

acetoną, analizę, juose nustatyta 10 FJ, įskaitant chlorogeninę rūgštį, arbutiną, rutiną, hiperozidą ir kitus (123). Įdomu tai, kad per visą vegetacijos sezoną bruknių lapuose nebuvo pastebėta didelių bendrojo FJ ir atskirų junginių kiekio svyravimų, o gausiausias iš FJ buvo arbutinas.

Rumunijoje ultraefektyviosios skysčių chromatografijos ir masės spektrometrijos būdu bruknės lapuose identifikuoti tokie junginiai, kaip (+)-katechinas, flavonoliai, kvercetino glikozidai, fenolinės rūgštys ir antocianidiniai (120). Moksliniuose tyrimuose pabrėžiamas šių FJ potencialas chemoterapijos ir chemoprolifaktikos srityse. Pagrindinis šių junginių privalumas – gebėjimas selektyviai stabdyti vėžinių ląstelių augimą ir kartu apsaugoti sveikas ląsteles nuo citotoksinio poveikio. FJ pasižymi mažu toksiškumu ir įvairiapusiu slopinamuoju poveikiu, kuris chemoprolifaktikos ir chemoterapijos metoduose atlieka lemiamą vaidmenį (124).

P. Vyas su bendraautoriais (2013) nustatė, jog bendras tirpių FJ – flavonoidų, antocianinų ir taninų – kiekis bruknių lapuose buvo reikšmingai didesnis nei vaisiuose. Šį pastebėjimą patvirtino ir stipri koreliacija su bendru radikalų šalinimo pajėgumu ir redukuojamąja galia, kai lapai pasižymėjo gerokai didesniu aktyvumu, palyginti su vaisiais. Ekstrahuojant bruknės lapus 80 % acetonu taninai sudarė 63 % bendro FJ kiekio (100).

Broknių lapai susilaukė didelio dėmesio įvairiuose tyrimuose dėl savo antioksidacinių savybių, teigiamo poveikio sveikatai ir galimo pritaikymo lėtinių ligų prevencijai ir gydymui. Kinijoje nuo senų laikų liaudies medicinoje bruknės stiebai ir lapai vartojami kaip priešūždegiminės priemonės kvėpavimo sistemos infekcijoms gydyti (125). Kinijoje tirtuose etanoliniuose bruknės lapų ir stiebų ekstraktuose dominavo arbutinas ir fraksinas, turintys didelį gydomąjį potencialą: nustatyta, kad tiek arbutino, tiek fraksino priešūždegiminis poveikis buvo reikšmingas ($p < 0,001$), lyginant su kontrole. Taip pat minėti junginiai pasižymėjo reikšmingu kosulį slopinančiu poveikiu, gebėjimu sumažinti acto rūgšties sukeltą kraujagyslių pralaidumą, amoniako sukeltą kosulio dažnį, o tai rodo reikšmingas priešūždegimines, kosulį mažinančias ir skreplius šalinančias savybes (125). Taip pat tyrime buvo pabrėžta, kad arbutinas pasižymi stipriu superoksido ir hidroksilo radikalų šalinimo gebėjimu, o fraksinas, kaip kumarino darinys, turėtų pasižymėti priešūždegiminėmis savybėmis (125). Jungtinėje karalystėje taip pat nustatyta, kad bruknių lapų ir stiebų etanoliniai ekstraktai pasižymi ir priešūždegiminėmis savybėmis, ir gebėjimu palengvinti ar slopinti kosulį (98).

Broknių lapai pasižymi panašiomis savybėmis kaip ir mėlynių lapai, veikia kaip diuretikas, šlapimo takus veikia antiseptiškai. Tačiau, nors P. Vyas ir kt. (2013) atliktas tyrimas parodė, kad broknių ir mėlynių lapų redukcinė galia yra panaši, broknių lapai pasižymėjo reikšmingai didesne radikalų šalinimo geba, palyginti su mėlynių lapais. Tai reiškia, kad broknių lapai gali pasižymėti geresnėmis antioksidacinėmis savybėmis nei mėlynių lapai, todėl jie gali būti veiksmingesni kovojant su oksidaciniu stresu ir apsaugant ląsteles nuo laisvųjų radikalų daromos žalos (100).

Broknių uogose gausu svarbiausių mikroelementų, vitaminų, polifenolių (126). Taip pat bruknės uogose nustatyta antocianinų, hidroksicinaminių rūgščių, hidroksibenzoinių rūgščių ir flavonolių (120).

Taikant ekstrakciją mikrobangų krosnelėje bei neskiestą metanolį, Rumunijoje augusių broknių uogose proantocianidinais buvo pagrindiniai FJ, sudarę 63–71 % viso FJ kiekio. Proantocianidinais yra polimeriniai FJ, daugiausia sudaryti iš katechino, epikatechino, galokatechino ir epigalokatechino vienetų. Jie pasižymi antioksidacinėmis savybėmis ir dažnai vadinami kondensuotais taninais (120). Dėl savo poveikio lėtinant angliavandenių, baltymų ir lipidų virškinimą ir įsisavinimą virškinamajame trakte, proantocianidinais gali būti naudingi, nes, sulėtindami angliavandenių absorbciją, geba reguliuoti cukraus kiekį kraujyje. Tai gali būti naudinga asmenims, sergantiems diabetu arba turintiems riziką juo susirgti. Be to, sulėtėjęs lipidų įsisavinimas gali padėti reguliuoti cholesterolio kiekį ir sumažinti širdies ir kraujagyslių ligų riziką. Sąveikaudami su žarnyno mikroflora, proantocianidinais veikia kaip prebiotikai ir gali sustiprinti įvairių probiotikų, tokių kaip *Bifidobacterium spp.* ir *Lactobacillus spp.*, poveikį (127).

Nesubrendusiuose jaunuose bruknės vaisiuose yra mažas cukrų ir didelis organinių rūgščių kiekis, o uogoms bręstant cukraus kiekis didėja, organinių rūgščių – mažėja. M. Amundsen (2023), naudojant ultragarsinės ekstrakcijos metodą bei 70 % etanolį, skysčių chromatografijos būdu nustatė, jog per visą broknių vaisių brandimo procesą antocianinų kiekis padidėjo nuo beveik nežymaus iki 100 mg/100 g šviežios masės, cukraus kiekis – nuo 2,7 iki 7,2 g/100 g šviežios masės, o organinių rūgščių kiekis sumažėjo nuo 4,9 iki 2,7 g/100 g šviežios masės (128). Broknių uogose iš cukrų, daugiausiai nustatoma monosacharidų fruktozės ir gliukozės, bei tik bruknėms būdingos maltozės (88).

Įvairiuose bruknių uogų mėginiuose skirtingais jų augimo etapais buvo nustatyti 56 biologiškai aktyvūs junginiai, priskiriami fenoliams ir triterpenoidams. Didžiausias šių junginių kiekis buvo nustatytas ankstyvuojų uogų vystymosi etapu (iš kurių 74,3 % sudarė FJ). Uogoms bręstant junginių kiekis buvo mažesnis, tačiau augimo laikotarpio pabaigoje jis šiek tiek padidėjo.. Buvo pastebėti dideli FJ kiekio svyravimai, iš kurių antocianinai buvo labiausiai kintantys (variacijos koeficientas siekė net 82,5 %). Ankstyvojo uogų vystymosi etapo metu buvo nustatytas didžiausias arbutino kiekis – 1518,7 µg/g ir šis kiekis statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo arbutino kiekio kitais fenologiniais etapais. Triterpenoidai bruknės uogose sudarė 25,7–48,3 % visų identifikuotų junginių (129). Šie junginiai pasižymi įvairiomis savybėmis, pavyzdžiui, priešušdegiminiu, priešvėžiniu, antimikrobiniu, hepatoprotekcinium, antikancerogeniniu, antivirusiniu, imunomoduliaciniu, cholesterolio kiekį kraujyje mažinančiu, antiaterosklerotiniu, antikoaguliaciniu poveikiu (25,26).

Lyginant Suomijoje ir Lenkijoje augusias bruknių uogas, kiekybinio tyrimo metu nustatytas bendras triterpenoidų kiekis buvo panašus (skyrėsi tik 5 %), o dvi izomerinės rūgštys – oleanolio ir ursolio – buvo gausiausi junginiai, sudarantys 73 % ir 70 % visų triterpenoidų atitinkamai Suomijoje ir Lenkijoje augusių bruknių uogose. Šios rūgštys pasižymi priešušdegiminiu, priešvėžiniu ir antimikrobiniu poveikiu bei įvairiomis kitomis farmakologinėmis savybėmis (131). Skirtingam nustatytų antrinių metabolitų, įskaitant triterpenoidus, kiekiui įtakos gali turėti aplinkos veiksnių, tokių kaip šviesa, temperatūra ir drėgmė, pokyčiai, tai paaiškina, kodėl skirtingais metais bruknių lapai skyrėsi savo sudėtimi. Be to, skirtinga vegetacijos sezono trukmė leidžia manyti, kad šiuose regionuose surinktų bruknių jaunų lapų augimo tempas ir antrinių metabolitų biosintezė gali skirtis.

A. Szakiel ir kt. (2007), Lenkijoje augusias bruknių uogas ekstrahuodami su etileteriu bei metanoliu Soksleto metodu, jose oleanolio ir ursolio rūgščių (atitinkamai 2,96±0,21 mg/g ir 7,09±0,44 mg/g) nustatė daugiau, nei bruknės lapuose, stiebuose ir šakniastiebiuose (132). Tai rodo, kad bruknių vaisiai yra gausiausias ursolio ir oleanolio rūgšties šaltinis, lyginant su kitomis bruknės augalo dalimis. Pastaruoju metu atliekami intensyvūs moksliniai tyrimai, kuriuose nagrinėjamas ursolio rūgšties biologinis prieinamumas, farmakokinetika ir jos vaidmuo kovojant su uždegimu, medžiagų apykaitos ligomis, širdies ir kraujagyslių ligomis, vėžiu ir neurologiniais sutrikimais (133). Oleanolio rūgšties nauda taip pat plačiai aprašoma literatūroje: pavyzdžiui,

oleanolio rūgštis gali būti naudinga gydant dislipidemiją, diabetą ir metabolinį sindromą, nes gerina jautrumą insulinui, palaiko β -laktelių funkcionalumą ir išgyvenamumą bei apsaugo nuo su diabetu susijusių komplikacijų. Be to, manoma, kad oleanolio rūgštis gali atlikti ir daug kitų funkcijų, įskaitant antivirusines, antibakterines, priešgrybelines, priešūždegimines, hepatoprotekcines, gastroprotekcines, hipolipidemines ir antiaterosklerotines savybes, taip pat gali stabdyti įvairių stadijų vėžio vystymąsi (134). D. Harbilas su bendraautoriais (2009) nustatė, kad Kanados kalnuose augusių bruknių uogų 80 % etanolinis ekstraktas, kuriame bendras FJ kiekis buvo $59,9 \pm 4,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, pasižymėjo antidiabetiniu potencialu įvairiuose *in vitro* tyrimuose (135).

Bruknių vaisiuose nustatyti p-kumaro rūgšties dariniai, katechinai, cianidinas ir kvercetino glikozidai. Tai parodė, kad šie junginiai yra ypač svarbūs ir būdingi bruknių vaisių fenolinio profilio komponentai, ir yra žinomi dėl savo galimos naudos sveikatai ir biologinio aktyvumo (135).

Tiriant Lenkijoje augusių bruknių vaisių 80 % metanolinius ir 80 % etanolinius (ekstraktus, buvo nustatytas jų antimikrobinis aktyvumas prieš *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium* sp., *Aspergillus niger*. Verta paminėti, kad etanolinis ir metanolinis bruknių ekstraktas visiškai sustabdė grybo *A. niger* augimą ir vystymąsi (136). Taip pat, bruknių uogos tiriamos dėl jų galimos naudos gydant neurodegeneracines ligas ir su jomis susijusius uždegiminius procesus. Šie susirgimai dažnai susiję su laisvųjų radikalų žala ir patogeninių padermių buvimu žmogaus organizme (115).

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

Miltinė meškauogė (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.) (pav. 8) – žemaūgis, prie žemės prigludęs, kiliminis krūmokšnis su toli besidriekiančiomis rudomis šaknimis (83). Šis daugiametis 5 – 20 cm aukščio, visada žaliuojantis krūmokšnis, sudaro plačius, tankius sąžalynus (137,138). Miltinė meškauogė išaugina ilgus, gulsčius, daugelyje vietų įsišaknijančius ūglius su stačiomis ar gulsčiomis šakelėmis. Dėl to vienas augalas gali visiškai uždengti 1–2 m² ar net didesnę plotą (89,139). Lapai kiaušiniški, lygiais kraštais, šiek tiek atlenkti žemyn, prie pagrindo susiaurėja į trumpą lapkočio kotelį. Lapo viršūnė yra bukos formos arba užriesta. Lakštelis storas ir korėtas. Viršutinis lapo odinis paviršius blizgus ir tamsiai žalias, o apatinis odinis paviršius šviesesnis, paprastai yra 7–30 mm ilgio ir 5–12 mm pločio. Adaksiniame lapo paviršiuje yra įdubusių gyslų, kurios suteikia jam būdingą grūdėtą išvaizdą. Tik jaunų lapų kraštai yra dantyti. Seni lapai yra pliki

(101). Džiovinti *A. uva-ursi* lapai yra įtraukti į Europos farmakopėją (140). Miltinės meškauogės žiedai po kelis trumpose, svyrančiose kekėse; žiedynkotis apaugęs trumpais garbanotais ir pavieniais liaukiniais plaukeliais. Vainikėlis kiaušiniškas ar ašotiškas, balzganas arba rausvas, kartais baltas, 0,5 cm ilgio, su 5 trumpomis, apvaliomis, į lauko pusę išsilenkusiomis rausvomis skiautėmis, plaukuota vidine puse (83). Iš pirmo žvilgsnio miltinės meškauogės gali pasirodyti panašios į bruknes, tik jų lapai smulkesni, o pats augalas yra priglundęs prie žemės (89,139).



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

Žydi gegužės – birželio mėnesiais. Vaisius – rutuliška, miltinga, skaisčiai raudona uoga; jos pamatas apgaubtas taurele (83). Uogos sunoksta rugpjūčio – rugsėjo mėnesiais (88). Auga šviesiuose, sausuose pušynuose. Kuršių nerijoje kartais auga kadagynuose, panašiai kaip ir kalnuose. Šiaurėje auga augavietėse drauge su kitais erikinių šeimos atstovais. Miltinės meškauogės auga smėlynuose, sutvirtina smėlio paviršių. Miltinė meškauogė dažnai sutinkama Lietuvos Pietryčių lygumoje, kitur apyretė. Bendrai paplitęs augalas beveik visoje Europoje, išskyrus jos pietvakarius, pietus ir pietryčius. Nerastas Šiaurės Prancūzijoje, Belgijoje ir Olandijoje. Paplitęs Urale, šiaurės Sibire ir Kaukaze, Altajaus kalnuose, Himalajuose, Šiaurės Amerikoje (83).

1.10.1. Miltinės meškauogės cheminė sudėtis ir panaudojimas

Literatūroje miltinės meškauogės lapai aprašomi kaip gausus įvairiausių cheminių FJ – flavonoidų, fenilpropanoidų, galoilglikozidų ir katechinų (141), taninų (142), iridoidų (143), saponinų (144), eterinio aliejaus (145), polisacharidų bei makro- ir mikroelementų – šaltinis (146). Nesmulkinti arba susmulkinti džiovinti *A. uva-ursi* lapai yra įtraukti į Europos farmakopėją. Europos farmakopėjoje *A. uva-ursi* vaistinės augalinės žaliavos kokybė yra reglamentuota pagal arbutino kiekį (140). Lapų sudėtyje turi būti ne mažiau kaip 7,0 % bevandenio arbutino (101). Lietuvoje augančios miltinės meškauogės lapuose daugiausia arbutino (iki 16 %) būna anksti pavasari ir vegetacijos laikotarpio pabaigoje (83). Arbutinas yra pagrindinis antioksidantas ir antibakterinis komponentas, esantis miltinių meškauogių lapuose (142). Šis fenolinis glikozidas pasižymi reikšmingu antioksidaciniu aktyvumu ir antimikrobinėmis (147), priešuždegiminėmis (148), hipoglikeminėmis bei hipolipideminėmis savybėmis (149). Be to jo veikimas pasireiškia melanino biosintezės slopinimu žmogaus odoje, todėl plačiai naudojamas odą šviesinančiose priemonėse (142).

X. Song su bendraautoriais (2021) Ispanijoje augusių *A. uva ursi* lapuose, ekstrahuojant ultragarsu su 70 % etanoliu, identifikavo 88 junginius, įskaitant 14 arbutino darinių, 33 taninus, 6 flavanolius, 26 flavonolius, 9 sacharidų darinius ir glikozidinius junginius. Dominuojantys junginiai buvo galotaninai (daugiausiai arbutinas) ir kvercetino glikozidai (142). Pietų Afrikoje buvo apžvelgiami vaistinių augalų kaupiami glikozidai ir flavonoidai ir nustatyta, jog šioms grupėms priklausantys junginiai be antioksidacinių savybių gali turėti ir hipoglikeminį poveikį (150). Taip pat *A. uva ursi* lapuose nustatytas didelis kiekis chinino rūgšties ir elaginės rūgšties (142). Chinino rūgštis buvo tiriama dėl galimų priešvėžinių savybių. Tyrimai rodo, kad ji gali turėti antiproliferacinį poveikį vėžinėms ląstelėms ir gali būti naudojama vėžio gydymui arba kaip chemoprolifaktinė priemonė (151). Elagitaninams priklausanti elaginė rūgštis taip pat žinoma dėl antioksidacinių, priešuždegiminių, antimutageninių ir antiproliferacinių savybių. Farmakologinis jos poveikis įvertintas įvairiuose *in vitro* ir *in vivo* tyrimų modeliuose. Be to, elaginė rūgštis yra plačiai žinoma dėl savo antialerginių (152), antivėžinių (153), nefroprotekcinų (154), antiaterosklerozinių, kardioprotekcinų, ir neuroprotekcinų savybių (155).

G. Kravchenko ir kt. (2022), naudodami aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos metodą, miltinės meškauogės lapų 50 % etanolio ekstraktuose identifikavo šiuos junginius: fenolinį

glikozidą (arbutiną), fenolinę karboksirūgštį (galo rūgštį), penkis flavonoidus ir keturias hidroksicinamines rūgštis (144). Tarp flavonoidų vyravo hiperozidas ir katechinas, o iš hidroksicinamo rūgščių – kavos ir chlorogeno rūgštys. Šios dvi rūgštys – chlorogeno ir kofeino – yra naudingos sveikatai dėl savo antioksidacinių, priešuždegiminių, kraujagysles plečiančių ir kardioprotekcinų savybių (156). Taip pat G. Kravchenko ir kiti tyrėjai nustatė ryškų antioksidacinį arbutino aktyvumą lipidų peroksidacijos slopinimui (144).

Serbijoje atliktos *A. uva-ursi* lapuose susikaupiančių lakiųjų junginių dujų chromatografijos ir dujų chromatografijos-masių spektrometrijos analizės metu buvo identifikuoti 243 lakūs junginiai, įskaitant terpenoidų grupei priklausančius α -terpineolį, linalolį ir riebalų rūgščių junginius (145). Pastarųjų terpenoidų potencialas kontroliuoti *Candida* sukeltas infekcijas mokslininkų yra aktyviai tyrinėjamas (157).

Ekstrahuojant 50 % acetonu miltinės meškauogės lapus, surinktus Ispanijoje, juose nustatytas bendras FJ kiekis sudarė $102,11 \pm 7,12$ mg GRE/g, o šio ekstrakto antioksidacinis potencialas buvo lygus $90,42 \pm 1,83$ mmol TE/g (158). Remiantis pateiktais duomenimis galima daryti išvadą, kad *A. uva-ursi* lapai turi antioksidacinių savybių. Ekstrahuojant ultragarsu su 70 % etanoliu, miltinės meškauogės lapuose, surinktuose viržynuose, FJ kiekis varijavo nuo 238,85 mg GRE/g iki 318,28 mg GRE/g (dekolorizacijos testu atliktas antioksidacinis aktyvumas varijavo nuo 530,63 mg TE/g iki 713,49 mg TE/g), o lapuose, surinktuose pušyne, FJ vertės varijavo nuo 257,51 mg GRE/g iki 306,57 mg GRE/g (antioksidacinis ekstraktų aktyvumas varijavo nuo 543,71 mg TE/g iki 652,70 mg TE/g) (159). A. Shamilov ir kt. (2022) priėjo prie išvados, jog miltinės meškauogės lapų antioksidacinės savybės tikriausiai yra susijusios su FJ gausa juose (146). Kroatijoje I. Generalić Mekinić su kitais (2019), miltinės meškauogės lapus ekstrahuojant etanolio/vandens mišiniu (santykiu 80/20), juose nustatė $607,5 \pm 2,1$ mg GRE/g FJ, kuriuose flavonoidai sudarė 16 %. Geležies redukuojančios antioksidacinės galios testas parodė, kad miltinės meškauogės lapų etanoliniai ekstraktai pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis. Be to, nustatytas tiriamos žaliavos antibakterinis aktyvumas prieš bakterijas *Escherichia coli*, *Salmonella Infantis*, *Campylobacter coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ir *Listeria monocytogenes* (160).

H. Matsuda ir bendraautoriai (1996) Ispanijoje augusiuose miltinės meškauogės lapuose, juos ekstrahuojant 50 % etanoliu ir naudojant didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodą, nustatė 13 % taninų ir 5,96 % arbutino. Taip pat mokslininkai nustatė, kad ekstraktas pasižymėjo

prieš tirozinaziniu aktyvumu. Tai reiškia, kad miltinės meškauogės ekstrakto sudedamosios dalys gali slopinti fermento tirozinazės, kuris dalyvauja melanino sintezėje, veiklą. Kaip ir minėta anksčiau, dėl šios priežasties ekstraktas gali būti naudojamas odos priežiūros produktuose, skirtuose hiperpigmentacijai ar netolygiam odos atspalviui mažinti (161). G. Kravchenko ir kt. (2022), tyrimo metu naudodami didelio efektyvumo skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos metodus, miltinės meškauogės lapų ekstraktuose nustatė hidrolizuotiems ir kondensuotiems taninams priklausančių junginių, tokių kaip digalailgliukozė, trigalailgliukozė, tetragalailgliukozė (8,2 %) ir pentagalailgliukozė (4,7 %) (144).

Literatūroje nepavyko rasti duomenų apie FJ ir taninus, kaupiamus miltinės meškauogės uogose.

Platų miltinės meškauogės vartojimą medicinoje lemia jų lapuose susikaupiantis didelis biologiškai aktyvių FJ kiekis. Šimtmečius miltinės meškauogės lapai buvo plačiai naudojami dėl savo diuretinių savybių, skatinančių šlapimo išsiskyrimą (147). Be to lapai liaudies medicinoje nuo seno naudojami ir kaip antimikrobinis bei priešuždegiminis vaistas įvairioms urogenitalinės sistemos ligoms gydyti (83,162).

1.11. Šilinis viržis (*Calluna vulgaris* L.)

Šilinis viržis (*Calluna vulgaris* L.) (9 pav.) – 0,2 – 0,7 m aukščio visžalis krūmokšnis su priglundusiais išsakinjančiais ūgliais ir kylančiomis šakelėmis. Stiebai ploni, pilkšvai rudi, labai išsišakoję (10 pav.); šakelių viršūnės stačios, tankios; nauji ūgliai kyla iš praeitų metų ūglių. Lapai linijiški, žvyniški, pailgi, ketureiliai, čerpiškai išsidėstę, bekočiai, apie 2 mm ilgio ir 0,6 mm pločio (83,86). Žiedynas kekiškas, vienašalis, tankus ir gausiažiedis. Žiedai trumpakočiai, nusvirę, rausvai violetiniai, retai balti, pamate su 4 mažais, pailgais, apskritais, odišku pakraščiu, karbuotais viršūniniais lapeliais. Vaisius – daugiasėklė dėžutė, apvali, keturlizdė, su standžiais plaukeliais. Sėklos labai smulkios, šviesiai rudos, pailgai kiaušiniškos (83). Žydi liepos – rugsėjo mėnesiais. Auga aukštapelkėse, pušynuose, durpynuose, ypač sausintuose ar degusiuose, smėlynuose, kopose, tai yra nekarbonatinguose dirvožemiuose. Gali sudaryti didžiulius sąžalynus ar vientisą kilimą. Lietuvoje dažnas, paplitęs visoje Lietuvos teritorijoje, daugiau sutinkamas kirtimų plotuose, miško gaisravietėse, nualintose pašalių žemėse, pamiškių pievose (83,86,163). Šilinis viržis yra vienintelė *Calluna* genties rūšis (163). Bendrai šilinis viržis paplitęs Europoje, Azijoje, Šiaurės Amerikos, Australijos ir Naujosios Zelandijos regionuose (164,165).



9 pav. Šilinis viržis (*Calluna vulgaris* (L.) Hull)

1.11.1. Šilinio viržio cheminė sudėtis ir panaudojimas

Vaistinei augalinei žaliavai naudojama šilinio viržio žydėjimo metu surinkta ir išdžiovinta antžeminė dalis, kartu su lapais ir žiedais (166). Šiliniai viržiai nuo seno naudojami liaudies medicinoje šlapimo takų uždegimams gydyti, sergant akių ligomis (167–169). Jie pasižymi antibakterinėmis, antiseptinėmis, sutraukiančiomis, tulžį varančiomis, diuretinėmis, atsikosėjimą lengvinančiomis, švelniai raminančiomis, kraujagysles sutraukiančiomis ir antireumatinėmis savybėmis (170–172). Literatūroje nurodoma, jog iš šviežių šilinio viržio šakelių pagamintą homeopatinį preparatą rekomenduojama vartoti reumatui, artritui ir nemigai gydyti (165).

Šiliniuose viržiuose yra įvairių FJ, įskaitant monomerinius fenolius, tokius kaip hidrochinonas ir arbutinas (iki 1,5 %), fenolkarboksi rūgštis, hidroksicinamono ir hidroksibenzenkarboksi rūgštis, taip pat yra kaupiami kumarinai ir tokoferolis, kitaip vadinamas vitaminu E. Kaupiamų flavonoidų kiekis šiliniuose viržiuose skiriasi priklausomai nuo įvairių aplinkos veiksnių ir augaluose apima įvairius poklasių, įskaitant flavonolius, dihidroflavonolius, flavonus, izoflavonus, flavononus, chromonus, katechinas, taninus, proantocianidinus ir antocianinus (168).

Latvijoje žydėjimo metu surinktame *C. vulgaris* lapų ir žiedų mišinyje, ekstrakcijai naudojant acetoną ir etanolį, Folin-Ciocalteu kolorimetriniu metodu nustatytas bendras FJ kiekis buvo lygus atitinkamai 285,61±5,41 mg GRE/g ir 294,88±14,20 mg GRE/g, o flavonoidų, ekstrahuojant 50 % acetonu ir 50 % etanoliumi, atitinkamai 55,08±2,23 mg KVE/g ir 51,13±0,29 mg KVE/g (kas sudarė atitinkamai 19 % ir 17 % bendro FJ kiekio); vidutinis taninų kiekis šilinio viržio žaliavoje buvo lygus 2,45±0,17 %, o etanolinio ekstrakto radikalų šalinimo aktyvumas buvo didesnis nei acetoninio ekstrakto (atitinkamai 127,06±1,07 µg/mL ir 104,71±1,07 µg/mL) (169). Šilinio viržio žaliavos ekstraktuose didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodu buvo identifikuotos galio ir chlorogeno rūgštys (169). Šios augalinės kilmės rūgštys demonstravo didelį veiksmingumą kovojant su diabetu ir su juo susijusiomis komplikacijomis tiek *in vitro*, tiek *in vivo* tyrimuose (170). Be to manoma, kad chlorogeninė rūgštis dėl hipolipideminių, priešuždegiminių ir antioksidacinių savybių gali veikti kaip antiaterosklerozinė priemonė, mažinanti uždegimą ir suteikianti antioksidacinį poveikį (171). O naujausi tyrimai su galio rūgštimi rodo jos potencialą vėžio gydymui ir užimamą svarbų vaidmenį naujų priešvėžinių vaistų kūrimo procesuose (172).

V. Chepel su bendraautoriais (2020), ekstrakcijai naudodami 70 % etanolį, aukštapelkėje Kaliningrado srityje (Rusija) surinkto žydinčio šilinio viržio lapuose ir žieduose nustatė atitinkamai 26,88±0,11 mg GRE/g ir 27,88±0,18 mg GRE/g FJ, kuriuose taninai sudarė atitinkamai 59 % ir 60 % bendro FJ kiekio (168). Bosnijos ir Hercogovinos kalnuose surinktame šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje, jį ekstrahuojant etanoliumi, bendras FJ kiekis buvo lygus 81,86±0,95 mg GRE/g, o flavonoidų – 43,03±0,11 mg RUE/g, kuris sudarė apie 53 % viso FJ kiekio. Nustatyta, kad *C. vulgaris* ekstraktai buvo veiksmingi prieš tam tikras bakterijų padermes, dažniausiai siejamas su šlapimo takų infekcijomis, pavyzdžiui, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* ir *Proteus vulgaris* (173). Nustatyta, kad Škotijoje augusio šilinio viržio lapų ir žiedų metanolinis ekstraktas buvo aktyvus prieš *Mycobacterium tuberculosis* bakterijas. Tai rodo potencialų šilinio viržio ekstraktų pritaikymą tuberkuliozės gydymui (174).

V. Kaunaitė ir bendraautoriai (2022) iš skirtingų Lietuvos vietovių (viso iš 10 augaviečių) surinktuose šilinio viržio mėginiuose nustatė didelę fenolinių ir triterpeninių junginių įvairovę. Žydėjimo metu surinktų šilinių viržių antžeminėse dalyse, jas ekstrahuojant ultragarsu su 70 % etanoliumi, nustatytas vidutinis bendras FJ kiekis siekė 49,11±5,35 mg GRE/g. Iš FJ gausiausi buvo chlorogeno rūgštis ir hiperozidas, o tarp triterpeninių junginių gausiausi buvo tokie junginiai, kaip

ursolio ir oleanolio rūgštys bei uvaolis. Spektrofotometriškai nustatytas šilinio viržio antioksidacinis aktyvumas siekė 1565,48 $\mu\text{mol/g}$, ir pastebėta, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo šilinio viržio ekstraktas, kuriame buvo nustatytas didžiausias FJ kiekis (175). Olandijoje aukštapelkėje augusio šilinio viržio stiebų ir lapų mišinyje, ekstrakcijai naudojant metanolį, spektrofotometriškai nustatyti triterpenoidai (įskaitant α -amiriną ir β -amiriną), ursolio ir oleanolio rūgštys (atitinkamai 34 000 $\mu\text{g/g}$ ir 14 000 $\mu\text{g/g}$) (176). Ursolio rūgštis yra penkiaciklinė triterpenoidinė karboksirūgštis, žinoma dėl savo antioksidacinio, priešuždegiminio ir priešvėžinio aktyvumo bei palyginti nedidelio toksiškumo (177). Nustatyta, kad oleanolio rūgštis pasižymi panašiu biologiniu aktyvumu, kaip ir ursolio rūgštis; šių abiejų rūgščių priešuždegiminės ir antihiperlipideminės savybės nustatytos atliekant tyrimus su laboratoriniais gyvūnais (178). Literatūroje nurodoma, kad abu šie junginiai pasižymi ir antivirusiniu aktyvumu prieš hepatito C virusą, blokuodami fermentą, kuris reikalingas virusui daugintis (179).

G. Starchenko ir bendraautoriai (2020), Ukrainoje žydėjimo metu surinktą šilinio viržio antžeminę dalį ekstrahavę 70 % etanoliu, nustatė, kad joje dominuoja tokie FJ, kaip chlorogeninė rūgštis, rutinas, (-)-epigalokatechinas ir (+)-galokatechinas. Lygindami ekstrakcijas skirtingais tirpikliais, mokslininkai nustatė, jog ekstrakcija skiestu etanoliu buvo efektyvesnė ir buvo išekstrahuoti didesni kiekiai hidroksicinaminių (choloreginės, kavos, p-kumaro ir ferulinės) rūgščių ir dvigubai daugiau rutino lyginant su rezultatais, gautais ekstrahavus vandeniu. Tačiau arbutino atveju vandeninė ekstrakcija buvo efektyvesnė ir arbutino kiekis nustatytas didesnis nei ekstrahuojant hidroetanoliu (atitinkamai $1,25 \pm 0,05$ % ir $0,83 \pm 0,04$ %) (180).

Šiaurės vakarų Ispanijoje, taikant Folin-Ciocalteu metodą ir ekstrahuojant polivinilpolipirolidonu, augančio šilinio viržio ūgliuose bendras FJ kiekis sudarė $96 \pm 7,2$ g TRE/kg, taninai – $64 \pm 6,2$ g TRE/kg (kas sudarė 68 % bendro FJ kiekio) (181). Kitame tyrime Šiaurės Ispanijoje, taikant tą pačią FJ nustatymo metodiką, gautas labai panašus rezultatas: nustatytas bendras FJ kiekis šilinio viržio ūgliuose buvo lygus 118 ± 2 g TRE/kg sausoje žaliavoje, taninų kiekis – 84 ± 3 g TRE/kg, kas sudarė 71 % bendro FJ kiekio (182). Jungtinėje Karalystėje Croptono miške (Šiaurės Jorkšyras) surinktuose šilinio viržio ūgliuose, juos ekstrahuojant 80 % metanoliu, ankstyvosios augimo stadijos metu vyravo chlorogeno rūgštis ir kvercetino 3-O-glikozidai. Vėliau nustatyta, kad vėlyvą pavasarį ir ankstyvą vasarą, kai šilinis viržis auga ir vystosi, jo FJ sudėtis pasikeičia ir atsiranda tokie junginiai, kaip (+)-katechinas, procianidinas D-1, chlorogeno rūgštis,

orcinolio-B-D-gliukozidas, kvercetas ir jo glikozidai (183). Olandijoje surinkto šilinio viržio ūgliuose taip pat buvo nustatyti tokie FJ, kaip fenoliniai glikozidai, arbutinas ir (-)-epikatechinas, kaempferolio dariniai (kaempferolio 3-O-gliukozidas, kaempferolio 3-O-galaktozidas, kaempferolio 3-O-arabinozidas), flavanolio aglikonai (kvercetas) ir keli procianidinams priklausantys junginiai. Tuo tarpu šilinio viržio šaknyse, lyginant su ūgliais, nustatyta mažiau FJ, tarp kurių gausiausi buvo (+)-katechinas ir procianidinas D-1 (176).

2. TYRIMO METODIKA

2.1. Tyrimo objektas

Šilinio viržio ir miltinės meškauogės augalinė žaliava buvo surinkta 2021-08-20 Pirčiupyje, Valkininkų seniūnijoje (Varėnos rajono savivaldybė). Mėlynės ir bruknės augalinė žaliava buvo surinkta 2022-05-28 Braziūkų girininkijoje (Kazlų rūdos savivaldybė). Surinkta žaliava sudėta į atskirus, džiovinimui skirtus maišus. Augalinė žaliava džiovinta kambario temperatūroje, tamsioje patalpoje, saugant ją nuo tiesioginių saulės spindulių (10 pav.).



10 pav. Džiovinama miltinės meškauogės ir šilinio viržio augalinė žaliava

2.2. Naudota aparatūra

1. Elektrinis smulkintuvas-malūnas („Retsch GM 200“, Vokietija).
2. Analitinės svarstyklės („Sartorius AX224“, Vokietija).
3. Laboratorinės svarstyklės („Sartorius M-power“, Vokietija).
4. Ultragarsinė vonelė („Bandelin Sonorex“, Vokietija).
5. Džiovinimo spinta („Mommert UN55“, Vokietija).
6. Spektrofotometras („Peakii C-7200S“, Kinija).
7. Centrifuga („Eppendorf 5430R“, Vokietija).
8. Kaitinimo krosnis.

9. Automatinės pipetės („Eppendorf Research“, Vokietija).
10. Šaldytuvas ir šaldiklis.
11. Ledo gaminimo aparatas.

2.3. Naudoti reagentai

1. Natrio karbonatas („Sigma-Aldrich“, Vokietija).
2. Folin-Ciocalteu reagentas („Sigma-Aldrich“, Šveicarija).
3. Netirpus polivilpirolidonas (PVPP) („Sigma-Aldrich“, Kinija).
4. Tanino rūgštis („Sigma-Aldrich“, Kinija).
5. Distiliuotas vanduo.

2.4. Drėgmės kiekio ir sausosios medžiagos kiekio nustatymas augalinėje žaliavoje

Sudžiovinta augalinė žaliava (bruknės, mėlynės, miltinės meškauogės lapai, šilinio viržio lapų ir žiedų mišinys) elektriniu smulkintuvu susmulkinta ir persijota pro dvių dydžių sietelius (sietelių akučių diametras 2 mm ir 0,5 mm). Kiekvienos tiriamos žaliavos analizei naudoti 3 mėginiai po 2 g žaliavos.

Drėgmės kiekio nustatymui iš pradžių buvo paruošti stikliniai biuksai – švariai išplauti, iškaitinti, sunumeruoti ir pasverti. Tada 1 mg tikslumu atsverta augalinė žaliava sudėta į atskirus stiklinius biuksus ir kaitinta 104 °C kaitinimo krosnyje 4 valandas. Po to iškaitinti biuksai su žaliava įdėti į eksikatorių, kur atvėsinti iki kambario temperatūros. Kiekvienas atvėsęs biuksas su žaliava buvo pasvertas 1 mg tikslumu. Drėgmės kiekis, išreikštas procentais pagal formulę:

$$W = \frac{(W1 - (W2 - Wb))}{W1} \cdot 100$$

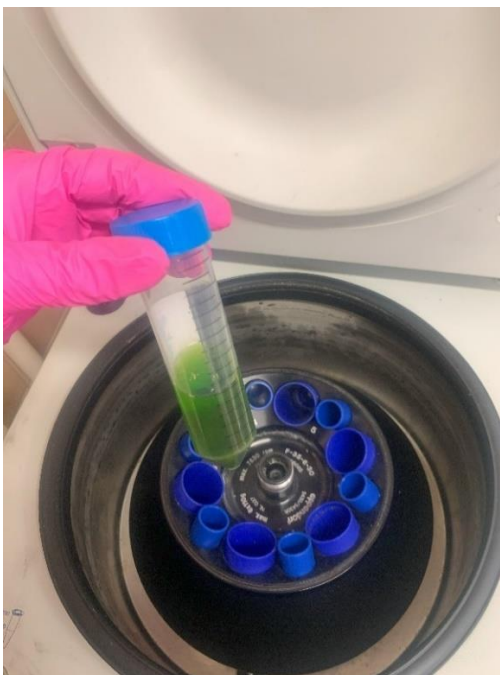
kurioje W – analizuojamos žaliavos drėgmė (%), W1 – analizuojamos žaliavos mėginio masė prieš kaitinimą (g), W2 – ataušusio uždengto biukso su žaliavos mėginiu masė po kaitinimo (g), Wb – tuščio biukso su dangteliu masė (g). Naudojant trijų bandymų duomenis, buvo skaičiuojamas drėgmės kiekio žaliavoje aritmetinis vidurkis. Sausosios medžiagos kiekis augalinėje žaliavoje skaičiuojamas pagal formulę:

$$M = 100\% - W$$

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

2.5. Ekstraktų paruošimas

Kiekvienos augalinės žaliavos ekstraktų paruošimui buvo naudojamas metanolis, acetonas ir etanolis šių skirtingų koncentracijų – 50 %, 70 % ir 100 %. Po 400 mg ekstrahavimui paruoštos augalinės medžiagos suberta į 50 ml talpos stiklinę kolbą ir užpilta 20 ml pagaminto tirpiklio. Kolbos uždengtos dangteliais ir perkeltos į ultragarso vonelę, kurioje laikytos 20 minučių kambario temperatūroje. Po to kolbos turinys perkeltas į centrifugavimo mėgintuvėlius ir 10 minučių buvo centrifuguojamas 3000 g greičiu 4 °C temperatūroje. Tada susidaręs skaidrus supernatantas (11 pav.) lėtai perpiltas į stiklinę kolbutę. Kolbutės su supernatantu (ekstraktu) (12 pav.) laikomos šaldytuve.



11 pav. Centrifugavimo mėgintuvėlyje susidaręs skaidrus supernatantas po centrifugavimo

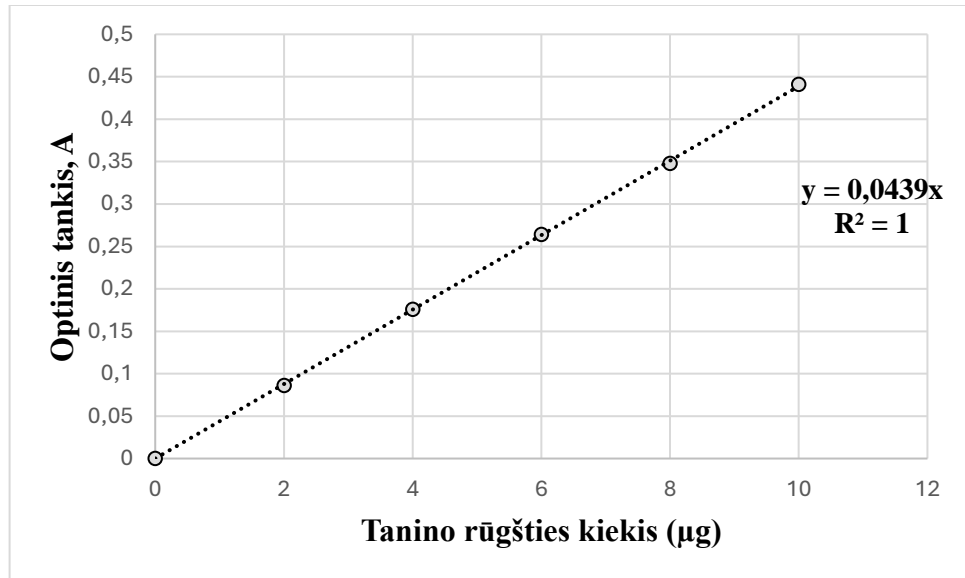


12 pav. Šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio etanoliniai ekstraktai, ekstrakcijai panaudojus 50 %, 70 % ir 100 % etanolį, iš kairės į dešinę

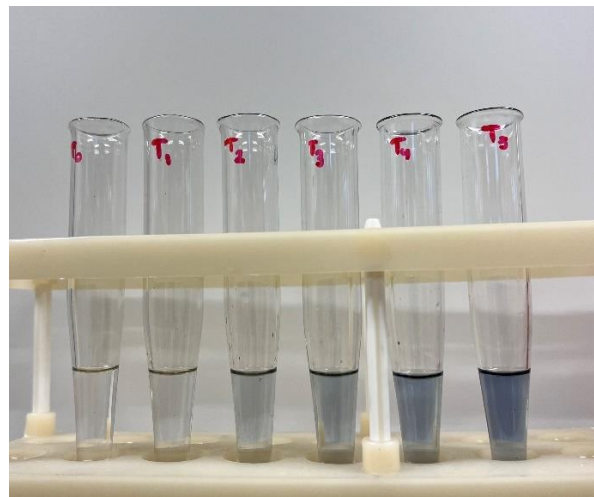
2.6. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas

Bendras FJ kiekis nustatytas Folin-Ciocalteu metodu. 0,02, 0,05 ir 0,1 ml šių ekstraktų buvo pilama į paruoštus švarius ir sunumeruotus mėgintuvėlius ir praskiesta distiliuotu vandeniu iki 0,5 ml žymos. Tuomet pilta 0,25 ml Folin-Ciocalteu reagento, mėgintuvėlių turinys sumaišytas, palaukta 10 minučių. Po 10 minučių į mėgintuvėlius įpilta 1,25 ml natrio karbonato tirpalo, mėgintuvėliai supurtyti, uždengti dangteliais ir pastatyti traukos spintoje. Po 40 minučių gauto mišinio absorbcija buvo išmatuota, naudojant spektrofotometrą, 1 cm skersmens kiuvetes ir 725 nm bangos ilgį. Lyginimui naudotas etaloninis tirpalas buvo paruoštas sumaišius 0,5 ml distiliuoto vandens su 0,25 ml Folin-Ciocalteu reagentu ir 1,25 ml natrio karbonato tirpalu. Bendras FJ kiekis absoliučiai sausoje žaliavoje, išreikštas TRE, apskaičiuotas iš kalibracinės kreivės lygties.

Kalibracinė kreivė (13 pav.) parengta, naudojant skirtingus kiekius (0, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 ir 0,1 ml) 0,1 mg/ml koncentracijos standartinį TR tirpalą. Kalibracinės kreivės nustatymui paruošti skirtingos koncentracijos TR tirpalai matomi 14 paveikslėlyje.



13 pav. Kalibracinė kreivė fenolinių junginių kiekiams apskaičiuoti, naudojant standartinį tanino rūgšties tirpalą



14 pav. Kalibracinės kreivės nustatymui paruošti skirtingos koncentracijos tanino rūgšties tirpalai

2.7. Bendro taninų kiekio nustatymas

Bendras taninų kiekis nustatytas Folin-Ciocalteu metodu. Siekiant nustatyti bendrą taninų kiekį buvo naudojami polivinilpirolidono milteliai. Šie milteliai veikia surišdami taninus, esančius tiriamųjų augalų ekstrakte.

0,1 g polivinilpirolidono miltelių buvo suberta į sugraduotus centrifuginius mėgintuvėlius su dangteliais. Kartu į mėgintuvėlius įpilta po 1 ml distiliuoto vandens ir 1 ml praskiesto ekstrakto. (Naudoti tokio pat skiedimo ekstraktai, kaip ir bendro FJ kiekio nustatymui atlikti. Taip praskiedimas išliko nepakitęs abiejų tyrimų metu.) Mėgintuvėliai uždaryti ir švelniai sukuriniu judesiu supurtyti, tuomet patalpinti 15 minučių į ledą ir laikyti 4 °C temperatūroje, šaldytuve. Iškart po to mėgintuvėliai dar kart permaišyti ir centrifuguoti 10 minučių 3000 g greičiu 4 °C temperatūroje. Susidaręs skaidrus supernatantas (15 pav.), kuriame taninai nusodinti, lėtai perpiltas į stiklines kolbutes, o nuosėdos paliktos mėgintuvėliuose.



15 pav. Centrifugavimo mėgintuvėlis po centrifugavimo, kuriame taninai surišti polivinilpirolidono milteliais

0,1 ml šių supernatantų buvo pilama į paruoštus švarius ir sunumeruotus mėgintuvėlius ir papildomai praskiesta distiliuotu vandeniu iki 0,5 ml žymos. Tuomet pilta 0,25 ml Folin-Ciocalteu reagento, mėgintuvėlių turinys sumaišytas, palaukta 10 minučių. Po 10 minučių į mėgintuvėlius įpilta 1,25 ml natrio karbonato tirpalo, mėgintuvėliai supurtyti, uždengti dangteliais ir pastatyti traukos spintoje. Po 40 minučių gauto mišinio absorbcija buvo išmatuota, naudojant spektrofotometrą, 1 cm skersmens kiuvetes ir 725 nm bangos ilgį. Rezultatai lyginami su kalibracine kreive, naudota bendro FJ kiekio nustatymui. Taninų kiekis buvo apskaičiuojamas iš bendro FJ kiekio atėmus supernatante nustatytą bendrą FJ kiekį, pagal formulę:

$$\text{Taninai (kaip tanino r. ekvivalentas)} = X - Y,$$

kur X – bendras fenolinių junginių kiekis (%), o Y –fenolinių junginių kiekis, likęs ekstrakto po taninų nusodinimo (%).

2.8. Statistinė analizė

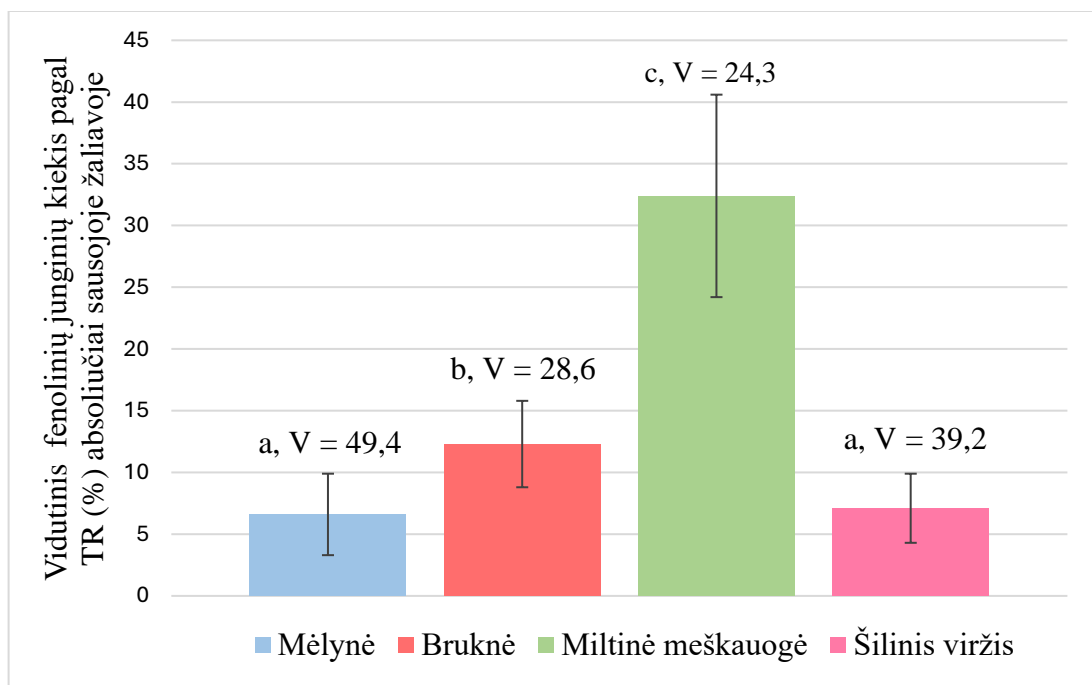
Gauti duomenys apdoroti naudojant STATISTICA[®] 7 ir MS Excel 2023 programomis. Buvo nubrėžtos kalibracinės kreivės ir grafikai, apskaičiuoti vidurkiai, variacijos koeficientai, standartinės paklaidos bei standartiniai nuokrypiai. Siekiant įvertinti, ar patikimai FJ ir taninų kiekiai skyrėsi tarp rūšių nepriklausomai nuo ekstrakcijai panaudotų tirpiklių ir jų koncentracijų, buvo taikyta vienfaktorinė ANOVA analizė ir Scheffe testas. Kruskal-Wallis testas buvo naudotas siekiant įvertinti, ar FJ ir taninų kiekiai rūšies viduje patikimai skyrėsi ekstrakcijai 1) panaudojus to pačio tirpiklio skirtingas koncentracijas, 2) ekstrakcijai panaudojus tos pačios koncentracijos skirtingus tirpiklius. Buvo pasirinktas reikšmingumo lygmuo $\alpha=0,05$.

3. TYRIMO REZULTATAI

3.1. Bendro fenolinių junginių ir taninų kiekio palyginimas rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrakcijai naudotų tirpiklių ir jų koncentracijų

3.1.1. Bendras fenolinių junginių kiekis rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrakcijai naudotų tirpiklių ir jų koncentracijų

16 paveikslo stulpelinėje diagramoje pateikiami vidutiniai FJ kiekiai, nustatyti keturių tirtų Ericaceae rūšių – mėlynės, bruknės, miltinės meškauogės ir šilinio viržio – augalų absoliučiai sausoje žaliavoje, nepriklausomai koks ekstrakcijos metu buvo naudotas organinis tirpiklis ar jo koncentracija. Didžiausias bendras FJ kiekis buvo nustatytas miltinės meškauogės lapuose ($32,4 \pm 8,2$ %), kuris buvo gerokai didesnis lyginant su kitomis rūšimis: maždaug 5 kartus didesnis nei mėlynės lapuose, 3 kartus didesnis nei bruknės lapuose ir 5 kartus didesnis nei šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje. Šie rezultatai rodo, kad miltinė meškauogė yra gausus FJ šaltinis. Vienfaktorinė analizė ANOVA ir Scheffe testas parodė, kad FJ kiekiai tarp rūšių, nepriklausomai nuo ekstrakcijai naudotų tirpiklių ir jų koncentracijų, skyrėsi patikimai ($p < 0,05$), išskyrus FJ kiekius tarp mėlynės ir šilinio viržio. Mažiausias vidutinis FJ kiekis – $6,6 \pm 3,3$ % – nustatytas mėlynės lapuose.



16 pav. Vidutiniai fenolinių junginių kiekiai Ericaceae šeimos rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrakcijai naudotų tirpiklių ir jų koncentracijų (TR – tanino rūgštis; skirtingos ir tos pačios mažosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus fenolinių junginių kiekių skirtumus tarp rūšių; V – variacijos koeficientas)

Naudojant trigubą maceraciją ir etanolio tirpiklį, Ukrainoje augusios mėlynės lapuose nustatytas bendras FJ kiekis buvo lygus 99,3 mg PE/g (184). Kitoje studijoje, atliktoje Bulgarijoje 2021 metais, tyrėjai nustatė, kad bendras FJ kiekis mėlynės lapuose, ekstrahuojant etanolium, buvo $52,37 \pm 8,62$ mg GRE/g. Naudojant etanolinius ekstraktus bei didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodą, Rumunijos kalnų regione augusios mėlynės lapuose nustatytas bendras FJ kiekis varijavo tarp $54,7 \pm 3,9$ mg GRE/g ir $106,9 \pm 2,9$ mg GRE/g, priklausomai ar žaliava buvo rinkta gegužės, liepos ar rugsėjo mėnesiais (185). Vėliau šio tyrimo autoriai skaičiavimuose pateikė bendrą FJ kiekio vidurkį, apytiksliai lygų 88,7 mg GRE/g. Tyrime, kuriame buvo vertinamas antioksidantų ir makro- bei mikroelementų kaupimasis *V. myrtillus*, augusios pietiniame Lenkijos regione, lapuose mažiausia užfiksuota bendra FJ kiekio vertė, ekstrakcijai naudojant metanolį, buvo 490,77 mg GRE/g, o stebinančiai didžiausia vertė – beveik 800 mg GRE/g, kas yra 12 kartų daugiau nei mūsų atliktame tyrime (186). Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad mėlynės, augusios Lietuvoje, lapuose bendras FJ kiekis ($6,6 \pm 3,3$ % arba $66,2 \pm 32,6$ mg TRE/g) yra panašus kaip ir

daugelyje kitų šalių augusių mėlynių lapuose. Nepaisant didesnio panašumo, esami skirtumai gali būti susiję su skirtingomis tyrimo sąlygomis (naudoti skirtingi tyrimo metodai, tirpikliai ir kt.) bei tiriamosios medžiagos kilmės vietomis.

Tiriant Rumunijoje augusias bruknes, jų lapuose bendras FJ kiekis varijavo nuo $85,3 \pm 0,8$ mg GRE/g iki $114,6 \pm 21,1$ mg GRE/g (120). *V. vitis-idaea* lapuose, surinktuose miške Mažeikiuose nuo birželio mėn. iki rugsėjo mėn. vidurio ir ekstrahuotuose metanoliu bei acetonu, bendras FJ kiekis varijavo intervale nuo $57,42 \pm 1,19$ mg GRE/g iki $91,15 \pm 1,3$ mg GRE/g džiovintoje žaliavoje ir priklausė tiek nuo naudojamo tirpiklio, tiek nuo žaliavos surinkimo laiko (187). Šio nurodyto tyrimo, kurio metu bruknių lapai buvo surinkti šiaurės vakarų Lietuvoje, nustatytas bendras FJ kiekis buvo 60 % arba 1,6 karto mažesnis nei mūsų atlikto tyrimo metu, kur buvo tirti **pietų** Lietuvoje augusių bruknių lapai. Šis palyginimas rodo galimus FJ kiekio skirtumus tarp šių dviejų Lietuvos regionų. L. Raudonė su bendraautoriais tyrė auginimo sąlygų ir fenologinio tarpsnio įtaką bruknių lapų antioksidaciniam pajėgumui ir padarė išvadą, jog įvairūs veiksniai, tokie kaip apšvietimas, saulės spinduliuotė, temperatūra, dirvožemio tipas, vabzdžių antpuoliai, auginimo metodai ir augalų genetinis fonas (t. y. tiek išoriniai, tiek vidiniai veiksniai) gali sukelti reikšmingus FJ kiekio skirtumus šios rūšies viduje (188).

Tiriant *A. uva-ursi* lapų chemines savybes ir antioksidacinį aktyvumą, buvo pastebėta, kad ties pietine šios rūšies geografinio arealo riba Europoje augusios miltinės meškauogės išsiskyrė didesniu sukaupiamu FJ kiekiu. Būtent kaimyninės Lenkijos viržynuose surinktų miltinių meškauogių lapuose bendras FJ kiekis varijavo nuo $238,85$ mg GRE/g iki $318,28$ mg GRE/g, o surinktų pušynuose – nuo $257,51$ mg GRE/g iki $306,57$ mg GRE/g. Geografiškai pietų Lenkija yra tokioje pačioje klimato zonoje kaip ir Lietuva, galimai todėl reikšmės, gautos minėtame ir mūsų tyrime, yra labai panašios. Taip pat P. Sugier su bendraautoriais savo tyrime pastebėjo, kad bendras FJ kiekis Lenkijoje augusių miltinių meškauogių lapuose labai skyrėsi nuo šių junginių kiekio Iberijos pusiasalyje augusių miltinių meškauogių lapuose, kuriuose FJ kiekis varijavo tik 170 – 180 mg GRE/g ribose (159). Mūsų tirtuose Lietuvoje rinktų miltinių meškauogių lapuose bendras FJ kiekis buvo apie 80 % didesnis nei Ispanijos populiacijos miltinėse meškauogėse.

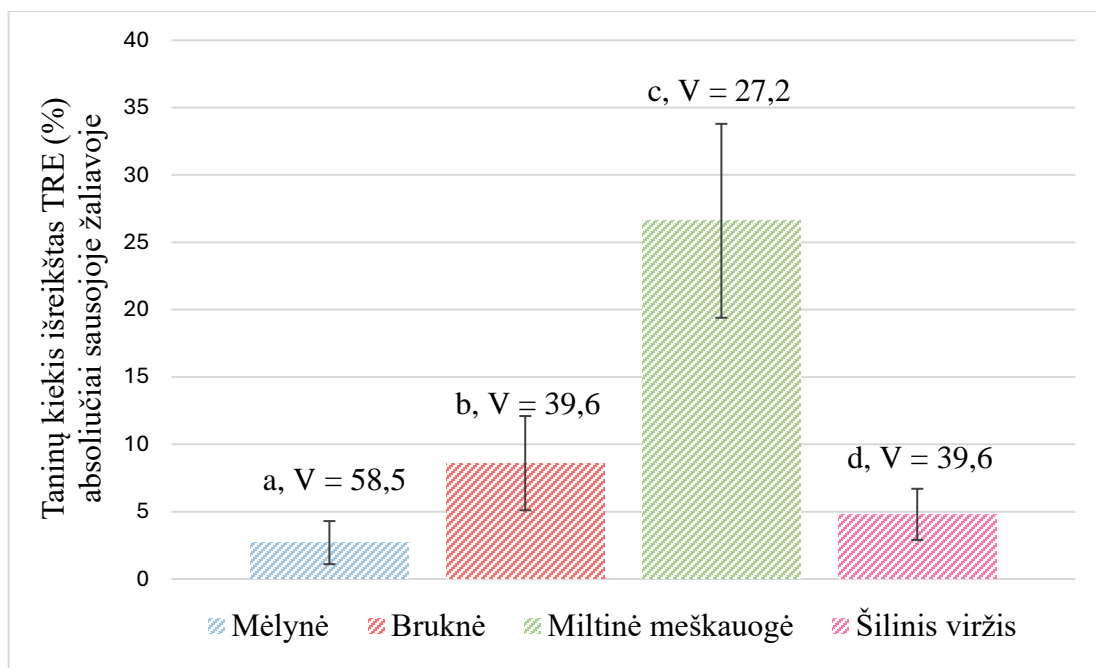
Saskačevane, netoli Rubino ežero (centrinė Kanada), atliktame tyrime, siekiant nustatyti bendrą FJ kiekį miltinės meškauogės lapuose, naudotas kolorimetrinis metodas ir 95 % etanolis. Pastebėta, kad iš penkių tirtų augalų rūšių, priklausančių skirtingoms šeimoms (Asteraceae,

Polygalaceae, Fabaceae, Equisetaceae ir Ericaceae), didžiausias FJ kiekis nustatytas *A. uva-ursi*, priklausančios Ericaceae šeimai, etanoliniuose ekstraktuose (189).

Remiantis 2019 m. Latvijoje atlikto tyrimo duomenimis, bendras FJ kiekis šilinio viržio antžeminės dalies (stiebų, lapų, žiedų), surinktų Siguldos rajone ir ekstrakcijai naudojant acetoną bei etanolį, buvo įvertintas vidutiniškai $44,5 \pm 10,0$ GRE mg/g (190). Palyginimui tęsiant literatūrinių duomenų analizę toliau, pietryčių Europos regione – Bosnijoje ir Hercegovinoje – surinktoje *C. Vulgaris* lapų ir lapkočių žaliavoje, ją ekstrahuojant etilo acetatu bei etanolium, bendras FJ kiekis varijavo nuo $67,55 \pm 0,38$ iki $81,86 \pm 0,95$ mg GRE/g (173). Kaip matyti, Bosnijoje ir Hercegovinoje augančiuose šiliniuose viržiuose nustatytas vidutinis FJ kiekis buvo apie 1,7 kartų didesnis nei Latvijoje augančiuose šiliniuose viržiuose. Pastebėtina, kad mūsų tyrime apskaičiuota bendra FJ kiekio vertė šilinio viržio žaliavoje – $70,9 \pm 27,6$ mg TRE/g – labiau artima šiliniams viržiams, augusiems piečiau nuo Lietuvos esančiame regione.

3.1.2. Bendras taninų kiekis skirtingose rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrakcijai naudotų tirpiklių ir jų koncentracijų

Bendras taninų kiekis, nepriklausomai koks tirpiklis ir jo koncentracija buvo naudota ekstrahuojant, tirtuose Ericaceae rūšių augaluose varijavo nuo $2,7 \pm 1,6$ % iki $26,6 \pm 7,2$ % absoliučiai sausoje žaliavoje (17 pav.). Iš visų keturių rūšių augalų didžiausias bendras taninų kiekis buvo nustatytas miltinės meškauogės lapuose, ir juose esantis taninų kiekis sudarė 82 % viso juose nustatyto bendro FJ kiekio. Lyginant visas tirtas rūšis matyti, jog miltinės meškauogės lapuose taninų buvo nustatyta maždaug 10 kartų daugiau nei mėlynės lapuose, 3 kartus daugiau nei bruknės lapuose ir 5,5 karto daugiau nei šilinio viržių lapų ir žiedų mišinyje. Mėlynės lapuose bendras taninų kiekis tarp tirtų rūšių buvo mažiausias. Vienfaktorinė analizė ANOVA ir Scheffe testas parodė, kad, neatsižvelgiant į naudotus tirpiklius ir jų koncentracijas, taninų kiekiai tarp rūšių skyrėsi patikimai ($p < 0,05$) (17 pav.). Taninai, esantys mėlynės lapuose, sudarė tik 41 % viso juose nustatyto FJ kiekio. Vertinant vidutinius FJ ir taninų kiekius nuo didžiausių link mažiausių reikšmių tarp tirtų Ericaceae šeimos rūšių augalinių žaliavų, matyti tas pats rūšių išsidėstymo eiliškumas – miltinė meškauogė > bruknė > šilinis viržis > mėlynė (16 ir 17 pav.).



17 pav. Vidutiniai taninų kiekiai Ericaceae šeimos rūšyse, nepriklausomai nuo ekstrakcijai naudotų tirpiklių ir jų koncentracijų (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas; skirtingos ir tos pačios mažosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus taninų kiekių skirtumus tarp rūšių; V – variacijos koeficientas)

S. Brasanac-Vukanovic su bendraautorais (2018 metai), naudodamas Soksleto bei maceravimo metodus ir etanolį, nustatė, kad Juodkalnijoje augusių mėlynių lapuose bendras taninų kiekis varijavo nuo 6,49 % iki 9,17 % (32). Nustatyta, kad Lenkijoje taninų kiekis mėlynių lapuose gali siekti iki 7,5 % (191). Lyginant šių dvejų ir mūsų tyrimų rezultatus matyti, kad bendras taninų kiekis Lietuvoje tirtų mėlynių lapuose buvo mažesnis nei Juodkalnijoje ir Lenkijoje atitinkamai 1,8 ir 1,9 karto. Literatūroje rašoma, kad *V. vitis-idaea* lapuose gali susikaupti nuo 6 % iki 11 % taninų. M. Maier ir kt. (2017) atliktas tyrimas atskleidė, kad Vokietijoje džiovintoje bruknės lapų augalinėje žaliavoje randama apytiksliai $4,0 \pm 0,1$ % taninų (192), tačiau verta paminėti, kad ekstraktams paruošti buvo naudojamas tik demineralizuotas vanduo. Priešingai nei šiame tyrime pateikti rezultatai, mūsų tyrimas naudojant ne vandeninius tirpiklius parodė didesnę taninų kiekį, lygų $8,6 \pm 3,4$ % (17 pav.). Mūsų tyrime nustatyta, kad bendras taninų kiekis bruknių lapuose buvo 3 kartus didesnis už taninų kiekį mėlynių lapuose. Tokia pati tendencija pastebėta ir Kanadoje: bendras taninų kiekis ten augusių bruknių lapuose (55 mg KE/g) viršijo taninų kiekį mėlynių lapuose (35 mg KE/g) 1,6 karto (100).

M. Maier ir kt. taninų kiekį literatūroje nustatė peržiūrėjęs ankstesnius tyrimus ir literatūros šaltinius, kuriuose buvo įvertintas taninų kiekis *A. uva-ursi* augaluose Europoje. Pasak minėtų tyrėjų, literatūroje nurodomas didžiausias taninų kiekis miltinės meškauogės lapuose – iki 20 %. Lygindami literatūros atitikimą praktikoje, atliktame tyrime Vokietijoje augusių miltinės meškauogės lapų žaliavoje ekstrakcijai naudojant demineralizuotą vandenį nustatytas bendras taninų kiekis buvo $13,7 \pm 0,8$ % (192). Tame pačiame tyrime miltinėse meškauogėse rastą taninų kiekį lyginant su bruknėse rastu taninų kiekiu, reikšmė yra 3,4 karto didesnė. Mūsų tyrime abi reikšmės labai panašios į reikšmes, nurodytas aukščiau minėtame literatūros šaltinyje: miltinių meškauogių lapuose nustatytas taninų kiekis už bruknėse nustatytą taninų kiekį yra didesnis 3 kartus, t. y. skirtumas tarp mano tyrimo ir ankstesnio aptarto tyrimo yra labai nedidelis.

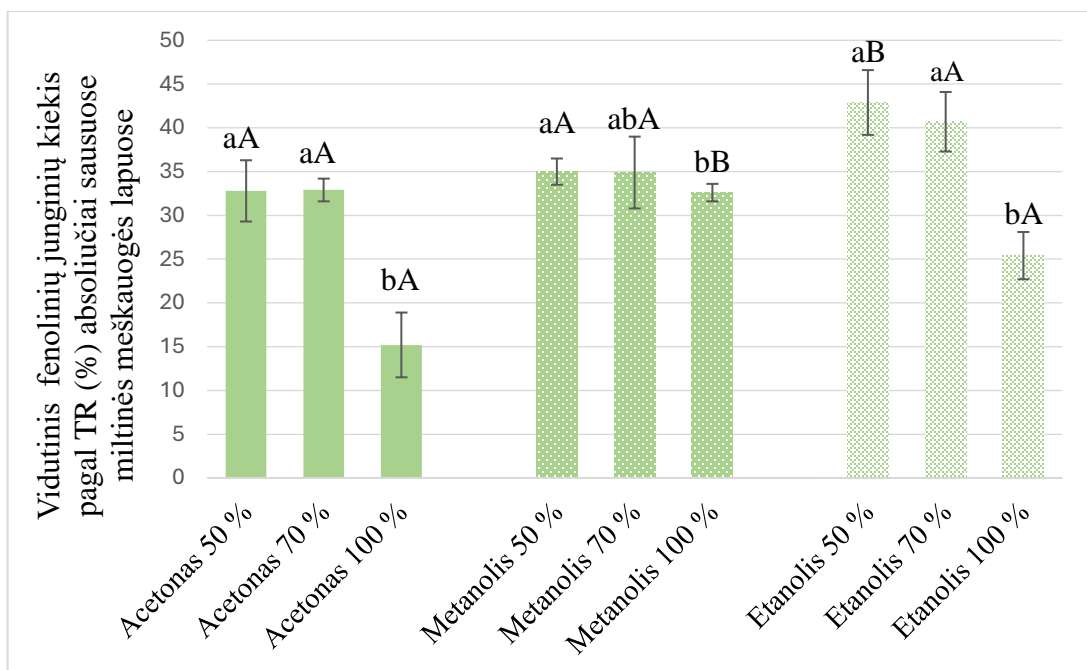
Rumunijoje tirtų šilinių viržių antžeminėje dalyje bendras taninų kiekis, tirpikliu naudojant metanolį ir etanolį, buvo nustatytas nedidelis ($1,72 \pm 0,017$ g PE/100 g sausos masės), lyginant su taninų kiekiu (22–36 mg TRE/g sausos medžiagos) skirtingų šilinių viržių rūšių, augusių Galicijoje (šiaurės vakarų Ispanija), antžeminėje dalyse, kuomet tirpikliu naudotas acetonas (164,193). Įdomu tai, kad kaip tirpiklį naudojant acetoną, *C. vulgaris* antžeminėje dalyje taninų buvo nustatyta $25,37$ mg TRE/g (193). Pažymėtina, kad Galicijoje surinktų šilinių viržių antžeminės dalies mėginiuose, naudojant tirpiklį acetoną, nustatyti tik hidrolizuoti taninai (193). Remiantis aukščiau minėtu moksliniu šaltiniu, kur buvo tiriami šiaurės vakarų Ispanijoje augę šilinis viržis ir mėlynė, matyti, kad šiliniame viržyje esančio taninų kiekio ($25,37$ mg TRE/g) ir mėlynėje esančio taninų kiekio ($14,68$ mg TRE/g) santykis yra lygus 1,7 kartų. Vertinant mūsų tyrimo rezultatus, bendras taninų kiekis tarp tirtos šilinio viržio ir mėlynės žaliavos skyrėsi beveik dvigubai ir labai sutapo su rezultatais, minimais aukščiau minėtuose literatūros šaltiniuose.

3.2. Bendro fenolinių junginių ir taninų kiekio palyginimas miltinės meškauogės lapuose

3.2.1. Fenolinių junginių kiekio palyginimas miltinės meškauogės lapuose, ekstrakcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas

18 paveikslo stulpelinėje diagramoje pateikiami vidutiniai FJ kiekiai absoliučiai sausuose miltinės meškauogės lapuose, juos ekstrahuojant trijų rūšių tirpikliais (acetonu, metanoliu, etanoliu), trimis skirtingomis jų koncentracijomis. Didžiausi FJ kiekiai miltinės meškauogės lapuose buvo nustatyti ekstrakcijai naudojant 50 % ir 70 % etanolį (atitinkamai $42,9 \pm 3,7$ % ir $40,7 \pm 3,4$ %), mažiausias – ekstrakcijai pasirinkus 100 % acetoną ($15,2 \pm 3,7$ % arba $152,3 \pm 36,4$ mg

TRE/g). Pastebėta, jog naudojant skiestą etanolį, metanolį ar acetoną, buvo išekstrahuojami didesni FJ kiekiai, nei naudojant tuos pačius, bet vandeniui neskiestus tirpiklius. Pavyzdžiui, ekstrahuojant 100 % acetonu, FJ kiekis miltinės meškauogės lapuose buvo nustatytas du kartus mažesnis, nei ekstrahuojant 50 % ar 70 % acetonu. Nustatyta, kad 50 % acetonu ir 70 % acetonu išekstrahuoti FJ kiekiai statistiškai patikimai nesiskyrė, kaip nesiskyrė ir FJ kiekiai, išekstrahuoti 50 % metanoliu ir 70 % metanoliu. Tuo tarpu 50 % etanolis buvo kiek efektyvesnis, nei 70 % etanolis: FJ kiekis, nustatytas panaudojus 50 % etanolį, buvo tik 2% didesnis nei panaudojus 70 % etanolį, ir FJ kiekio skirtumas nebuvo statistiškai patikimas. Ekstrakcijai naudojant skirtingų koncentracijų etanolį, išekstrahuotų FJ kiekio vertės ne visose etanolio koncentracijose yra didžiausios, lyginant su tokiomis pačiomis kitų tirpiklių koncentracijomis. Tik ekstrakcijos 50 % ir 70 % etanoliumu metu išekstrahuotas didžiausias FJ kiekis iš miltinės meškauogės lapų, palyginti su metanoliu ir acetonu. Tačiau ekstrakcijoje su 100 % etanoliumu gautas bendras FJ kiekis yra mažesnis nei ekstrahuojant neskiestu metanoliu. Tai rodo, kad tirpiklio koncentracijos pasirinkimas turi didelę įtaką ekstrakcijos efektyvumui ir tikslių junginių išėigai ir kad 50 % bei 70 % etanolis FJ ekstrahavimui iš miltinės meškauogės lapų yra efektyviausias.



18 pav. Vidutinis fenolinių junginių kiekis miltinės meškauogės lapuose, ekstrahuojant skirtingais įvairių koncentracijų tirpikliais (TR – tanino rūgštis; skirtingos ir tos pačios mažosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus fenolinių junginių kiekių skirtumus, ekstrahuojant to pačio tirpiklio skirtingų koncentracijų tirpalais; skirtingos ir tos pačios didžiosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus fenolinių junginių kiekių skirtumus, ekstrahuojant tos pačios koncentracijos skirtingais tirpikliais)

G. Kravchenko ir kiti bendraautoriai (2022), taikydami didelio efektyvumo skysčių chromatografiją ir spektrofotometriją bei naudodami 50 % etanolį, Lvive (Ukraina) rinktuose miltinės meškauogės lapuose nustatė $17,12 \pm 0,07$ GR % FJ (144). Kitame tyrime, kur buvo tirti iš Ispanijoje registruotos vaistažolių įmonės įsigyti džiovinti miltinės meškauogės lapai, naudojant Folin-Ciocalteu metodiką ir 50 % etanolį, tirtose žaliavoje nustatytas bendras FJ kiekis buvo lygus $102,11 \pm 7,12$ mg GRE/g (158). Tiriant vidurio rytų Lenkijos miškų populiacijose augusias miltines meškauoges, jų džiovintų lapų mėginiuose spektrofotometrinės analizės metodu ir naudojant 70% etanolį nustatytas bendras FJ kiekis varijavo nuo 258,03 mg GRE/g iki 298,52 mg GRE/g (194). Tai yra 2,5–3 kartus daugiau, nei aukščiau minėtame literatūros šaltinyje, kur buvo naudotas 50 % etanolis. Tokį didelį FJ kiekio skirtumą galėjo lemti Ukrainoje ir Ispanijoje bei Lenkijoje augusių

miltinių meškauogių skirtingos genetinės savybės ir nevienodos augimo sąlygos, kadangi mūsų atlikto tyrimo rezultatai parodė, jog 50 % etanolis yra efektyvesnis nei 70 % etanolis. Saskačevane prie Rubino ežero (centrinė Kanada) surinktuose miltinės meškauogės lapuose, naudojant kolorimetrinį metodą ir 95 % etanolį, nustatytas bendras FJ kiekis, išreikštas KE ekvivalentais, sudarė 312 mg/g (189).

Tačiau kito tyrimo metu, tiriant toje pačioje Kanados vietovėje augusių miltinių meškauogių lapus, bet naudojant didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodą bei 80 % etanolį, nustatytas kiek didesnis FJ kiekis – 320 mg KE/g (195). Kadangi abejuose tyrimuose buvo tirtos toje pačioje vietovėje surinktos miltinės meškauogės (o tai reišė, kad jos ne tik augo panašiomis aplinkos sąlygomis, bet turėjo būti ir genetiškai artimos), tyrimų rezultatai rodo, jog labiau skiestas 80 % etanolis gali būti efektyvesnis išskiriant FJ iš šios rūšies augalų lapų nei 95 % etanolis.

Psarrou ir kiti bendraatoriai (2020) tyrė etanolio koncentracijos įtaką ekstrakcijos procesui, FJ ekstrahuojant iš šiaurės Graikijoje augančių *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) lapų; tyrimo autoriai naudojo skirtingos koncentracijos etanolį – 0 %, 60 %, 80 % ir 96 %. Buvo nustatyta, kad skirtingų koncentracijų etanolis išekstrahuoja skirtingus FJ kiekius: didėjant etanolio koncentracijai iki 80 %, išekstrahuojamas bendras FJ kiekis didėja, tačiau ekstrahuojant 96 % etanolium bendras FJ kiekis vėl sumažėja (5 lentelė). Panašiai ir mūsų tyrime FJ kiekis, išgautas iš miltinės meškauogės lapų, naudojant gryną 100 % etanolį, yra mažesnis nei išgautas naudojant praskiestą etanolį, pavyzdžiui, 50 % arba 70 % koncentracijos (18 pav.). Tai galimai rodo, kad gali būti optimali etanolio koncentracija FJ iš miltinės meškauogės ekstrahuoti, o naudojant didesnę koncentraciją gali sumažėti ekstrakcijos efektyvumas.

5 lentelė. Bendras fenolinių junginių kiekis *Rosmarinus officinalis* džiovintuose lapuose, ekstrakcijai naudojant skirtingos koncentracijos etanolį (196)

Tirpiklis	Bendras fenolinių junginių kiekis (mg GRE/g)
0 % etanolis (tik vanduo)	7,96±1,02
60 % etanolis	20,30±0,8
80 % etanolis	20,43±0,76
96 % etanolis	13,65±0,22

Spektrofotometriškai tiriant Serbijoje augusį paragvajinį bugienį (*Ilex paraguariensis*, Aquifoliaceae) nustatyta, kad jo lapus ekstrahuojant 40 % etanoliu išskirtas bendras FJ kiekis buvo 1,4 didesnis nei ekstrahuojant 60 % etanoliu (atitinkamai $41,15 \pm 0,18$ mg KRE/g ir $29,46 \pm 0,23$ mg KRE/g) (197). Aptarti rezultatai, gauti su tirtais kitų rūšių augalais, sutapo su mūsų tyrimo metu tirtos miltinės meškauogės rezultatais ir parodė, jog skiestas etanolis efektyvesnis už neskiestą. Tačiau tai nereiškia kad ši tendencija tinka išskiriant FJ iš visų rūšių augalų, kadangi FJ apima plačią ir įvairiomis savybėmis pasižyminčių junginių grupę.

Mūsų darbe gautas rezultatas, jog, išskiriant FJ iš miltinės meškauogės lapų, vandeniui skiesti metanoliai yra efektyvesni, nei neskiestas metanolis (18 pav.), sutampa su S. Rosero ir kt. (2022) gautais rezultatais. Šie autoriai tyrė metanolio koncentracijos įtaką FJ, ekstrahuotų iš Ekvadoro centrinių aukštumų Andų miškuose augančių *Baccharis macrantha* (Asteraceae) lapų, kiekiui (198). Buvo nustatyta, kad neskiestas metanolis (t. y. 98 % metanolis) FJ išekstrahuoja mažiausiai (6 lentelė).

6 lentelė. Metanolio koncentracijos įtaka, ekstrahuojant fenolinius junginius iš *Baccharis macrantha* (198)

Tirpiklis	Bendras fenolinių junginių kiekis (mg GRE/g)
25 % metanolis	$7,45 \pm 0,16$
50 % metanolis	$7,05 \pm 0,34$
75 % metanolis	$10,82 \pm 0,76$
98 % metanolis	$3,94 \pm 0,14$

Mokslinėje literatūroje taip pat rasta darbų, kurių metu FJ iš miltinės meškauogės buvo ekstrahuoti acetonu. Pavyzdžiui, naudojant Denis-Folino metodą ir 70 % acetoną, trijose Kanados vietovėse (Saskatoon, La Ronge ir Ruby Lake) surinktuose miltinės meškauogės šakelėse su lapais nustatytas bendras FJ kiekis buvo lygus 366 ± 5 mg GRE/g (199). Mūsų tyrimo metu, naudojant 70 % acetoną, miltinės meškauogės lapuose nustatytas bendras FJ kiekis buvo labai panašus – $32,9 \pm 1,3$ % (arba $329,5 \pm 7,3$ mg TRE/g) (18 pav.). Buvo nustatyta, kad acetono koncentracija turi įtakos FJ, ekstrahuojamų iš *R. officinalis*, kiekiui (196). FJ junginiai buvo ekstrahuojami iš šiaurės Graikijoje augusio kvapiojo rozmarino lapų, naudojant skirtingų koncentracijų – 0 %, 40 %, 60 %, 80 % acetono.

80 % ir 100 % – acetoną. Buvo nustatyta, kad, didinant acetono koncentraciją, iš tiriamojo objekto išekstrahuojamas FJ kiekis mažėjo, ir mažiausias FJ kiekis išekstrahuotas naudojant neskiestą acetoną (7 lentelė).

7 lentelė. Bendras fenolinių junginių kiekis *Rosmarinus officinalis* džiovintuose lapuose, ekstrakcijai naudojant skirtingos koncentracijos acetoną (196)

Tirpiklis	Bendras fenolinių junginių kiekis (mg GRE/g)
0 % acetonas (tik vanduo)	7,96±1,02
40 % acetonas	27,48±1,14
60 % acetonas	24,95±1,02
80 % acetonas	22,23±0,83
100 % acetonas	10,39±0,18

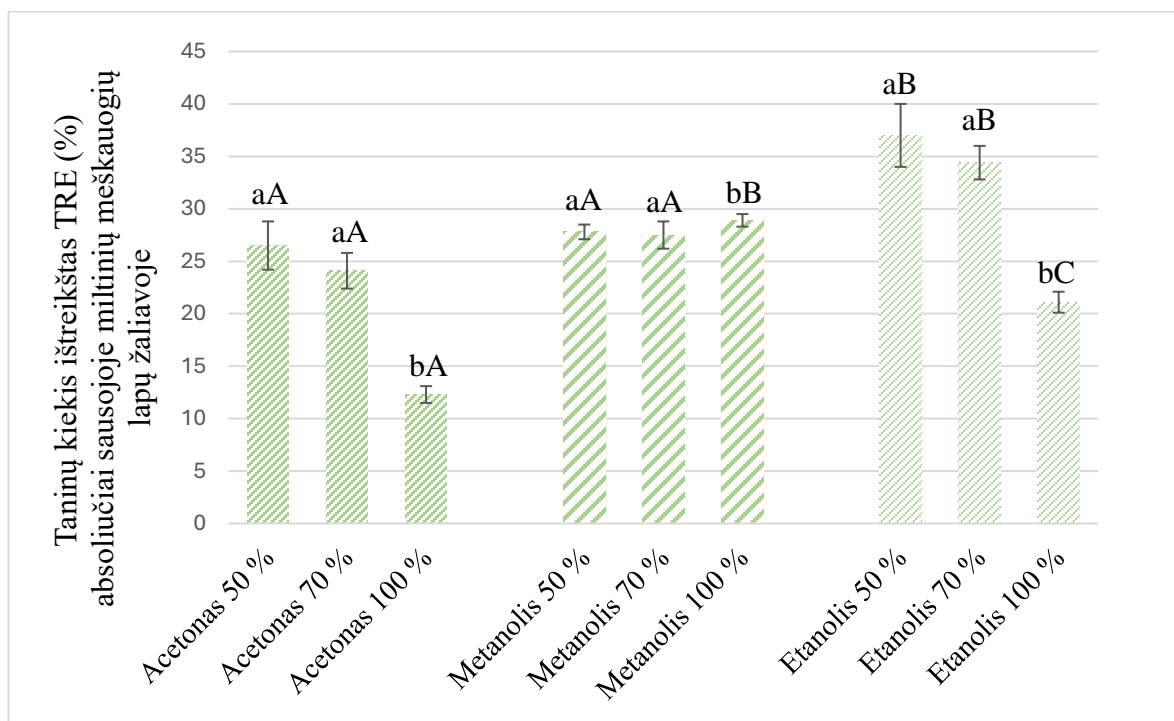
3.2.2. Taninų kiekio palyginimas miltinės meškauogės lapuose, ekstrakcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas

Gauti rezultatai parodė, jog didžiausias taninų kiekis miltinės meškauogės lapuose nustatytas ekstrakcijai naudojant 50 % etanolį – 37±3 %, kas sudarė 87 % viso bendro FJ kiekio šių augalų lapuose, ekstrahuotuose taip pat 50 % etanoliu (18 ir 19 pav.). Su 70 % bei 100 % etanoliu iš miltinės meškauogės lapų taip pat buvo išekstrahuotas didelis taninų kiekis, kuris sudarė atitinkamai 85 % ir 83 % bendro FJ kiekio, pastebėta, jog lyginant 70 % etanolį su neskiestu etanoliu, statistiškai reikšmingai skyrėsi gautų FJ kiekiai. Nors mažiausiai taninų iš miltinės meškauogės lapų išekstrahuota su 100 % acetonu – 12,3±0,8 %, tačiau lyginant su kitais dviem tirpikliais ir visomis jų koncentracijomis, būtent šiuo atveju taninai sudarė apie 81 % bendro FJ kiekio. Tai yra didesnė taninų procentinė dalis, lyginant su procentinėmis dalimis, nustatytomis naudojant 50 % (80 % bendro FJ kiekio) ir 70 % (73 % bendro FJ kiekio) acetoną. Tai rodo, kad, naudojant didesnės koncentracijos acetoną, iš miltinės meškauogės lapų galima išekstrahuoti daugiau taninų. Skaitine verte iš miltinės meškauogės lapų žaliavos išekstrahuotų taninų kiekis naudojant 50 % acetoną buvo maždaug 2 kartus didesnis už taninų kiekį, išekstrahuotą su neskiestu acetonu.

Priešingai nei su dviem anksčiau aptartais tirpikliais, miltinės meškauogės lapų ekstrakcijai naudotas įvairių koncentracijų metanolis pasižymėjo kitokia tendencija. Taninai buvo

veiksmingiau ekstrahuojami naudojant 100 % metanolį ($28,9 \pm 0,6$ %), lyginant su ekstrakcijai naudotu 50 % ir 70 % metanoliumi (atitinkamai $27,8 \pm 0,7$ % ir $27,5 \pm 1,3$ %). Miltinėje meškauogėje patikimai skyrėsi taninų kiekiai ekstrahuojant neskiestu metanoliumi, nuo taninų kiekio, ekstrakcijai panaudojus 50 % ir 70 % metanolį.

Šie palyginimai rodo, kad skirtingų tirpiklių ir jų koncentracijų veiksmingumas ekstrahuojant taninus iš miltinės meškauogės skiriasi. Tai gali būti susiję su tuo, kokius taninus augalas kaupia. Pavyzdžiui, R. Pegg ir kiti bendra autoriai (2008), nustatė, jog, skirtingai nei kiti Ericaceae šeimos rūšių augalai, miltinės meškauogės lapuose daugiausia susikaupia hidrolizuotos formos taninai ir tik nedidelis kiekis proantocianidinų (kondensuotų taninų) (200).



19 pav. Vidutiniai taninų kiekiai miltinės meškauogės lapuose, ekstrahuojant skirtingais įvairių koncentracijų tirpikliais (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas; skirtingos ir tos pačios mažosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus taninų kiekių skirtumus, ekstrahuojant to pačio tirpiklio skirtingų koncentracijų tirpalais; skirtingos ir tos pačios didžiosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus taninų kiekių skirtumus, ekstrahuojant tos pačios koncentracijos skirtingais tirpikliais)

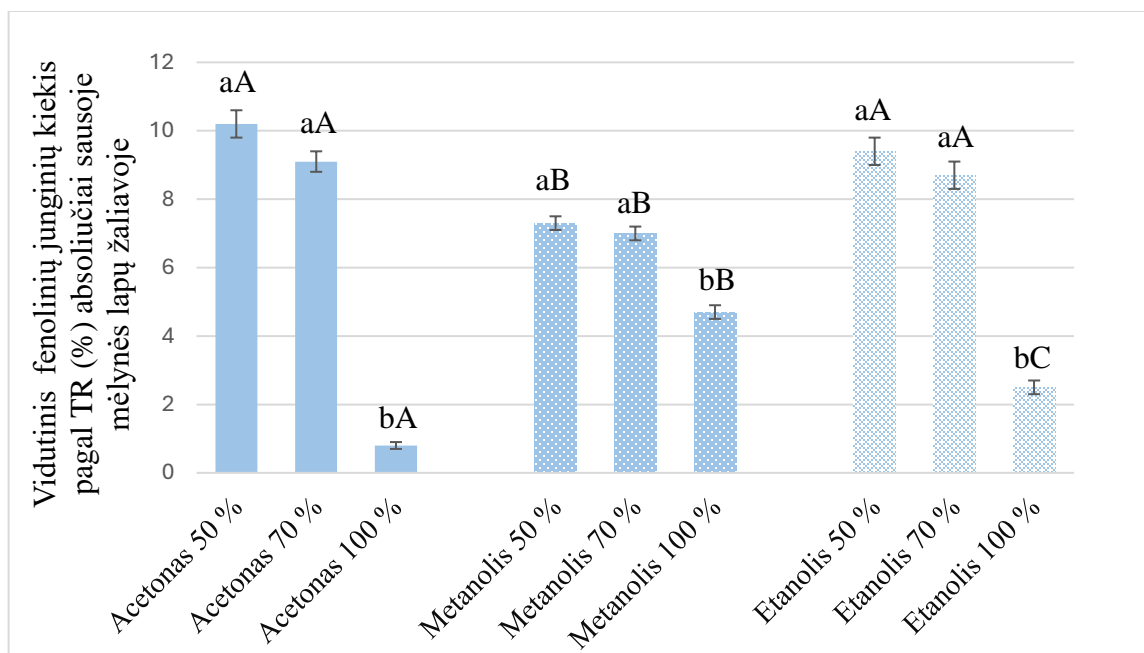
Ispanijoje rinktuose miltinės meškauogės lapuose, ekstrakcijai naudojant didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodą ir 50 % etanolį, nustatyta 13 % taninų. Taip pat šiame darbe nurodoma, kad miltinės meškauogės lapai pasižymėjo didžiausiu taninų kiekiu iš visų šešių tirtų *Arctostaphylos* genties rūšių augalų (*A. patula*, *A. viscida*, *A. canescens*, *A. columbiana*, *A. nevadensis* ir *A. uva-ursi*) (161).

Atliekant tyrimą su demineralizuotu vandeniu nustatyta, kad tirčiuose *A. uva-ursi* lapų ekstraktuose taninų kiekis buvo (11,4±0,3 %) (192). Mūsų tyrime, kuriame buvo naudojami trys skirtingi tirpikliai (acetonas, metanolis ir etanolis) su skirtingomis koncentracijomis, taninų kiekiai miltinės meškauogės lapuose nustatyti daug didesni, išskyrus neskiestą acetoną, su kuriuo išekstrahuotas taninų kiekis (12,3 %) buvo labai artimas kiekiui (19 pav.), nurodytam aukščiau minėtame literatūros šaltinyje, kur ekstrakcija buvo atliekama vandeniu.

3.3. Bendro fenolinių junginių ir taninų kiekio palyginimas mėlynės lapuose

3.3.1. Fenolinių junginių kiekio palyginimas mėlynės lapuose, ekstrakcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas

Iš 20 paveiksle pateiktos stulpelinės diagramos matyti, kad didžiausias bendras FJ kiekis mėlynės lapuose buvo nustatytas juos ekstrahuojant 50 % acetonu (10,2±0,4 % arba 101,8±3,6 mg TRE/g). Nuo šio rezultato nedaug skyrėsi (skirtumas nebuvo reikšmingas) ir FJ kiekis, išekstrahuotas 50 % etanoliu – 9,4±0,4 % arba 93,5±2,3 mg TRE/g). Skiesti metanoliai, lyginant su kitais dviem skiestais tirpikliais, buvo mažiausiai efektyvūs išskiriant FJ iš mėlynių lapų, tačiau 100 % metanolis išekstrahavo net 6 ir 2 kartus daugiau FJ nei atitinkamai neskiestas acetonas ir neskiestas etanolis. Tyrimas parodė, kad grynai tirpikliai yra mažai efektyvūs ir naudojant juos mėlynės lapų ekstrakcijoje išekstrahuotas FJ kiekis statistiškai patikimai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo FJ kiekių, išekstrahuotų naudojant skiestus tirpiklius: mažiausios FJ, išgautų iš mėlynės lapų, kiekio vertės nustatytos, kai ekstrakcijai buvo naudoti visi trys 100 % tirpikliai – acetonas, metanolis ir etanolis (atitinkamai FJ kiekis buvo 0,8±0,1 %, 4,7±0,2 % ir 2,5±0,2 %).



20 pav. Vidutinis fenolinių junginių kiekis mėlynės lapuose, ekstrahuojant skirtingais įvairių koncentracijų tirpikliais (TR – tanino rūgštis; skirtingos ir tos pačios mažosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus fenolinių junginių kiekių skirtumus, ekstrahuojant to pačio tirpiklio skirtingų koncentracijų tirpalais; skirtingos ir tos pačios didžiosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus fenolinių junginių kiekių skirtumus, ekstrahuojant tos pačios koncentracijos skirtingais tirpikliais)

S. Brasanac-Vukanovic su bendraautoriais (2018), naudodami du skirtingus ekstrakcijos metodus bei 70 % etanolį, nustatė, kad Juodkalnijoje augusių mėlynių lapuose, bendras FJ kiekis varijavo nuo 173,19 mg GRE/g (ekstrahuojant Soksleto metodu) iki 217,59 mg GRE/g (maceruojant) (32). Mūsų tyrime Lietuvos rytinėje dalyje augusių mėlynių lapuose gautos vertės, naudojant 70 % etanolį, buvo mažesnės – 86,4±2,5 mg TRE/g. M. Ginovyan ir bendraautoriai (2023) spektrofotometriškai Folin-Ciocalteu metodu analizavo Armėnijos kalnuose surinktų mėlynių antžeminę dalį ir, naudojant maceraciją ir 96 % etanolį, nustatė, kad joje bendras FJ kiekis buvo 136,2±4,75 µg GRE/mg (23). Labai panašūs rezultatai buvo gauti tiriant Rumunijoje augusių *V. myrtillus* lapus: ekstrahuojant ultragarsu bei naudojant 40 % etanolį išekstrahuotas FJ kiekis juose sudarė vidutiniškai 135,8±9,25 mg GRE/g (97). Mūsų tirtus mėlynių lapus ekstrahuojant etanoliumi, FJ kiekis varijavo nuo 25,1±2,1 mg TRE/g (naudojant 100 % etanolį) iki 93,5±2,3 mg TRE/g

(ekstrahuojant 50% etanoliu). Literatūros šaltinių, kur būtų pateikiami FJ kiekio mėlynės lapuose tyrimai kuomet ekstrakcijai naudojamas acetonas ar metanolis, rasti nepavyko.

Ekstrahuojant FJ iš mėlynės ir miltinės meškauogės lapų efektyviausi buvo skirtingi tirpikliai: iš mėlynės lapų daugiausia FJ buvo išekstrahuota su 50 % acetonu, o iš miltinės meškauogės – su 50 % etanoliu (18 ir 20 pav.). FJ ekstrakcijai iš augalų didelės įtakos gali turėti tirpiklių poliškumas. Paprastai labiau poliniai tirpikliai, tokie kaip metanolis ir etanolis, yra veiksmingesni ekstrahuojant polinius FJ, nes gali su jais sudaryti vandenilinius ryšius (190,201). Tad, remiantis mūsų gautais rezultatais, galime manyti, kad miltinėje meškauogėje, tikėtina, yra daugiau polinių FJ, nes etanolis buvo veiksmingesnis tirpiklis ekstrahuojant FJ ir šio augalo žaliavos. Kita vertus, mažiau poliniai tirpikliai kaip, pavyzdžiui, acetonas, gali būti veiksmingesni ekstrahuojant nepolinius FJ, nes, nors gali dalyvauti ir dipolinėse sąveikose, tačiau negali sudaryti vandenilinių ryšių tarp tirpiklio molekulių, nes neturi lengvai jonizuojamų vandenilio atomų (202). Atsižvelgiant į tai, jog acetonas yra vidutiniškai polinis tirpiklis (galintis ekstrahuoti ir polinius, ir nepolinius junginius) ir jis buvo efektyviausias ekstrahuojant FJ iš mėlynės lapų, galime manyti, kad tarp mėlynės lapuose besikaupiančių FJ nemažą dalį sudaro nepoliniai FJ. Taip pat matyti, kad miltinės meškauogės atveju 50 % ir 70 % acetonas beveik vienodai efektyviai ekstrahavo FJ (18 pav.), kai tuo tarpu mėlynės atveju su 50 % acetonu išekstrahuotas didesnis FJ kiekis nei su 70 % acetonu (20 pav.). Tai taip pat rodo, kad optimali acetono koncentracija FJ ekstrahuoti gali priklausyti nuo konkrečios augalo rūšies FJ sudėties spektro.

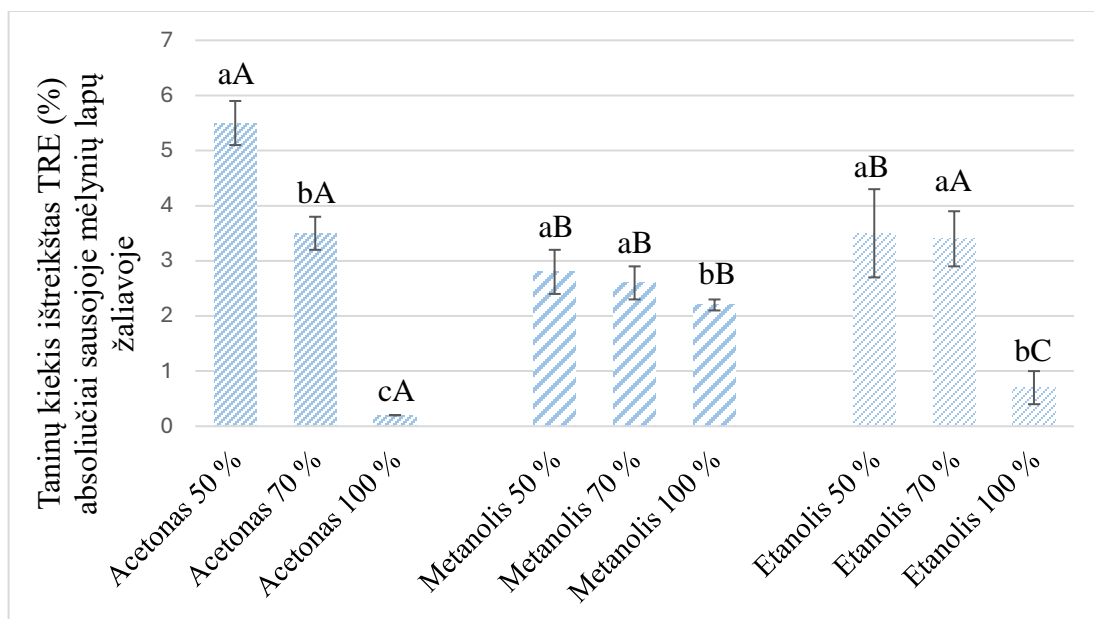
Taip pat abejoms augalinėms žaliavoms buvo būdinga ta pati tendencija: išekstrahuojamų FJ kiekis mažėjo didėjant ekstrakcijai naudojamų tirpiklių koncentracijoms, ypač naudojant neskietus tirpiklius (18 ir 20 pav.). Su tirpiklių visų tirtų koncentracijų tirpalais didesni FJ kiekiai buvo išekstrahuojami iš miltinės meškauogės lapų. Tačiau, pavyzdžiui, naudojant tiek 50 % metanolį, tiek 50 % etanolį, iš miltinės meškauogės lapų buvo išekstrahuota beveik 5 kartus daugiau FJ nei iš mėlynės lapų (18 ir 20 pav.). Tai priklauso nuo pačios augalo rūšies, jos genetinių savybių, kadangi kaip jau buvo aptarta darbo literatūrinėje dalyje, miltinėje meškauogėje susikaupia daugiau FJ junginių nei mėlynėje.

3.3.2. Taninų kiekio palyginimas mėlynės lapuose, ekstrakcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas

Iš 21 paveiksle pateiktų vidutinių taninų kiekių mėlynės lapuose, ekstrahuojant skirtingais įvairių koncentracijų tirpikliais, galima matyti, jog didžiausias taninų kiekis mėlynės lapuose nustatytas ekstrakcijai naudojant 50 % acetoną – $5,5 \pm 0,4$ %, kas sudarė pusę viso FJ kiekio šių augalų lapuose, ekstrahuotuose taip pat 50 % acetonu (20 ir 21 pav.). Mėlynės lapus ekstrahavus 70 % acetonu, taninų juose nustatyta $3,5 \pm 0,3$ %, kas sudarė mažiau – 39 % viso FJ kiekio, ekstrahavus 70 % acetonu (21 pav.). Labai panašus taninų kiekis gautas ir mėlynių lapų ekstrakcijai panaudojus 50 % etanolį – $3,5 \pm 0,8$ %. Mažiausios taninų vertės gautos ekstrakcijai panaudojus 100 % acetoną – $0,2 \pm 0,0$ % ir 100 % etanolį – $0,7 \pm 0,3$ %, kas abiem atvejais sudarė apie ketvirtadalį bendro FJ, taip pat ekstrahuotų neskiestu acetonu ir etanoliu, kiekio.

Taninų iš mėlynės lapų ekstrakcijai naudojant metanolį, išekstrahuotų taninų kiekių reikšmės varijavo nuo $2,2 \pm 0,1$ % iki $2,8 \pm 0,4$ %. Nustatyta, kad 50 % metanoliu ir 70 % metanoliu išekstrahuoti taninų kiekiai tarpusavyje statistiškai patikimai nesiskyrė, bet abejais atvejais skyrėsi nuo neskiestu metanoliu išekstrahuotų taninų kiekių. Įdomu tai, kad didžiausia taninų dalis (47 %) bendro FJ kiekio atžvilgiu buvo nustatyta ekstrakcijai panaudojus 100 % metanolį, nors ekstrahuojant grynu metanoliu FJ išsiskyrė mažiausiai, lyginant su kitų dviejų koncentracijų – 50 % ir 70 % – metanolio tirpalais, kur taninai sudarė atitinkamai 38% ir 37% viso FJ kiekio.

Apibendrinant taninų kiekio mėlynės lapuose skirtumus, ekstrakcijai naudojant skirtingus tirpiklius, matyti, kad didžiausios taninų kiekio vertės buvo ekstrahuojant žaliavą 50% koncentracijos tirpikliais, o mažiausios – ekstrakcijai naudojant 100% koncentracijų tirpiklius.



21 pav. Vidutiniai taninų kiekiai mėlynės lapuose, ekstrahuojant skirtingais įvairių koncentracijų tirpikliais (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas; skirtingos ir tos pačios mažosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus taninų kiekių skirtumus, ekstrahuojant to pačio tirpiklio skirtingų koncentracijų tirpalais; skirtingos ir tos pačios didžiosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus taninų kiekių skirtumus, ekstrahuojant tos pačios koncentracijos skirtingais tirpikliais)

S. Brasanac-Vukanovic ir bendraautoriai, naudodami 70 % etanolį ir Europos farmakopėjoje aprašytą taninų kiekio nustatymo metodą, nustatė, kad Juodkalnijoje augusių mėlynių lapuose, ekstrahuojant Soksleto aparatu, bendras taninų kiekis buvo 6,49 %, o ekstrahuojant maceracijos būdu – 9,17 % (32). Mūsų tyrime, naudojant 70 % etanolį, mėlynės lapuose išekstrahuotas taninų kiekis buvo dvigubai ir trigubai mažesnis, nei nurodoma aukščiau minėtame literatūros šaltinyje, kur su tos pačios koncentracijos etanoliumi buvo ekstrahuojama atitinkamai Soksleto aparatu ir maceracijos būdu (21 pav.).

Lyginant mūsų tyrime gautus taninų kiekius miltinės meškauogės ir mėlynės lapuose matyti, kad, ekstrahuojant tais pačiais tų pačių koncentracijų tirpikliais, didesnis taninų kiekis išekstrahuotas iš miltinės meškauogės lapų (19 ir 21 pav.). Pavyzdžiui, ekstrahuojant 50 % ir 70 %

acetonu, miltinės meškauogės lapuose taninų nustatyta 5 ir 7 kartus daugiau nei mėlynės lapuose, o ekstrahuojant 100 % acetonu – 62 kartus daugiau. Tirpikliu pasirinkus metanolį, iš miltinės meškauogės žaliavos, priklausomai nuo panaudoto metanolio tirpiklio koncentracijos, išekstrahuota 10 – 13 kartų daugiau taninų nei iš mėlynės žaliavos. Labai panašiai ekstrahuojant etanoliu, 50 % ir 70 % miltinės meškauogės lapuose nustatyta maždaug 11 ir 10 kartų daugiau taninų, o 100 % etanoliu, net apie 30 kartų daugiau taninų nei mėlynės lapuose.

Verta pažymėti, kad ekstrahuojant įvairiais tirpikliais, taninų kiekis mėlynės lapuose varijavo mažesnių reikšmių ribose palyginti su taninų kiekiu miltinės meškauogės lapuose (19 ir 21 pav.). Įdomu tai, kad mažiausias ir didžiausias nustatytas taninų kiekis mėlynės lapuose statistškai patikimai ($p < 0,05$) skyrėsi: mažiausias taninų kiekis nustatytas ekstrahuojant 100 % acetonu $0,2 \pm 0,0$ %, didžiausias taninų kiekis nustatytas panaudojus 50 % acetoną $5,5 \pm 0,4$ % (21 pav). Tuo tarpu miltinės meškauogės atveju, ekstrahuojant skirtingais tirpikliais, nustatytas didesnis skirtumas tarp išekstrahuoto mažiausio ir didžiausio taninų kiekio: mažiausias taninų kiekis gautas, ekstrakcijai panaudojus 100 % acetoną – $12,3 \pm 0,8$ %, o didžiausias – naudojant 50 % etanolį – 37 ± 3 % (19 pav).

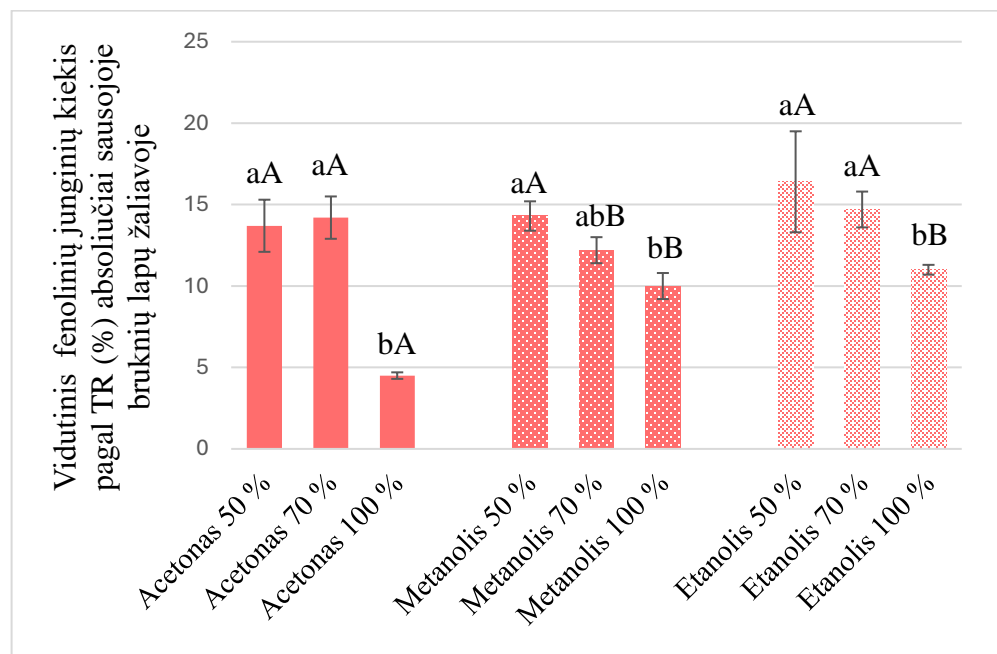
3.4. Bendro fenolinių junginių ir taninų kiekio palyginimas bruknės lapuose

3.4.1. Fenolinių junginių kiekio palyginimas bruknės lapuose, ekstrakcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas

Iš 22 paveiksle pateiktos stulpelinės diagramos matyti, kad didžiausias bendras FJ kiekis bruknės lapuose buvo nustatytas juos ekstrahuojant 50 % etanoliu ($16,4 \pm 3,1$ % arba $164,0 \pm 26$ mg TRE/g). Atliktas Kruskal-Wallis testas parodė, jog su visais tirtais 50 % tirpikliais iš bruknės lapų išekstrahuotas FJ kiekis statistškai patikimai nesiskyrė. Ekstrakcijai panaudojus 50 % metanolį buvo nustatytas šiek tiek mažesnis FJ kiekis ($14,3 \pm 0,9$ % arba $142,5 \pm 3,5$ mg TRE/g) ir labai panašus FJ kiekis nustatytas su 50 % acetonu ($13,6 \pm 1,5$ % arba $136,8 \pm 15$ mg TRE/g). Skirtingai nei su alkoholiniais tirpikliais, ekstrakcijai panaudojus 70 % acetoną, bendras FJ kiekis iš bruknės lapų išekstrahuotas didesnis ($14,2 \pm 1,3$ %) nei naudojant 50 % acetoną, nors skirtumas ir nebuvo statistškai reikšmingas. Tai galėjo lemti optimali tirpiklio koncentracijos poliškumo pusiausvyra, palengvinanti bruknės lapuose susikaupusių atitinkamo poliškumo FJ tirpimą. Manoma, kad dėl acetono poliškumo, kai jo koncentracija yra 70 %, ekstrakcijos proceso metu jis efektyviau tirpina panašaus poliškumo FJ iš augalinės žaliavos.

Ekstrakcijai naudojant visų koncentracijų etanolį, išekstrahuotų FJ kiekio vertės visose etanolio koncentracijose buvo didžiausios, lyginant su tokiais pačiomis kitų tirpiklių koncentracijomis. Tai rodo, kad etanolis labiau tinkamas tirpiklis FJ iš bruknės lapų ekstrahuoti nei metanolis ar acetonas.

Tyrimas parodė, kad neskiesti tirpikliai buvo mažiausiai efektyvūs ir statistiškai patikimai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo skiestų: mažiausios FJ kiekio bruknės lapuose vertės nustatytos ekstrahuojant neskiestu acetonu, metanoliumi ir etanoliumi (atitinkamai $4,5 \pm 0,2$ %, $10 \pm 0,8$ % ir $11 \pm 0,3$ %). Ypač neefektyvus buvo neskiestas acetonas, kuriuo iš bruknės lapų išekstrahuotas FJ kiekis buvo 2,2 ir 2,4 kartus mažesnis ir statistiškai reikšmingai skyrėsi atitinkamai nuo neskiesto metanolio ir etanolio.



22 pav. Vidutinis fenolinių junginių kiekis bruknės lapuose, ekstrahuojant skirtingais įvairių koncentracijų tirpikliais (TR – tanino rūgštis; skirtingos ir tos pačios mažosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus fenolinių junginių kiekių skirtumus, ekstrahuojant to pačio tirpiklio skirtingų koncentracijų tirpalais; skirtingos ir tos pačios didžiosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus fenolinių junginių kiekių skirtumus, ekstrahuojant tos pačios koncentracijos skirtingais tirpikliais)

I. Račkauskienė ir kiti bendraautoriai (2019) tyrė bendrą FJ kiekį *V. vitis-idaea* lapuose, surinktuose šiaurinėje Lietuvos dalyje ir ekstrakcijai naudodami įvairius tirpiklius ir jų koncentracijas. Naudojant neskiestą metanolį, didžiausias bendras FJ kiekis buvo lygus $91,2 \pm 1,3$ mg GRE/g ir statistiškai patikimai skyrėsi nuo FJ kiekio, išekstrahuoto neskiestu acetonu, ($57,42 \pm 1,19$ mg GRE/g) (187). Mūsų atliktame tyrime FJ kiekio vertės, gautos pietinėje Lietuvos dalyje augusių bruknių lapų ekstrakcijai panaudojus neskiestą metanolį ir acetoną, taip pat statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi ir buvo lygios atitinkamai $100,2 \pm 4,5$ mg TRE/g ir $45,0 \pm 1,6$ mg TRE/g (22 pav.). Taip pat aukščiau minėtame literatūros šaltinyje nurodoma, kad vandeniui, kuris yra polinis tirpiklis, ekstrahuojant bruknių lapus, iš jų buvo išskirtas nemažas FJ kiekis – $83,12 \pm 1,45$ mg GRE/g (187). Tai gali paaiškinti, kodėl, praskiedus organinius tirpiklius vandeniui, FJ ekstrakcija iš bruknės lapų buvo daug efektyvesnė (22 pav.). Kitame tyrime, naudojant ekstrakciją mikrobangomis bei neskiestą metanolį, iš Rumunijoje augusių bruknių lapų išekstrahuotas bendras FJ kiekis, priklausomai nuo žaliavos rinkimo metų (bruknių lapų žaliava rinkta 2013–2014 metais, gegužės mėnesį), varijavo nuo $85,3 \pm 0,8$ mg GRE/g iki $96,8 \pm 4,1$ mg GRE/g (120) ir buvo panašus mūsų tyrimo metu išskirtam FJ kiekiui ($100,2 \pm 4,5$ mg TRE/g), ekstrakcijai taip pat panaudojus neskiestą metanolį (22 pav.).

A. Nasr ir bendraautoriai (2019) tyrė skirtingų organinių tirpiklių įtaką *Eucalyptus camaldulensis* augalo lapų ekstrakcijos procesui (79). Taikant maceraciją bei keturių organinių tirpiklių – etanolio, metanolio, acetono ir etilacetato – trijų skirtingų koncentracijų (95 %, 70 % ir 30 %, skiedžiant su distiliuotu vandeniui) tirpalus, nustatė, kad didžiausią FJ kiekį – 46,56 mg/g sausos masės – galima išekstrahuoti su 70 % acetonu. Bendrai buvo pastebėta, jog acetonas, priešingai nei mūsų tirtų bruknių lapams, buvo tinkamesnis FJ iš *E. camaldulensis* ekstrahuoti.

Pastebėta, jog skirtingų tirpiklių poveikis, išskiriant FJ tiek iš bruknės, tiek iš miltinės meškauogės lapų, buvo labai panašus: daugiausia FJ buvo išekstrahuota su 50 % etanoliu, mažiausia – su neskiestu acetonu (18 ir 22 pav.). Tai rodo, kad abiejų rūšių augalų lapuose galimai susikaupia panašūs FJ, pasižymintys panašiomis tirpumo skirtingų tirpiklių ir jų koncentracijų tirpaluose savybėmis.

3.4.2. Taninų kiekio palyginimas bruknės lapuose, ekstrakcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas

Gauti rezultatai parodė, jog didžiausias taninų kiekis bruknės lapuose nustatytas ekstrakcijai naudojant 50 % metanolį – $12,7 \pm 0,6$ %, kas sudarė 89 % bendro FJ kiekio šių augalų lapuose, ekstrahuotuose taip pat 50 % metanolium (22 ir 23 pav.). Nuo šio rezultato nedaug skyrėsi ir taninų kiekis, išekstrahuotas 50 % acetonu – $12 \pm 1,2$ %, kas sudarė 88 % bendro FJ kiekio šių augalų lapuose, ekstrahuotuose 50 % acetonu. Labai panašus taninų kiekis išekstrahuotas ir su tokios pačios koncentracijos etanolium – $11,6 \pm 2,6$ %, tačiau šiuo atveju taninų kiekis sudarė tik 71 % bendro FJ kiekio bruknės lapuose, juos ekstrahuojant taip pat su 50 % etanolium. Atlikti ekstrahavimai su 70 % etanolium ir visai neskiestu etanolium parodė dar mažesnes taninų kiekio vertes bendrame FJ kiekyje (atitinkamai 67 % ir 60 %) (22 ir 23 pav.). Nors taninų kiekis ekstrahuojant 70 % acetonu statistiškai patikimai nesiskyrė nuo taninų kiekio ekstrahuojant 50 % acetonu, taninų kiekis išekstrahuotas su mažiau skiestu acetonu buvo perpus mažesnis ($6,4 \pm 1,4$ %). Panaši situacija matyti ir lyginant taninų kiekius, išekstrahuotus su 70 % ir neskiestu acetonu: nors statistiškai patikimai taninų kiekiai nesiskyrė, tačiau net trigubai daugiau jų išsieksrahavo su 70 % acetonu (23 pav.). Tai rodo, kad naudojant didesnės koncentracijos acetoną iš bruknės lapų išsieksrahuoja mažiau taninų.

Iš bruknių lapų ekstrahuojant taninus metanolium ir etanolium, gauta panašių rezultatų įvairiose koncentracijose. Statistinė analizė parodė, kad taninų kiekiai, gauti ekstrahuojant abiem tirpikliais vienodomis koncentracijomis, statistiškai nesiskyrė vienas nuo kito.

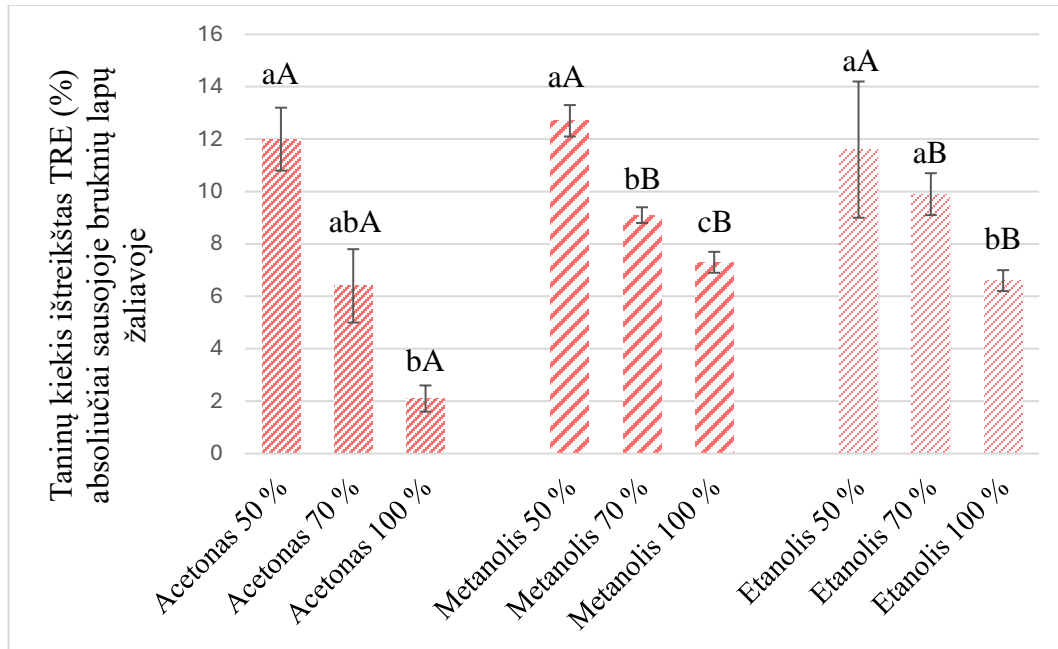
Taninų ekstrakcijoje iš bruknės lapų, naudojant įvairių koncentracijų metanolį ir etanolį, buvo gauti panašūs rezultatai. Statistinė analizė parodė, kad taninų kiekiai, ekstrahuojant su šiais dvejais tirpikliais, reikšmingai nesiskyrė esant vienodomis jų koncentracijoms: tarpusavyje nesiskyrė taninų kiekiai bruknės lapus ekstrahavus 50 % metanolium ir 50 % etanolium, kaip ir nesiskyrė taninų kiekiai bruknės lapų ekstrakcijoje panaudojus 70 % metanolį ir 70 % etanolį, taip pat ir lyginant išekstrahuotą taninų kiekį bruknės lapų ekstrakcijoje neskiestu metanolium ir etanolium. (23 pav.). Pastebėta, kad ekstrahuojant bruknės lapus metanolium, taninai sudarė didesnę procentinę dalį viso FJ kiekio: su 50 % metanolium sudarė 89 %, su 70 % metanolium – 75 %, su neskiestu metanolium – 73 % bendro FJ kiekio, taip pat ekstrahuoto metanolium. Palyginimui, bruknės lapus ekstrahavus etanolium, nustatyta taninų dalis bendrame FJ kiekyje buvo mažesnė (atitinkamai 18 %, 8 % ir 13

%), o tai rodo skirtingą tirpiklių poveikį taninų ekstrakcijos iš bruknės lapų efektyvumui (22 ir 23 pav.).

Taninų kiekiai, išekstrahuoti visomis trejomis metanolio koncentracijomis, statistiškai patikimai ($p < 0,05$) skyrėsi ir varijavo ribose tarp $7,3 \pm 0,4$ % ir $12,7 \pm 0,6$ %.

Mažiausia taninų, išekstrahuotų iš bruknės lapų, kiekio vertė nustatyta, kai ekstrakcijai buvo naudotas neskiestas acetonas ($2,1 \pm 0,5$ %), o tai yra 3 ir 3,5 karto mažiau nei taninų kiekiai, išekstrahuoti atitinkamai neskiestu etanoliumi ir metanoliumi. Šis skirtumas rodo tirpiklio poliškumo įtaką taninų ekstrakcijos iš bruknės lapų veiksmingumui, nes su tokiais poliniais tirpikliais kaip metanolis ir etanolis, dėl didesnio jų tirpumo, kurį lemia hidroksilo grupės, galima išgauti didesnius taninų kiekius iš tiriamos žaliavos.

Apibendrinant, ekstrakcijos tirpiklio pasirinkimas gali turėti didelės įtakos iš bruknės lapų ekstrahuotų taninų išeigai. Su 50 % metanoliumi buvo išekstrahuotas didžiausias taninų kiekis, o mažiausiai efektyvus taninų išskyrimui iš bruknės lapų buvo neskiestas acetonas, kuriuo išekstrahuotas taninų kiekis patikimai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo taninų kiekio, išekstrahuoto neskiestu metanoliumi ir etanoliumi (23 pav).



23 pav. Vidutiniai taninų kiekiai bruknės lapuose, ekstrahuojant skirtingais įvairių koncentracijų tirpikliais (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas; skirtingos ir tos pačios mažosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus taninų kiekių skirtumus, ekstrahuojant to pačio tirpiklio skirtingų koncentracijų tirpalais; skirtingos ir tos pačios didžiosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus taninų kiekių skirtumus, ekstrahuojant tos pačios koncentracijos skirtingais tirpikliais)

Kanadoje (Newfoundland), P. Vyas, S. Kalidindi, L. Chibrikova ir kiti bendraautoriai (2013), ekstrakcijai naudodami 80 % acetoną, nustatė, kad bendras taninų kiekis bruknės lapuose yra gerokai didesnis nei mėlynės lapuose: bendras taninų kiekis bruknės lapuose buvo maždaug 55 mg KE/g, ir statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo taninų kiekio, nustatyto mėlynės lapuose (35 mg KE/g); be to taninai bruknių lapuose sudarė 63 %, o mėlynės lapuose – 59 % bendro FJ kiekio (100). Kaip nurodo šio tyrimo autoriai, 80 % acetonas, jų nuomone, yra efektyviausias taninų išskyrimui, lyginant su etanoliumi ir metanoliumi. Mūsų tyrime, taip pat, ekstrahuojant 70 % acetonu, bruknės ir mėlynės lapuose nustatytos artimos taninų kiekio reikšmės: bruknės lapuose jos buvo lygios $64,9 \pm 13,9$ mg TRE/g., mėlynės lapuose beveik dvigubai mažiau – $34,5 \pm 2,9$ mg TRE/g. Tačiau taninų kiekis bruknės lapuose ir mėlynės lapuose sudarė atitinkamai tik 45 % ir 38,5

% bendro FJ kiekio, t. y. mažiau lyginant su reikšmėmis, pateiktomis aukščiau minėtame literatūros šaltinyje.

Lyginant mūsų tyrime gautus taninų kiekius miltinės meškauogės ir bruknės lapuose matyti, kad, ekstrahuojant tais pačiais tų pačių koncentracijų tirpikliais, didesnis taninų kiekis išekstrahuotas iš miltinės meškauogės lapų (19 ir 23 pav.). Pavyzdžiui, ekstrahuojant 50 % acetonu, 50 % metanoliu ir 50 % etanoliu miltinės meškauogės lapuose taninų nustatyta atitinkamai 2,2 ir 3 kartus daugiau nei bruknės lapuose.

Skirtingų rūšių augalų lapuose, naudojant tuos pačius tirpiklius, išekstrahuotame bendrame FJ kiekyje taninų procentinės dalys buvo skirtingos. Pavyzdžiui, didžiausias taninų kiekis bruknės lapuose nustatytas juos ekstrahuojant 50 % metanoliu, kas sudarė 89 % bendro FJ kiekio, o miltinės meškauogės lapus ekstrahavus 50 % metanoliu, nustatytas taninų kiekis sudarė kiek mažiau – 79 % bendro FJ kiekio. Tačiau didžiausias taninų kiekis miltinės meškauogės lapuose nustatytas ekstrakcijos metu panaudojus 50 % etanolį, ir jis sudarė 86 % bendro FJ kiekio, kuomet iš bruknės lapų, juos ekstrahavus 50 % etanoliu, išskirtas taninų kiekis sudarė tik 71 % bendro FJ kiekio. Kadangi kiekvienai augalų rūšiai būdingas skirtingas sukaupiamų cheminių junginių spektras, tirpiklio parinkimas kiekvienos rūšies augalams, turi didelę įtaką taninų ekstrakcijos efektyvumui. Pavyzdžiui, bruknės lapų ekstrakcijos su skirtingų metanolio koncentracijų tirpalais metu taninų kiekiai varijavo 7,3 – 12,7 % ribose, visi jie statistiškai patikimai ($p < 0,05$) tarpusavyje skyrėsi, o (mažiausia taninų kiekio vertė nustatyta ekstrahuojant neskiestu metanoliu (19 ir 23 pav.). Priešingai, ekstrahavus su neskiestu metanoliu, miltinės meškauogės lapuose buvo nustatytas didžiausias taninų kiekis ($28,9 \pm 0,6$ %) lyginant su kiekiais, kurie nustatyti naudojant vandeniui skiestus metanolio tirpalus, o ir pačios taninų kiekio vertės viena nuo kitos labai nedaug skyrėsi ir varijavo tarp $27,5 \pm 1,3$ % ir $28,9 \pm 0,6$ %, nors taninų kiekis, išekstrahuotas su neskiestu metanoliu, statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo kiekų, išekstrahuotų su skiestais metanolio tirpalais (19 ir 23 pav.).

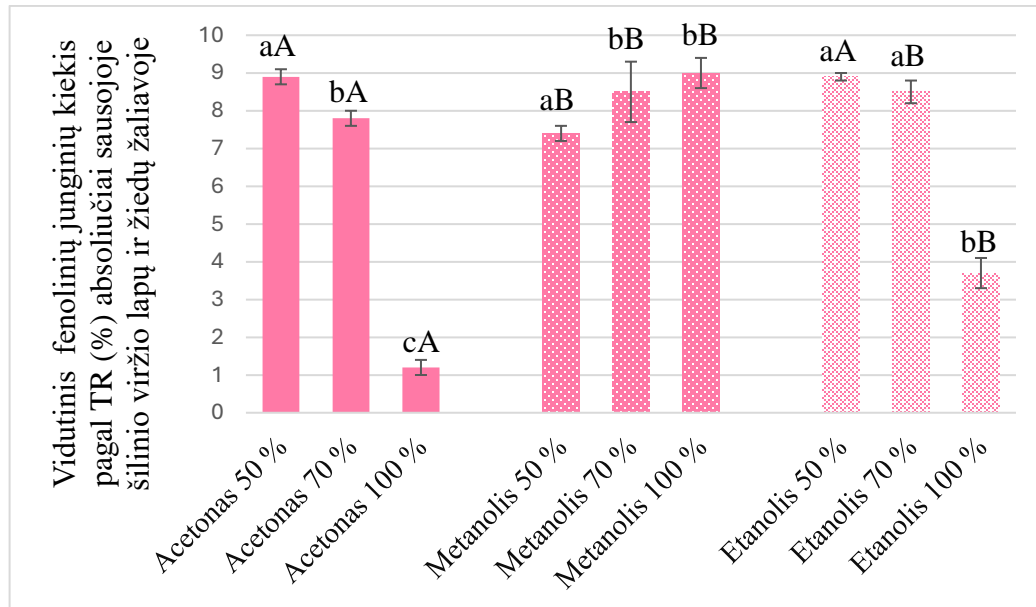
3.5. Bendro fenolinių junginių ir taninų kiekio palyginimas šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje

3.5.1. Fenolinių junginių kiekio palyginimas šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje, ekstrakcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas

Iš 24 paveiksle pateiktos stulpelinės diagramos matyti, kad didžiausias bendras FJ kiekis šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje buvo nustatytas jį ekstrahuojant 100 % metanolio ($9,0 \pm 0,4$ %). Labai nedaug skyrėsi ir kitos dvi FJ kiekio reikšmės ekstrahavus šilinio viržio lapų ir žiedų mišinį 50 % acetonu ir 50 % etanolio – atitinkamai $8,9 \pm 0,2$ % ir $8,9 \pm 0,1$ %. Priklausomai nuo ekstrakcijos metu naudoto tirpiklio, iš šilinio viržio žaliavos išsiskyrė skirtingi kiekiai FJ. Pavyzdžiui, veiksmingiausia iš visų trijų acetono koncentracijų buvo ekstrakcija su labiausiai praskiestu acetonu, kurio metu išekstrahuotas FJ kiekis statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo FJ kiekių, išekstrahuotų kitų 70 % ir 100 % acetonu (atitinkamai 1,1 % ir 7,7 %). Nustatėme, jog skiesti etanoliai buvo efektyvesni ir jais ekstrahuojant šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje nustatyti FJ kiekiai ($8,9 \pm 0,1$ % ir $8,5 \pm 0,3$ %) statiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo FJ kiekio, išekstrahuoto nustatyto su neskiestu etanolio ($3,7 \pm 0,4$ %).

FJ kiekiui iš šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio ekstrakcijai naudojant skirtingų koncentracijų metanolinius tirpalus, visos gautos FJ kiekio reikšmės varijavo siaurose ribose – nuo $7,4 \pm 0,2$ % iki $9,0 \pm 0,4$ %. Atliktas Kruskal-Wallis testas parodė, jog, ekstrahuojant šilinio viržio lapų ir žiedų mišinį 50 % metanolio, išskirtas FJ kiekis statistiškai patikimai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo FJ kiekių, išskirtų ekstrahavus 50 % etanolio ar 50 % acetonu. Taip pat nustatyta, kad, skirtingai nei ekstrahuojant acetonu ir etanolio, šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio ekstrakcijoje metanolis išsiskyrė kitokia tendencija: mažiausias FJ kiekis tirtoje žaliavoje nustatytas ekstrakcijai naudojant 50 % metanolį, ir šis kiekis statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo FJ kiekių, išekstrahuotų 70 % ir 100 % metanolio, o didžiausias FJ kiekis šilinio viržio žaliavoje buvo nustatytas ją ekstrahuojant neskiestu metanolio – $9,0 \pm 0,4$ % arba $90,3 \pm 3,2$ mg TRE/g. Tuo tarpu ekstrakcijai panaudojus acetoną ir etanolį, didžiausi FJ kiekiai išekstrahuoti su šių tirpiklių 50 % koncentracijų tirpalais, o didinant tirpiklių koncentracijas, mažėjo išskirtų FJ kiekiai, ir su neskiestu acetonu bei neskiestu etanolio buvo išekstrahuoti mažiausi FJ kiekiai.

Tyrimas parodė, kad neskiestas acetonas ir etanolis yra mažai efektyvūs: jais išekstrahuoti mažiausi FJ kiekiai (atitinkamai $1,2 \pm 0,2$ % ir $3,7 \pm 0,4$ %), kurie statistiškai patikimai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo FJ kiekių, išekstrahuotų su jų mažesnių koncentracijų tirpalais.



24 pav. Vidutinis fenolinių junginių kiekis šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje, ekstrahuojant skirtingais įvairių koncentracijų tirpikliais (TR – tanino rūgštis; skirtingos ir tos pačios mažosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus fenolinių junginių kiekių skirtumus, ekstrahuojant to pačio tirpiklio skirtingų koncentracijų tirpalais; skirtingos ir tos pačios didžiosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus fenolinių junginių kiekių skirtumus, ekstrahuojant tos pačios koncentracijos skirtingais tirpikliais)

E. Varga, E. Becsek ir kiti bendraautoriai (2021), naudodami Folin-Ciocalteu reagentą, ekstrahavimą ultragarsu ir skirtingus tirpiklius (100 % metanolį, 50 % metanolį, 70 % etanolį ir vandenį), didžiausią FJ kiekį iš Rumunijoje žydėjimo metu surinktos *C. vulgaris* antžeminės dalies išekstrahavo su neskiestu metanolium – $1101,00 \pm 175$ mg GRE/g (203). Mūsų tyrime su neskiestu metanolium taip pat buvo išekstrahuota daugiausia FJ, tik Lietuvoje augusiuose šiliniuose viržiuose jų kiekis buvo nustatytas 12 kartų mažesnis, nei augusių Rumunijoje. Buvo pastebėta, kad vanduo, kuris laikomas visiškai poliniu tirpikliu, buvo palyginus labai neefektyvus šilinio viržio antžeminės dalies ekstrahavime: vandeniu išekstrahuotas FJ kiekis buvo 8 kartus mažesnis nei išekstrahuotas

su neskiestu metanolium (203). FJ kiekis, išekstrahuotas iš Rumunijoje augusio šilinio viržio antžeminės dalies su 70 % etanolium, siekė $870,00 \pm 69$ mg GRE/g ir buvo maždaug 1,3 karto mažesnis už didžiausią FJ kiekį, išekstrahuotą neskiestu metanolium (203). Mūsų tyrime buvo labai panašiai: FJ kiekis, išekstrahuotas iš šilinio viržio žaliavos su 70 % etanolium, buvo 1,1 karto mažesnis nei FJ kiekis, gautas ekstrakcijai panaudojus neskiestą metanolį (24 pav.).

F. Rodrigues su bendraautorais (2018), naudodami maceraciją ir dvi skirtingas etanolio koncentracijas, nustatė, kad Portugalijoje augusio šilinio viržio žieduose bendras FJ kiekis, išekstrahuotas su 100 % etanolium ($53,96 \pm 5,4$ mg GRE/g) statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo FJ kiekio, išekstrahuoto su 50 % etanolium ($121,92 \pm 0,8$ mg GRE/g) (204). Didžiausias FJ kiekis, ekstrakcijai naudojant perpus vandeniu skiestą etanolį rodo, kad toks vandens ir alkoholio derinys gali padidinti ekstrakcijos efektyvumą, sudarydamas palankias sąlygas FJ tirpimui. Mūsų gauti rezultatai taip pat parodė, jog FJ ekstrakcija iš šilinio viržio žaliavos buvo efektyvesnė su skiestu etanolium ir suminis šių junginių kiekis ($89,3 \pm 0,7$ mg TRE/g) statistiškai patikimai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo 2,4 karto mažesnio FJ kiekio ($36,5 \pm 3,4$ mg TRE/g), gauto ekstrakcijai panaudojus neskiestą etanolį (24 pav.). Taip pat Portugalijos tyrėjai nustatė, jog ekstrahuojant vandeniu, FJ ekstrakcija iš šilinio viržio žaliavos buvo efektyvesnė ir nustatytas bendras FJ kiekis joje buvo atitinkamai didesnis – $75,43 \pm 7,4$ mg GRE/g, lyginant su FJ kiekiu, išekstrahuotu su 100 % etanolium (204). Rezultatai rodo, kad šilinius viržius ekstrahuojant vandeniu, gaunamas didesnis bendras FJ kiekis nei ekstrahuojant su neskiestu etanolium, nes vanduo, kaip polinis tirpiklis, gali efektyviai ekstrahuoti FJ, kurie dažnai yra polinės arba iš dalies polinės molekulės. O etanolio buvimas tirpiklyje gali pakeisti tirpiklio poliškumą, o tai turi įtakos FJ tirpimui ir ekstrakcijos efektyvumui.

V. Chepel su bendraautorais (2020), FJ iš šilinio viržio ekstrakcijai naudodami 70 % etanolį, nustatė, jog šilinio viržio, augančio Kuršių nerijos nacionalinio parko (Kaliningrado sritis, Rusija) ribose esančioje aukštapelkėje, lapuose žydėjimo metu susikaupia $26,88 \pm 0,11$ mg GRE/g FJ, o žieduose – $27,88 \pm 0,18$ mg GRE/g (168). Mūsų tirtame pietryčių Lietuvoje augusio šilinio viržio žydėjimo metu surinktame lapų ir žiedų mišinyje nustatytas FJ kiekis buvo didesnis ir siekė $84,6 \pm 1,4$ mg TRE/g (24 pav.).

R. Teterovska ir kt. (2023), taikydami maceraciją ir du skirtingus tirpiklius – 50 % acetoną ir 50 % etanolį, Latvijoje žydėjimo metu surinktame *C. vulgaris* lapų ir žiedų mišinyje nustatė bendrą

FJ kiekį, lygų atitinkamai $285,61 \pm 5,41$ mg GRE/g ir $294,88 \pm 14,20$ mg GRE/g (169). Mūsų tyrime nustatytos FJ kiekio vertės šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje, jį ekstrahuojant 50 % acetonu ir 50 % etanoliu, buvo 3 kartus mažesnės (atitinkamai $89,2 \pm 0,6$ mg TRE/g ir $89,3 \pm 0,7$ mg TRE/g) (24 pav.).

Lyginant mūsų tyrime gautus FJ kiekius miltinės meškauogės lapuose ir šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje, matyti, kad, ekstrahuojant tais pačiais tų pačių koncentracijų tirpikliais, didesnis FJ kiekis išekstrahuotas iš miltinės meškauogės lapų (18 ir 24 pav.) Pavyzdžiui, ekstrahuojant 50 % acetonu, 50 % metanoliu ir 50 % etanoliu, miltinės meškauogės lapuose FJ nustatyta atitinkamai 4, 5 ir 5 kartus daugiau nei šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje. Pastebėtina, kad metanolis iš kitų tirpiklių išsiskyrė kiek kitokiu veikimu: miltinės meškauogės lapų ekstrakcijoje efektyviausias buvo labiausiai praskiestas metanolis, tuo tarpu šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio ekstrakcijoje didžiausias FJ kiekis nustatytas ekstrahuojant neskiestu metanoliu. Mažiausi FJ kiekiai ir iš miltinės meškauogės lapų, ir iš šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio išekstrahuoti su neskiestu acetonu ir neskiestu etanoliu (18 ir 24 pav.).

Lyginant mūsų tyrime gautus FJ kiekius mėlynės lapuose ir šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje, pastebėta, jog nors ir gauti rezultatai skaitine verte labai panašūs (1 % skirtumas), ekstrahuojant FJ iš mėlynės ir šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio efektyviausi buvo skirtingi tirpikliai: iš mėlynės lapų daugiausia FJ buvo išekstrahuota su 50 % acetonu, o iš šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio – su 100 % metanoliu (20 ir 24 pav.). Efektyviausias tirpiklis bruknės lapų ekstrakcijoje buvo 50 % etanolis ir didžiausias FJ kiekis išekstrahuotas iš bruknės lapų buvo beveik 2 kart didesnis nei didžiausias FJ kiekis, išekstrahuotas iš šilinio viržio (22 ir 24 pav.).

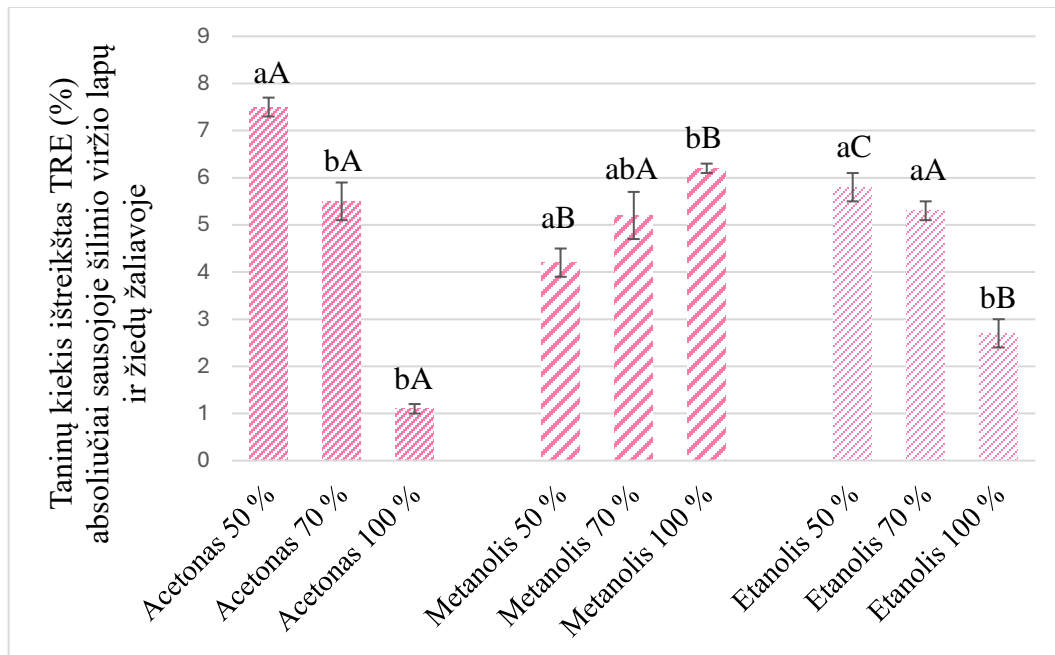
Mažiausiai efektyvus tirpiklis FJ išskyrimui tiek iš šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio, tiek iš mėlynės lapų, tiek iš bruknės lapų buvo neskiestas acetonas. Ekstrakcijai panaudojus 100 % acetoną, šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje nustatytas bendras FJ kiekis buvo 1,5 karto didesnis, nei FJ kiekis nustatytas mėlynės lapuose, o bruknės lapuose neskiestu acetonu išekstrahuota beveik 4 kartus daugiau FJ nei iš šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio, naudojant tą patį tirpiklį (20, 22 ir 24 pav.).

3.5.2. Taninų kiekio palyginimas šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje, ekstrakcijai naudojant skirtingus tirpiklius bei skirtingas jų koncentracijas

Iš 25 paveiksle pateiktų taninų vidutinių kiekių šilinio viržio lapų bei žiedų mišinyje, ekstrahuojant skirtingais įvairių koncentracijų tirpikliais, matyti, jog didžiausias taninų kiekis išekstrahuotas naudojant 50 % acetoną – $7,5 \pm 0,2$ %, kas sudarė 84 % viso FJ kiekio šių augalų lapų ir žiedų mišinyje, taip pat ekstrahuotame 50 % acetonu (24 ir 25 pav.). Tuo tarpu su 50 % etanolio ir 50 % metanolio tirpikliais iš šilinio viržio žaliavos buvo išskirta reikšmingai ($p < 0,05$) mažiau taninų – atitinkamai $5,8 \pm 0,3$ % ir $4,2 \pm 0,3$ %, kas sudarė 65 % ir 57 % bendro FJ kiekio, išekstrahuoto su minėtų koncentracijų etanolio ir metanolio tirpikliais. Kaip ir FJ kiekio tyrime (24 pav.), panašūs rezultatai gauti ir tiriant taninų kiekius: taninų ekstrakcijoje iš šilinio viržio žaliavos efektyviausias iš metanolinių tirpiklių buvo neskiestas metanolis, su kuriuo išekstrahuotas didžiausias taninų kiekis – $6,2 \pm 0,1$ %, nors tai sudarė tik 69 % viso FJ kiekio, taip pat išekstrahuoto su 100 % metanoliumi. Taip pat nedidelę bendro FJ kiekio dalį (61 %) taninai sudarė ir kuomet šilinis viržis buvo ekstrahuotas 70 % metanoliumi, o tai rodo, jog metanolis yra mažiau efektyvus taninų išskyrimui iš šilinio viržio lapų ir žiedų žaliavos. Skirtingi tirpikliai pasižymi skirtingu giminingumu tam tikrų rūšių FJ. Tuom būtų galima paaiškinti, kodėl, pavyzdžiui, mažiausias taninų kiekis iš šilinio viržio žaliavos buvo ekstrahuojant neskiestu acetonu ($1,1 \pm 0,1$ %), bet tai sudarė 92 % viso FJ kiekio, o ekstrahuojant neskiestu etanoliumi taninų buvo išekstrahuota dvigubai daugiau ($2,7 \pm 0,3$ %), bet jie sudarė tik 73 % bendro FJ kiekio.

Pastebėta, jog šilinio viržio žaliavą ekstrahuojant su visų trijų tirpiklių 50 % tirpalais, nustatyti taninų kiekiai tarpusavyje statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi. Tuo tarpu šilinio viržio žaliavą ekstrahuojant su visų trijų tirpiklių 70 % tirpalais, statistiškai reikšmingi skirtumai tarp išekstrahuotų taninų kiekių nenustatyti, ir taninų vertės varijavo labai siaurose ribose – nuo $5,2 \pm 0,5$ % (ekstrahuojant 70 % metanoliumi) iki $5,5 \pm 0,4$ % (ekstrahuojant 70 % acetonu).

Šilinio viržio lapų ir žiedų mišinį ekstrahuojant tais pačiais 70 % tirpikliais, taninų dalys bendrame FJ kiekyje nustatytos labai artimos ir varijavo ribose tarp 62 % (ekstrahuojant 70 % etanoliumi ir 70 % metanoliumi) iki 65 % (ekstrahuojant 70 % acetonu).



25 pav. Vidutiniai taninų kiekiai šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje, ekstrahuojant skirtingais įvairių koncentracijų tirpikliais (TRE – tanino rūgšties ekvivalentas; skirtingos ir tos pačios mažosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus taninų kiekių skirtumus, ekstrahuojant to pačio tirpiklio skirtingų koncentracijų tirpalais; skirtingos ir tos pačios didžiosios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) ir nereikšmingus taninų kiekių skirtumus, ekstrahuojant tos pačios koncentracijos skirtingais tirpikliais)

V. Chepel su bendraautoriais (2020), ekstrahavimui naudodami 70 % etanolį nustatė, jog šilinio viržio lapuose, surinktuose žydėjimo metu Kaliningrado srityje (Rusija) esančioje aukštapelkėje, susikaupia $15,79 \pm 0,11$ mg GRE/g taninų, kurie sudaro 59 % bendro FJ kiekio, o žieduose susikaupia $16,78 \pm 0,12$ mg GRE/g taninų, kurie bendrame FJ kiekyje sudaro beveik tą pačią dalį – 60 % (168). Mūsų tyrime pietryčių Lietuvoje iš žydėjimo metu surinkto šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio su 70 % etanolio buvo išekstrahuotas didesnis taninų kiekis – $52,8 \pm 1,6$ mg TRE/g, kas sudarė 62 % bendro FJ kiekio (24 ir 25 pav.).

Naudojant Europos farmakopėjos 8-ajame leidime aprašytą taninų kiekio nustatymo metodą, kurio metu ekstrahavimui naudojami acetono ir etanolio 50 % tirpalai, Latvijoje surinkto šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje nustatytas bendras vidutinis taninų kiekis buvo lygus $2,45 \pm 0,17$ % (169).

Mūsų tyrime ekstrahuojant šilinio viržio lapų ir žiedų mišinį 50 % acetonu ir 50 % etanoliu gautas taninų kiekis buvo didesnis (atitinkamai $7,5 \pm 0,2$ % ir $5,8 \pm 0,3$ %) (25 pav.).

Pastebėta, jog skirtingų tirpiklių įtaka, išskiriant taninus tiek iš šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio, tiek iš miltinės meškauogės lapų, buvo labai panaši: tarp ekstrakcijai naudotų acetoninių ir etanolinių tirpalų, daugiausia taninų buvo išekstrahuota su labiausiai paskiestais, t. y. 50 % acetono ir etanolio tirpalais, tuo tarpu iš metanolinių tirpiklių abiejose tirtų augalų rūšių ekstrakcijose labiausiai efektyvus buvo neskiestas metanolis. Mažiausiai efektyvūs taninų išekstrahavimui iš šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio ir miltinės meškauogės lapų buvo – neskiestas acetonas ir neskiestas etanolis (19 ir 25 pav.). Tai rodo, kad abiejų rūšių augalų lapuose galimai susikaupia panašūs taninai, pasižymintys panašiomis tirpumo skirtingų tirpiklių ir jų koncentracijų tirpaluose savybėmis.

Pastebėta, jog skirtingų koncentracijų tirpiklių įtaka, išskiriant taninus tiek iš šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio, tiek iš mėlynės lapų, buvo labai panaši: tarp ekstrakcijai naudotų acetoninių tirpalų, daugiausia taninų buvo išekstrahuota su labiausiai praskiestu, t. y. 50 % acetono tirpalu, o mažiausia taninų išekstrahuota su neskiestu acetonu (21 ir 25 pav.). Tuo tarpu taninų išskyrimui iš bruknės lapų efektyviausias buvo ekstrakcijoje naudotas 50 % metanolis, o mažiausias taninų kiekis nustatytas ekstrahuojant neskiestu acetonu (23 pav). Įdomu tai, jog ekstrahuojant neskiestu acetonu iš bruknės lapų išekstrahuotas taninų kiekis buvo tik 1 % didesnis, nei išekstrahuotas taninų kiekis iš šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio neskiestu acetonu; taninai šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje bei bruknės lapuose atitinkamai sudarė 92 % ir 47 % bendro FJ kiekio (23 ir 25 pav.). Tai rodo, kad neskiestas acetonas taninų išskyrimui iš šilinio viržio augalinės žaliavos yra tinkamesnis negu iš bruknės lapų. Bet bendrai paėmus jis yra pats neefektyviausias tirpiklis FJ ir taninų išskyrimui iš visų tyrime tirtų augalų.

4. IŠVADOS

1. Nepriklausomai nuo ekstrakcijai naudotų tirpiklių ir jų koncentracijų, didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis nustatytas miltinės meškauogės lapuose ($32,4 \pm 8,2$ %), kuris buvo 5 kartus didesnis nei mėlynės lapuose ($6,6 \pm 3,3$ %) bei šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje ($7,1 \pm 2,8$ %) ir 3 kartus didesnis nei bruknės lapuose ($12,3 \pm 3,5$ %). Didžiausias suminis taninų kiekis taip pat nustatytas miltinės meškauogės lapuose, kur jis sudarė 82 % bendro fenolinių junginių kiekio. Taninų mėlynės lapuose nustatyta 10, bruknės lapuose 3 bei šilinio viržio lapų ir žiedų mišinyje 5,5 karto mažiau nei miltinės meškauogės lapuose (atitinkamai $2,7 \pm 1,6$ %, $8,6 \pm 3,4$ %, $4,8 \pm 1,9$ % ir $26,6 \pm 7,2$ %).
2. Didžiausias suminis fenolinių junginių ir taninų kiekis iš miltinės meškauogės lapų išekstrahuotas su 50 % etanoliumi (šių junginių buvo nustatyta atitinkamai $42,9 \pm 3,7$ % ir $37,0 \pm 3,0$ %) ir 70 % etanoliumi (atitinkamai $40,7 \pm 3,4$ % ir $34,4 \pm 1,6$ %); tiek fenolinių junginių, tiek taninų kiekiai, išekstrahuoti su šių koncentracijų etanoliais, tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė. Neskiestas acetonas buvo mažiausiai efektyvus iš miltinės meškauogės lapų ekstrahuojant tiek fenolinius junginius, tiek taninus.
3. Nors didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis ($16,4 \pm 3,1$ %) bruknės lapuose nustatytas ekstrahuojant su 50 % etanoliumi, jis reikšmingai nesiskyrė nuo kiekių, išekstrahuotų su 50 % acetonu ir 50 % metanoliumi (atitinkamai $13,7 \pm 1,6$ % ir $14,3 \pm 0,9$ %). Tuo tarpu didžiausias taninų kiekis ($12,7 \pm 0,6$ %) bruknės lapuose nustatytas ekstrahuojant su 50 % metanoliumi, tačiau jis taip pat reikšmingai nesiskyrė nuo taninų kiekių, gautų ekstrahuojant su 50 % acetonu ir 50 % etanoliumi (atitinkamai $12,0 \pm 1,2$ % ir $11,6 \pm 2,6$ %). Mažiausiai fenolinių junginių ir taninų (atitinkamai $4,5 \pm 0,2$ % ir $2,1 \pm 0,5$ %) iš bruknės lapų išekstrahuota su neskiestu acetonu.
4. Neskiestas metanolis, 50 % etanolis ir 50 % acetonas buvo labiausiai efektyvūs ekstrahuojant fenolinius junginius iš šilinio viržio žaliavos (fenolinių junginių nustatyta atitinkamai $9,0 \pm 0,4$ %, $8,9 \pm 0,1$ % ir $8,9 \pm 0,2$ %). Tačiau taninų iš šilinio viržio lapų ir žiedų mišinio daugiausia išekstrahuota tik su 50 % acetonu (taninų nustatyta $7,5 \pm 0,2$ %). Iš šilinio viržio žaliavos ekstrahuojant fenolinius junginius ir taninus mažiausiai efektyvus buvo neskiestas acetonas.
5. Fenolinius junginius iš mėlynės lapų efektyviausiai ekstrahavo tiek 50 % ir 70 % acetonas (šių junginių kiekis buvo atitinkamai $10,2 \pm 0,4$ % ir $9,1 \pm 0,3$ %), tiek 50 % ir 70 % etanolis

(fenolinių junginių atitinkamai $9,4\pm 0,4$ % ir $8,7\pm 0,4$ %), nes skirtumai tarp jais išekstrahuotų fenolinių junginių kiekių buvo nereikšmingi. Daugiausia taninų iš mėlynės lapų išekstrahuota su 50 % acetonu. Mažiausiai efektyvūs fenolinių junginių ir taninų ekstrahavimui iš mėlynės lapų buvo neskiesti tirpikliai.

5. REKOMENDACIJOS

Remiantis tyrimo rezultatais, fenolinių junginių ir taninų išskyrimui iš tirtų augalinių žaliavų labiausiai rekomenduotina naudoti 50 % etanolio, metanolio ir acetono tirpalus. Tačiau svarbu atsižvelgti, iš kokios konkrečios augalinės žaliavos bus ekstrahuojami šie biologiškai veiklūs junginiai. Minėtos koncentracijos etanolio tirpalas būtų veiksmingiausias išskiriant fenolinius junginius ir taninus iš miltinės meškauogės lapų bei fenolinius junginius iš bruknės lapų. Tuo tarpu 50 % acetoną rekomenduotina naudoti šiuos junginius ekstrahuojant iš mėlynės lapų bei išskiriant taninus iš šilinio viržio žaliavos, o 50 % metanolį – ekstrahuojant taninus iš bruknės lapų.

6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*. 2019 Jul;24(13).
2. Molino S, Pilar Francino M, Ángel Rufián Henares J. Why is it important to understand the nature and chemistry of tannins to exploit their potential as nutraceuticals? *Food Res Int*. 2023 Nov;173(Pt 2):113329.
3. Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *Br J Pharmacol*. 2017 Jun;174(11):1244–62.
4. Christenhusz MJM, Byng JW. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*. 2016;261(3):201–17.
5. Tarjan AC. Historical Outline. *Ann N Y Acad Sci*. 1960;84(10):333–333.
6. Bohlin L. Natural Products Isolation. *Drug Discov Today*. 1998;3(12):536–7.
7. Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Nat Prod Commun*. 2013 Dec;8(12):1821–9.
8. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African J Tradit Complement Altern Med AJTCAM*. 2011;8(1):1–10.
9. Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct;16(10):24673–706.
10. Ștefănescu BE, Szabo K, Mocan A, Crișan G. Phenolic Compounds from Five Ericaceae Species Leaves and Their Related Bioavailability and Health Benefits. *Molecules*. 2019 May;24(11).
11. Ștefănescu BE, Călinoiu LF, Ranga F, Fetea F, Mocan A, Vodnar DC, et al. The chemical and biological profiles of leaves from commercial blueberry varieties. *Plants*. 2020;9(9):1–19.
12. Nemes S, Mitrea L, Adrian G, Szabo K, Mihai M, Vodnar DC, et al. Microencapsulation and Bioaccessibility of Phenolic Compounds of Vaccinium Leaf Extracts. 2022;1–16.
13. Vuolo MM, Lima VS, Maróstica Junior MR. Chapter 2 - Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In: Campos MRSBT-BC, editor. Woodhead Publishing; 2019. p. 33–50. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128147740000025>
14. Chikezie PC, Ibegbulem CO, Mbagwu FN. Bioactive principles from medicinal plants. *Res J Phytochem*. 2015;9(3):88–115.

15. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Vol. 15, *Molecules*. 2010. 7313–7352 p.
16. Reis Giada M de L. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. InTech; 2013.
17. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 996, Phenol; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pheno>.
18. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2013 May;18(14):1818–92.
19. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(12):1752–61.
20. Robbins RJ, Bean SR. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *J Chromatogr A*. 2004 Jun;1038(1–2):97–105.
21. Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, et al. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *J AOAC Int*. 2019 Sep;102(5):1397–400.
22. Irshaid FI, Tarawneh KA, Jacob JH, Alshdefat AM. Phenol content, antioxidant capacity and antibacterial activity of methanolic extracts derived from four Jordanian medicinal plants. *Pakistan J Biol Sci PJBS*. 2014 Feb;17(3):372–9.
23. Ginovyan M, Babayan A, Shirvanyan A, Minasyan A, Qocharyan M, Kusznierevich B, et al. The Action Mechanisms, Anti-Cancer and Antibiotic-Modulation Potential of *Vaccinium myrtillus* L. Extract. *Discov Med*. 2023 Aug;35(177):590–611.
24. Liu X, Tian R, Tao H, Wu J, Yang L, Zhang Y, et al. The cardioprotective potentials and the involved mechanisms of phenolic acids in drug-induced cardiotoxicity. *Eur J Pharmacol*. 2022 Dec;936:175362.
25. Zhu T, Wang L, Wang L-P, Wan Q. Therapeutic targets of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke: Applications for natural compounds from medicinal herbs. *Biomed Pharmacother*. 2022 Apr;148:112719.
26. Zeb A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *J Food Biochem*. 2020 Sep;44(9):e13394.
27. Riyaphan J, Pham D-C, Leong MK, Weng C-F. In Silico Approaches to Identify Polyphenol Compounds as α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitors against Type-II Diabetes. *Biomolecules* [Internet]. 2021;11(12). Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/12/1877>

28. Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, et al. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*. 2016;21(10).
29. Brasanac-Vukanovic S, Mutic J, Stankovic DM, Arsic I, Blagojevic N, Vukasinovic-Pesic V, et al. Wild bilberry (*vaccinium myrtillus* L., *ericaceae*) from montenegro as a source of antioxidants for use in the production of nutraceuticals. *Molecules*. 2018;23(8).
30. Colomer R, Sarrats A, Lupu R, Puig T. Natural Polyphenols and their Synthetic Analogs as Emerging Anticancer Agents. *Curr Drug Targets*. 2017;18(2):147–59.
31. Chon S-U. Total polyphenols and bioactivity of seeds and sprouts in several legumes. *Curr Pharm Des*. 2013;19(34):6112–24.
32. Brasanac-Vukanovic S, Mutic J, Stankovic DM, Arsic I, Blagojevic N, Vukasinovic-Pesic V, et al. Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., *Ericaceae*) from Montenegro as a Source of Antioxidants for Use in the Production of Nutraceuticals. *Molecules* [Internet]. 2018;23(8). Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/8/1864>
33. Sulaiman CT, Balachandran I. Total phenolics and total flavonoids in selected Indian medicinal plants. *Indian J Pharm Sci* [Internet]. 2012;74(3):258–60. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/23439764>
34. Sastry Yarla N, S G. Bioactive Flavonoids as ABC Transporters Inhibitors for Reversion of Multidrug Resistance in Cancer. *J Mar Sci Res Dev*. 2013;4(1):3–5.
35. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 2007;30(18):3268–95.
36. Barsteigienė Z, Benetis R, Burdulis D, Lukošius A, Ragažinskienė O, Raudonė L, et al. *Farmacinės botanikos ir farmakognozijos sąvokos: mokomoji knyga*. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai; 2016. 247 p.
37. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. *Herbal medicines*. 3rd ed. Herbal medicines. London ; Pharmaceutical press; 2007.
38. Liu E-H, Qi L-W, Li P. Structural relationship and binding mechanisms of five flavonoids with bovine serum albumin [Internet]. Vol. 15, *Molecules* (Basel, Switzerland). Key Laboratory of Modern Chinese Medicines, China Pharmaceutical University, Ministry of Education, Nanjing 210009, China.; 2010. p. 9092–103. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/21150826>
39. Agati G, Tattini M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol*. 2010;186(4):786–93.
40. Samanta Amalesh, Das Gouranga DSK. Roles of flavonoids in Plants. *Int J Pharm Sci Tech*. 2011;6(1):12–35.
41. Fan X, Fan Z, Yang Z, Huang T, Tong Y, Yang D, et al. Flavonoids-Natural Gifts to Promote Health and Longevity. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb;23(4).
42. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc*.

- 2010 Aug;69(3):273–8.
43. Bakoyiannis I, Daskalopoulou A, Pergialiotis V, Perrea D. Phytochemicals and cognitive health: Are flavonoids doing the trick? *Biomed Pharmacother*. 2019 Jan;109:1488–97.
 44. Rana A, Samtiya M, Dhewa T, Mishra V, Aluko RE. Health benefits of polyphenols: A concise review. *J Food Biochem*. 2022 Oct;46(10):e14264.
 45. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 2013;18(2):2328–75.
 46. de Lourdes Reis Giada M. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In: Morales-González JA, editor. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases* [Internet]. Rijeka: IntechOpen; 2013. Available from: <https://doi.org/10.5772/51687>
 47. Muronetz VI, Barinova K, Kudryavtseva S, Medvedeva M, Melnikova A, Sevostyanova I, et al. Natural and Synthetic Derivatives of Hydroxycinnamic Acid Modulating the Pathological Transformation of Amyloidogenic Proteins. *Molecules* [Internet]. 2020;25(20). Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/20/4647>
 48. Budryn G, Majak I, Grzelczyk J, Sz wajgier D, Rodríguez-Martínez A, Pérez-Sánchez H. Hydroxybenzoic Acids as Acetylcholinesterase Inhibitors: Calorimetric and Docking Simulation Studies. *Nutrients* [Internet]. 2022;14(12). Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/12/2476>
 49. Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol reports (Amsterdam, Netherlands)*. 2019 Dec;24:e00370.
 50. Caruso G, Godos J, Privitera A, Lanza G, Castellano S, Chillemi A, et al. Phenolic Acids and Prevention of Cognitive Decline: Polyphenols with a Neuroprotective Role in Cognitive Disorders and Alzheimer’s Disease. *Nutrients*. 2022 Feb;14(4).
 51. Dai X, Liu Y, Zhuang J, Yao S, Liu L, Jiang X, et al. Discovery and characterization of tannase genes in plants: roles in hydrolysis of tannins. *New Phytol*. 2020;226(4):1104–16.
 52. Okuda T, Ito H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. Vol. 16, *Molecules*. 2011. p. 2191–217.
 53. Teodor ED, Ungureanu O, Gatea F, Radu GL. The Potential of Flavonoids and Tannins from Medicinal Plants as Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem*. 2020;20(18):2216–27.
 54. De Jesus NZT, Falcão H de S, Gomes IF, Leite TJ de A, Lima GR de M, Barbosa-Filho JM, et al. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2012;13(3):3203–28.
 55. Chung K-T, Wong TY, Wei C-I, Huang Y-W, Lin Y. Tannins and Human Health: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 1998 Aug 1;38(6):421–64. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408699891274273>

56. Zhang J, Li L, Kim S-H, Hagerman AE, Lü J. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *Pharm Res.* 2009 Sep;26(9):2066–80.
57. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Med (United Kingdom)* [Internet]. 2018;13(1):1–26. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
58. Handa S. S., Khanuja S. P. S., Longo G. RDD. *Extraction Technologies For Medicinal And Aromatic Plants.* International centre for science and high technology. Trieste, 2008.
59. Sridhar A, Ponnuchamy M, Kumar PS, Kapoor A, Vo D-VN, Prabhakar S. Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review. *Environ Chem Lett* [Internet]. 2021;19(4):3409–43. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01217-8>
60. XU CC, WANG B, PU YQ, TAO JS, ZHANG T. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chin J Nat Med* [Internet]. 2017;15(10):721–31. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30103-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30103-6)
61. Naviglio D, Scarano P, Ciaravolo M, Gallo M. Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques. *Foods (Basel, Switzerland).* 2019 Jul;8(7).
62. Xu H, Fei Q, Manickam S, Li D, Xiao H, Han Y, et al. Mechanistic study of the solid-liquid extraction of phenolics from walnut pellicle fibers enhanced by ultrasound, microwave and mechanical agitation forces. *Chemosphere.* 2022 Dec;309(Pt 1):136451.
63. Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med.* 2018;13:20.
64. Biesaga M, Pyrzyńska K. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chem* [Internet]. 2013;136(1):46–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612012101>
65. Davidov-Pardo G, Arozarena I, Marín-Arroyo MR. Stability of polyphenolic extracts from grape seeds after thermal treatments. *Eur Food Res Technol.* 2011;232(2):211–20.
66. Santos-Buelga C, Gonzalez-Manzano S, Dueñas M, Gonzalez-Paramas AM. Extraction and Isolation of Phenolic Compounds BT - Natural Products Isolation. In: Sarker SD, Nahar L, editors. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 427–64. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_17
67. Huang G, Lian Q, Zeng W, Xie Z. Preparation and evaluation of a lysine-bonded silica monolith as polar stationary phase for hydrophilic interaction pressurized capillary electrochromatography. *Electrophoresis.* 2008 Sep;29(18):3896–904.
68. Sunagar RR, Sreerama YN. Implication of solvent polarities on browntop millet (*Urochloa ramosa*) phenolic antioxidants and their ability to protect oxidative DNA damage and inhibit α -amylase and α -glucosidase enzymes. *Food Chem* [Internet]. 2023;411:135474. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814623000900>

69. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 180, Acetone; [cited 2024 Apr. 14]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acet>.
70. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 887, Methanol; [cited 2024 Apr. 14]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Met>.
71. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 702, Ethanol; [cited 2024 Apr. 14]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Etha>.
72. Lourenço-Lopes C, Silva A, Garcia-Oliveira P, Soria-Lopez A, Echave J, Grosso C, et al. Kinetic Extraction of Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida* Using Ethanol as a Solvent. *Mar Drugs* [Internet]. 2023;21(7). Available from: <https://www.mdpi.com/1660-3397/21/7/414>
73. Afifi HS, Al Marzooqi HM, Tabbaa MJ, Arran AA. Phytochemicals of *Conocarpus* spp. as a Natural and Safe Source of Phenolic Compounds and Antioxidants. *Molecules* [Internet]. 2021;26(4). Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/4/1069>
74. Pršlja P, Žibert T, Urbic T. Monte Carlo simulations of simple two dimensional water-alcohol mixtures. *J Mol Liq* [Internet]. 2022;368:120692. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732222022310>
75. Subra-Paternault P, Garcia-Mendoza MDP, Savoie R, Harscoat-Schiavo C. Impact of Hydro-Alcoholic Solvents on the Oil and Phenolics Extraction from Walnut (*Juglans regia* L.) Press-Cake and the Self-Emulsification of Extracts. *Foods* (Basel, Switzerland). 2022 Jan;11(2).
76. Huaman-Castilla NL, Martínez-Cifuentes M, Camilo C, Pedreschi F, Mariotti-Celis M, Pérez-Correa JR. The Impact of Temperature and Ethanol Concentration on the Global Recovery of Specific Polyphenols in an Integrated HPLC/RP Process on Carménère Pomace Extracts. *Molecules*. 2019 Aug;24(17).
77. Saha A, Basak BB, Manivel P, Kumar J. Valorization of Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) distillation waste as a potential source of phenolics/antioxidant: influence of extraction solvents. *J Food Sci Technol*. 2021 Jan;58(1):255–66.
78. Sultana T, Ahmed M, Akhtar N, Okla MK, Al-Hashimi A, Al-Qahtani WH, et al. Polarity Directed Appraisal of Pharmacological Potential and HPLC-DAD Based Phytochemical Profiling of *Polygonum glabrum* Willd. *Molecules* [Internet]. 2022;27(2). Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/2/474>
79. Nasr A, Saleem Khan T, Zhu G-P. Phenolic compounds and antioxidants from *Eucalyptus camaldulensis* as affected by some extraction conditions, a preparative optimization for GC-MS analysis. *Prep Biochem Biotechnol* [Internet]. 2019 May 28;49(5):464–76.

Available from: <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1575860>

80. Polo V, Domingo LR, Andrés J. Toward an understanding of the catalytic role of hydrogen-bond donor solvents in the hetero-Diels-Alder reaction between acetone and butadiene derivative. *J Phys Chem A*. 2005 Nov;109(45):10438–44.
81. Gao H, Sun M, Duan Y, Cai Y, Dai H, Xu T. Controllable synthesis of lignin nanoparticles with antibacterial activity and analysis of its antibacterial mechanism. *Int J Biol Macromol*. 2023 Aug;246:125596.
82. Vo TP, Nguyen LNH, Le NPT, Mai TP, Nguyen DQ. Optimization of the ultrasonic-assisted extraction process to obtain total phenolic and flavonoid compounds from watermelon (*Citrullus lanatus*) rind. *Curr Res Food Sci [Internet]*. 2022;5:2013–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2665927122001629>
83. Butkus V, Galinis V, Jankevičienė R. Lietuvos TSR flora. Vilnius: Mokslas; 1976. 610 p.
84. Purvinas E, Skirgailaitė V. Botanika : vadovėlis respublikos žemės ūkio aukštųjų mokyklų studentams. [Papildoma. Botanika : vadovėlis respublikos žemės ūkio aukštųjų mokyklų studentams. Vilnius: Mintis; 1975.
85. Antonella S, Barreca D, Giuseppina L, Ersilia B, Domenico T. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) [Internet]. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Elsevier Inc.; 2018. 159–163 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00022-9>
86. Lekavičius A. Vadovas augalams pažinti. Vilnius: Mokslas; 1989. 437 p.
87. Gomzhina MM, Gasich EL, Gagkaeva TY, Gannibal PB. Biodiversity of Fungi Inhabiting European Blueberry in North-Western Russia and in Finland. *Dokl Biol Sci Proc Acad Sci USSR, Biol Sci Sect*. 2022 Dec;507(1):441–55.
88. Gudžinskas Z, Balvočiūtė J. Lietuvos vaistiniai augalai: pažįstami, bet nežinomi, kūno sveikatai, sielos džiaugsmui. Kaunas: Šviesa; 2007. 158 p.
89. Ragažinskienė O, Lukošius A, Trumbeckaitė S, Janulis V, Šeinauskienė E, Liaudanskas M, et al. Vaistinių augalų introdukcija, auginimas ir išsaugojimas, vaistinės augalinės žaliavos paruošos ir terapinis poveikis : mokomoji knyga. Vaistinių augalų introdukcija, auginimas ir išsaugojimas, vaistinės augalinės žaliavos paruošos ir terapinis poveikis : mokomoji knyga. Kaunas; 2021.
90. Gil-Martínez L, Aznar-Ramos MJ, del Carmen Razola-Díaz M, Mut-Salud N, Falcón-Piñeiro A, Baños A, et al. Establishment of a Sonotrode Extraction Method and Evaluation of the Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Potential of an Optimized *Vaccinium myrtillus* L. Leaves Extract as Functional Ingredient. *Foods*. 2023;12(8).
91. Benvenuti S, Brighenti V, Pellati F. High-performance liquid chromatography for the analytical characterization of anthocyanins in *Vaccinium myrtillus* L. (bilberry) fruit and food products. *Anal Bioanal Chem*. 2018 Jun;410(15):3559–71.
92. Hohtola A. Bioactive compounds from northern plants. *Adv Exp Med Biol*. 2010;698:99–

109.

93. Hokkanen J, Mattila S, Jaakola L, Pirttilä AM, Tolonen A. Identification of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and hybrid bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) leaves. *J Agric Food Chem*. 2009 Oct;57(20):9437–47.
94. Cignarella A, Nastasi M, Cavalli E, Puglisi L. Novel lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia: a comparison with ciprofibrate. *Thromb Res*. 1996 Dec;84(5):311–22.
95. Madić V, Stojanović-Radić Z, Jušković M, Jugović D, Žabar Popović A, Vasiljević P. Genotoxic and antigenotoxic potential of herbal mixture and five medicinal plants used in ethnopharmacology. *South African J Bot [Internet]*. 2019;125:290–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629918322919>
96. Madić V, Petrović A, Jušković M, Jugović D, Djordjević L, Stojanović G, et al. Polyherbal mixture ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and histopathological changes of pancreas, kidney and liver in a rat model of type 1 diabetes. *J Ethnopharmacol [Internet]*. 2021;265:113210. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874120330920>
97. Florina L, Ranga F, Fetea F, Vodnar DC, Cris G. Chemical Composition and Biological Activities of the Nord-West Romanian Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Leaves. 2020;
98. Ieri F, Martini S, Innocenti M, Mulinacci N. Phenolic distribution in liquid preparations of *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium vitis idaea* L. *Phytochem Anal*. 2013;24(5):467–75.
99. Fraisse D, Carnat A, Lamaison JL. [Polyphenolic composition of the leaf of bilberry]. *Ann Pharm Fr*. 1996;54(6):280–3.
100. Vyas P, Kalidindi S, Chibrikova L, Igamberdiev AU, Weber JT. Chemical analysis and effect of blueberry and lingonberry fruits and leaves against glutamate-mediated excitotoxicity. *J Agric Food Chem [Internet]*. 2013 Aug 14;61(32):7769–76. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf401158a>
101. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2021). European Pharmacopoeia 11.0. Retrieved from <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition>.
102. Martău GA, Bernadette-Emőke T, Odocheanu R, Soporan DA, Bochiş M, Simon E, et al. *Vaccinium* Species (Ericaceae): Phytochemistry and Biological Properties of Medicinal Plants. *Molecules*. 2023;28(4).
103. Gaspar DP, Lechtenberg M, Hensel A. Quality Assessment of Bilberry Fruits (*Vaccinium myrtillus*) and Bilberry-Containing Dietary Supplements. *J Agric Food Chem*. 2021 Feb;69(7):2213–25.
104. Persson IA-L, Persson K, Andersson RGG. Effect of *Vaccinium myrtillus* and its

- polyphenols on angiotensin-converting enzyme activity in human endothelial cells. *J Agric Food Chem*. 2009 Jun;57(11):4626–9.
105. Ren Y, Mao S, Zeng Y, Chen S, Tian J, Ye X. Pectin from Citrus unshiu Marc. Alleviates Glucose and Lipid Metabolism by Regulating the Gut Microbiota and Metabolites. *Foods* (Basel, Switzerland). 2023 Nov;12(22).
 106. Grover P, Mehta L, Malhotra A, Kapoor G, Nagarajan K, Kumar P, et al. Exploring the Multitarget Potential of Iridoids: Advances and Applications. *Curr Top Med Chem*. 2023;23(5):371–88.
 107. Dare AP, Günther CS, Grey AC, Guo G, Demarais NJ, Cordiner S, et al. Resolving the developmental distribution patterns of polyphenols and related primary metabolites in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fruit. *Food Chem* [Internet]. 2022;374:131703. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621027096>
 108. Kolehmainen M, Mykkänen O, Kirjavainen P V, Leppänen T, Moilanen E, Adriaens M, et al. Bilberries reduce low-grade inflammation in individuals with features of metabolic syndrome. *Mol Nutr & Food Res* [Internet]. 2012;56(10):1501–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mnfr.201200195>
 109. Matsunaga N, Tsuruma K, Shimazawa M, Yokota S, Hara H. Inhibitory actions of bilberry anthocyanidins on angiogenesis. *Phyther Res*. 2010 Jan;24 Suppl 1:S42-7.
 110. Erlund I, Koli R, Alfthan G, Marniemi J, Puukka P, Mustonen P, et al. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2008;87(2):323–31. Available from: <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.2.323>
 111. de Mello VDF, Lankinen MA, Lindström J, Puupponen-Pimiä R, Laaksonen DE, Pihlajamäki J, et al. Fasting serum hippuric acid is elevated after bilberry (*Vaccinium myrtillus*) consumption and associates with improvement of fasting glucose levels and insulin secretion in persons at high risk of developing type 2 diabetes. *Mol Nutr & Food Res* [Internet]. 2017;61(9):1700019. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mnfr.201700019>
 112. Lietti A, Cristoni A, Picci M. Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. I. Vasoprotective and antiinflammatory activity. *Arzneimittelforschung*. 1976;26(5):829–32.
 113. Pärnänen P, Lähteenmäki H, Tervahartiala T, Räisänen IT, Sorsa T. Lingonberries-General and Oral Effects on the Microbiome and Inflammation. *Nutrients*. 2021 Oct;13(11).
 114. Gustavsson BA. Genetic variation in horticulturally important traits of fifteen wild lingonberry *Vaccinium vitis-idaea* L. populations. *Euphytica*. 2001;120(2):173–82.
 115. Vilkickyte G, Petrikaite V, Pukalskas A, Sipailiene A, Raudone L. Exploring *Vaccinium vitis-idaea* L. as a potential source of therapeutic agents: antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of extracts and fractions. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2022;292:115207. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887412200246X>
 116. Ho KY, Huang JS, Tsai CC, Lin TC, Hsu YF, Lin CC. Antioxidant activity of tannin

- components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *J Pharm Pharmacol*. 1999 Sep;51(9):1075–8.
117. Ek S, Kartimo H, Mattila S, Tolonen A. Characterization of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*). *J Agric Food Chem* [Internet]. 2006 Dec 1;54(26):9834–42. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf0623687>
 118. Tian Y, Puganen A, Alakomi H-L, Uusitupa A, Saarela M, Yang B. Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants. *Food Res Int* [Internet]. 2018;106:291–303. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917309341>
 119. Vilkickyte G, Raudone L. Phenological and Geographical Effects on Phenolic and Triterpenoid Content in *Vaccinium vitis-idaea* L. Leaves. *Plants* [Internet]. 2021;10(10). Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/10/1986>
 120. Bujor O-C, Ginies C, Popa VI, Dufour C. Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods. *Food Chem* [Internet]. 2018;252:356–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618300621>
 121. Raudone L, Vilkickyte G, Pitkauskaite L, Raudonis R, Vainoriene R, Motiekaityte V. Antioxidant Activities of *Vaccinium vitis-idaea* L. Leaves within cultivars and their phenolic compounds. *Molecules*. 2019;24(5).
 122. Takebayashi J, Ishii R, Chen J, Matsumoto T, Ishimi Y, Tai A. Reassessment of antioxidant activity of arbutin: Multifaceted evaluation using five antioxidant assay systems. *Free Radic Res* [Internet]. 2010 Jan 1;44(4):473–8. Available from: <https://doi.org/10.3109/10715761003610760>
 123. Liu P, Lindstedt A, Markkinen N, Sinkkonen J, Suomela J-P, Yang B. Characterization of Metabolite Profiles of Leaves of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *J Agric Food Chem* [Internet]. 2014 Dec 10;62(49):12015–26. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf503521m>
 124. Vilkickyte G, Raudone L, Petrikaite V. Phenolic fractions from *vaccinium vitis-idaea* l. And their antioxidant and anticancer activities assessment. *Antioxidants*. 2020;9(12):1–20.
 125. Wang X, Sun H, Fan Y, Li L, Makino T, Kano Y. Analysis and Bioactive Evaluation of the Compounds Absorbed into Blood after Oral Administration of the Extracts of *Vaccinium vitis-idaea* in Rat. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(6):1106–8.
 126. Drózdź P, Šežienė V, Wójcik J, Pyrzyńska K. Evaluation of Bioactive Compounds, Minerals and Antioxidant Activity of Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Fruits. *Molecules* [Internet]. 2018;23(1). Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/1/53>
 127. Chen Y, Wang J, Zou L, Cao H, Ni X, Xiao J. Dietary proanthocyanidins on gastrointestinal health and the interactions with gut microbiota. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2023;63(23):6285–308.
 128. Amundsen M, Hykkerud AL, Kelanne N, Tuominen S, Schmidt G, Laaksonen O, et al.

- Composition of Sugars, Organic Acids, Phenolic Compounds, and Volatile Organic Compounds in Lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea* L.) at Five Ripening Stages. *Foods* [Internet]. 2023;12(11). Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/11/2154>
129. Vilckickyte G, Raudone L. *Vaccinium vitis-idaea* L. Fruits: Chromatographic Analysis of Seasonal and Geographical Variation in Bioactive Compounds. *Foods* [Internet]. 2021;10(10). Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/10/2243>
 130. Patocka J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J Appl Biomed*. 2003;1.
 131. Szakiel A, Pączkowski C, Koivuniemi H, Huttunen S. Comparison of the Triterpenoid Content of Berries and Leaves of Lingonberry *Vaccinium vitis-idaea* from Finland and Poland. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2012 May 16;60(19):4994–5002. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf300375b>
 132. Szakiel A, Mroczek A. Distribution of triterpene acids and their derivatives in organs of cowberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) plant. *Acta Biochim Pol*. 2007 Feb 1;54:733–40.
 133. Nguyen HN, Ullevig SL, Short JD, Wang L, Ahn YJ, Asmis R. Ursolic Acid and Related Analogues: Triterpenoids with Broad Health Benefits. *Antioxidants* [Internet]. 2021;10(8). Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/8/1161>
 134. Castellano JM, Ramos-Romero S, Perona JS. Oleanolic Acid: Extraction, Characterization and Biological Activity. *Nutrients*. 2022 Jan;14(3).
 135. Harbilas D, Martineau LC, Harris CS, Adeyiwola-Spoor DCA, Saleem A, Lambert J, et al. Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009 Jun;87(6):479–92.
 136. Cioch M, Satora P, Skotniczny M, Semik-Szczurak D, Tarko T. Characterisation of antimicrobial properties of extracts of selected medicinal plants. *Polish J Microbiol*. 2017;66(4):463–72.
 137. Lazdauskaitė Ž. Pavasarį žydintys augalai; Vilnius : Mokslas; 1985. p. 170.
 138. Vasiliauskas J. Gamtos vaistinė. Vilnius: Alma littera; 2010. p. 102–104.
 139. Janulis V, Barsteigienė Z, Puodžiūnienė G. Morfologiniai ir anatomiciniai vaistinių augalinių žaliavų požymiai : mokomoji knyga. Morfologiniai ir anatomiciniai vaistinių augalinių žaliavų požymiai : mokomoji knyga. Kaunas: Kauno medicinos universiteto leidykla; 2001.
 140. Medicines Q. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) Supplement 10.6. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2022. 2022;33(0):19–20.
 141. Olennikov DN, Chekhirova G V. 6-O-Galloylpicein and other phenolic compounds from *Arctostaphylos uva-ursi*. *Chem Nat Compd*. 2013;49(1):1–7.
 142. Song X-C, Canellas E, Dreolin N, Nerin C, Goshawk J. Discovery and Characterization of Phenolic Compounds in Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) Leaves Using Liquid

- Chromatography-Ion Mobility-High-Resolution Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2021 Sep;69(37):10856–68.
143. Jahodár L, Leifertová I, Lisá M. Investigation of iridoid substances in *Arctostaphylos uva-ursi*. *Pharmazie*. 1978 Aug;33(8):536–7.
 144. Kravchenko G, Krasilnikova O, Raal A, Mazen M, Chaika N, Kireyev I, et al. *Arctostaphylos uva-ursi* L. leaves extract and its modified cysteine preparation for the management of insulin resistance: chemical analysis and bioactivity. *Nat Products Bioprospect*. 2022 Aug;12(1):30.
 145. Radulović N, Blagojević P, Palić R. Comparative study of the leaf volatiles of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. and *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae). *Molecules*. 2010 Sep;15(9):6168–85.
 146. Shamilov AA, Olennikov DN, Pozdnyakov DI, Bubenchikova VN, Garsiya ER. Investigation of phenolic compounds at the leaves and shoots *Arctostaphylos* spp. and their antioxidant and antityrosinase activities. *Nat Prod Res* [Internet]. 2022 Dec 17;36(24):6312–7. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2025370>
 147. Wrona M, Blasco S, Becerril R, Nerin C, Sales E, Asensio E. Antioxidant and antimicrobial markers by UPLC®-ESI-Q-TOF-MSE of a new multilayer active packaging based on *Arctostaphylos uva-ursi*. *Talanta* [Internet]. 2019;196:498–509. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/30683397>
 148. Lee HJ, Kim KW. Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Inflamm Res*. 2012;61(8):817–25.
 149. Shahaboddin M-E, Pouramir M, Moghadamnia A-A, Parsian H, Lakzaei M, Mir H. *Pyrus bioessieriana* Buhse leaf extract: An antioxidant, antihyperglycaemic and antihyperlipidemic agent. *Food Chem* [Internet]. 2011;126(4):1730–3. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610016900>
 150. Oyenih O, L. N, Oguntibeju O. Oxidative Stress and Diabetic Complications: The Role of Antioxidant Vitamins and Flavonoids. In 2014.
 151. Anoor PK, Yadav AN, Rajkumar K, Kande R, Tripura C, Naik KS, et al. Methanol extraction revealed anticancer compounds Quinic Acid, 2(5H)-Furanone and Phytol in *Andrographis paniculata*. *Mol Clin Oncol*. 2022 Nov;17(5):151.
 152. Choi YH, Yan GH. Ellagic Acid Attenuates Immunoglobulin E-Mediated Allergic Response in Mast Cells. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(6):1118–21.
 153. Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ. Phenolic Constituents, Furans, and Total Antioxidant Status of Distilled Spirits. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1999 Oct 1;47(10):3978–85. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf9811626>
 154. Chen J-H, Wu P-T, Chyau C-C, Wu P-H, Lin H-H. The Nephroprotective Effects of *Hibiscus sabdariffa* Leaf and Ellagic Acid in Vitro and in Vivo Models of Hyperuricemic Nephropathy. *J Agric Food Chem*. 2023 Jan;71(1):382–97.

155. Sharifi-Rad J, Quispe C, Castillo CMS, Caroca R, Lazo-Vélez MA, Antonyak H, et al. [Retracted] Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. Chen L, editor. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2022;2022:3848084. Available from: <https://doi.org/10.1155/2022/3848084>
156. Ali SS, Ahmad WANW, Budin SB, Zainalabidin S. Implication of dietary phenolic acids on inflammation in cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med*. 2020 Jun;21(2):225–40.
157. Shariati A, Didehdar M, Razavi S, Heidary M, Soroush F, Chegini Z. Natural Compounds: A Hopeful Promise as an Antibiofilm Agent Against *Candida* Species. *Front Pharmacol*. 2022;13:917787.
158. Mohd Azman NA, Gallego MG, Segovia F, Abdullah S, Shaarani SM, Almajano Pablos MP. Study of the Properties of Bearberry Leaf Extract as a Natural Antioxidant in Model Foods. *Antioxidants* [Internet]. 2016;5(2). Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/5/2/11>
159. Sugier P, Sęczyk Ł, Sugier D, Krawczyk R, Wójcik M, Czarnecka J, et al. Chemical Characteristics and Antioxidant Activity of *Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng. at the Southern Border of the Geographical Range of the Species in Europe. Vol. 26, *Molecules*. 2021.
160. Generalić Mekinić I, Skroza D, Ljubenković I, Katalinić V, Šimat V. Antioxidant and Antimicrobial Potential of Phenolic Metabolites from Traditionally Used Mediterranean Herbs and Spices. *Foods* [Internet]. 2019;8(11). Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/8/11/579>
161. Matsuda H, Higashino M, Nakai Y, Inuma M, Kubo M, Lang FA. Studies of cuticle drugs from natural sources. IV. Inhibitory effects of some *Arctostaphylos* plants on melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull*. 1996 Jan;19(1):153–6.
162. Kurkin VA, Ryazanova TK, Daeva ED, Kadentsev VI. Constituents of *Arctostaphylos uva-ursi* Leaves. *Chem Nat Compd*. 2018;54(2):278–80.
163. Gudžinskas Z. Lietuvos induočiai augalai. Vascular plants of Lithuania. Vilnius: Botanikos inst. I-kla; 1999. 211 p.
164. Varga E, Becsek E, Bartha SG, Stranczinger S, Mihalovits F, Papp N. Determination of polyphenols and in vitro antimicrobial and antioxidant activity of *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Biol Futur* [Internet]. 2021;72(2):251–6. Available from: <https://doi.org/10.1007/s42977-020-00059-9>
165. Orhan I, Küpeli E, Terzioğlu S, Yesilada E. Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-O- β -D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2007;114(1):32–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874107003157>
166. Cucu A-A, Baci G-M, Cucu A-B, Dezsi Ștefan, Lujerdean C, Hegeduş IC, et al. *Calluna vulgaris* as a Valuable Source of Bioactive Compounds: Exploring Its Phytochemical Profile, Biological Activities and Apitherapeutic Potential. *Plants* [Internet]. 2022;11. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:251273223>

167. Saaby L, Rasmussen HB, Jäger AK. MAO-A inhibitory activity of quercetin from *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2009;121(1):178–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874108005655>
168. Chepel V, Lisun V, Skrypnyk L. Changes in the Content of Some Groups of Phenolic Compounds and Biological Activity of Extracts of Various Parts of Heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) at Different Growth Stages. *Plants* [Internet]. 2020;9(8). Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/8/926>
169. Teterovska R, Sile I, Paulausks A, Kovalcuka L, Koka R, Mauriņa B, et al. The Antioxidant Activity of Wild-Growing Plants Containing Phenolic Compounds in Latvia. *Plants* [Internet]. 2023;12(24). Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/12/24/4108>
170. Akdad M, Ameziane R, Khallouki F, Bakri Y, Eddouks M. Antidiabetic Phytocompounds Acting as Glucose Transport Stimulators. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2023;23(2):147–68.
171. Wu C, Luan H, Zhang X, Wang S, Zhang X, Sun X, et al. Chlorogenic acid protects against atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice and promotes cholesterol efflux from RAW264.7 macrophages. *PLoS One*. 2014;9(9):e95452.
172. Jiang Y, Pei J, Zheng Y, Miao Y-J, Duan B-Z, Huang L-F. Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent. *Chin J Integr Med*. 2022 Jul;28(7):661–71.
173. Vučić DM, Petković MR, Rodić-Grabovac BB, Stefanović OD, Vasić SM, Comić LR. In vitro activity of heather [*Calluna vulgaris* (L.) Hull] extracts on selected urinary tract pathogens. *Bosn J basic Med Sci*. 2014 Nov;14(4):234–8.
174. Gordien AY, Gray AI, Ingleby K, Franzblau SG, Seidel V. Activity of Scottish plant, lichen and fungal endophyte extracts against *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytother Res*. 2010 May;24(5):692–8.
175. Kaunaite V, Vilkickyte G, Raudone L. Phytochemical Diversity and Antioxidant Potential of Wild Heather (*Calluna vulgaris* L.) Aboveground Parts. *Plants* (Basel, Switzerland). 2022 Aug;11(17).
176. Pancost RD, Baas M, van Geel B, Sinninghe Damsté JS. Biomarkers as proxies for plant inputs to peats: an example from a sub-boreal ombrotrophic bog. *Org Geochem* [Internet]. 2002;33(7):675–90. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0146638002000487>
177. García-Risco MR, Vázquez E, Sheldon J, Steinmann E, Riebesehl N, Fornari T, et al. Supercritical fluid extraction of heather (*Calluna vulgaris*) and evaluation of anti-hepatitis C virus activity of the extracts. *Virus Res* [Internet]. 2015;198:9–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016817021400536X>
178. Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol*. 1995 Dec;49(2):57–68.
179. Kong L, Li S, Liao Q, Zhang Y, Sun R, Zhu X, et al. Oleanolic acid and ursolic acid:

- Novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NS5B activity. *Antiviral Res* [Internet]. 2013;98(1):44–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354213000284>
180. Starchenko G, Hrytsyk A, Raal A, Koshovyi O. Phytochemical Profile and Pharmacological Activities of Water and Hydroethanolic Dry Extracts of *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Herb. Plants* [Internet]. 2020;9(6). Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/6/751>
 181. Moreno-Gonzalo J, Osoro K, García U, Frutos P, Celaya R, Ferreira LMM, et al. Anthelmintic effect of heather in goats experimentally infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Parasitol Res*. 2014 Feb;113(2):693–9.
 182. Celaya R, Ferreira LMM, Moreno-Gonzalo J, Frutos P, Hervás G, Ferre I, et al. Effects of heather and oat supplementation on gastrointestinal nematode infections and performance of grazing Cashmere goats. *Small Rumin Res* [Internet]. 2010;91(2):186–92. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092144881000088X>
 183. Jalal MAF, Read DJ, Haslam E. Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry* [Internet]. 1982;21(6):1397–401. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942282801507>
 184. Zagayko AL, Kolisnyk TY, Chumak OI, Ruban OA, Koshovyi OM. Evaluation of anti-obesity and lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* leaves powder extract in a hamster model. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018 Nov;29(6):697–703.
 185. Bujor O-C, Le Bourvellec C, Volf I, Popa VI, Dufour C. Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity. *Food Chem*. 2016 Dec;213:58–68.
 186. Kandziora-Ciupa M, Dabioch M, Nadgórska-Socha A. Evaluating the Accumulation of Antioxidant and Macro- and Trace Elements in *Vaccinium myrtillus* L. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2022;200(9):4175–85. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02989-4>
 187. Račkauskienė I, Pukalskas A, Fiore A, Troise AD, Venskutonis PR. Phytochemical-Rich Antioxidant Extracts of *Vaccinium vitis-idaea* L. Leaves Inhibit the Formation of Toxic Maillard Reaction Products in Food Models. *J Food Sci*. 2019 Dec;84(12):3494–503.
 188. Raudone L, Vilkickyte G, Pitkauskaite L, Raudonis R, Vainoriene R, Motiekaityte V. Antioxidant Activities of *Vaccinium vitis-idaea* L. Leaves within Cultivars and Their Phenolic Compounds. *Molecules*. 2019 Feb;24(5).
 189. Amarowicz R, Barl B, PEGG RB. Potential natural antioxidants from Saskatchewan indigenous plants. *J Food Lipids*. 2007 May 4;6:317–29.
 190. Šukele R, Skadiņš I, Koka R, Bandere D. Antibacterial effects of oak bark (*Quercus robur*) and heather herb (*Calluna vulgaris* L.) extracts against the causative bacteria of bovine mastitis. *Vet world*. 2022 Sep;15(9):2315–22.
 191. Roslon W, Suchorska-Tropiło K. Chemical characteristics of three species from the family

- Ericaceae originating from natural site. *Herba Pol* [Internet]. 2007;53. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:83009038>
192. Maier M, Oelbermann A-L, Renner M, Weidner E. Screening of European medicinal herbs on their tannin content—New potential tanning agents for the leather industry. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2017;99:19–26. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666901730033X>
 193. González-Hernández M, Karchesy JJ, Starkey EE. Research observation: Hydrolyzable and condensed tannins in plants of the northwest. *J Range Manag* [Internet]. 2003;56:461–5. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:81877336>
 194. Sugier P, Sęczyk Ł, Sugier D. Variation in Population and Solvents as Factors Determining the Chemical Composition and Antioxidant Potential of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. Leaf Extracts. *Molecules*. 2022;27(7).
 195. Amarowicz R, Pegg RB. Inhibition of proliferation of human carcinoma cell lines by phenolic compounds from a bearberry-leaf crude extract and its fractions. *J Funct Foods* [Internet]. 2013;5(2):660–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464613000121>
 196. Psarrou I, Oreopoulou A, Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Extraction Kinetics of Phenolic Antioxidants from the Hydro Distillation Residues of Rosemary and Effect of Pretreatment and Extraction Parameters. *Molecules* [Internet]. 2020;25(19). Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/19/4520>
 197. Grujic N, Lepojevic Z, Srdjenovic B, Vladic J, Sudji J. Effects of Different Extraction Methods and Conditions on the Phenolic Composition of Mate Tea Extracts. *Molecules* [Internet]. 2012;17(3):2518–28. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/17/3/2518>
 198. Rosero S, Del Pozo F, Simbaña W, Álvarez M, Quinteros MF, Carrillo W, et al. Polyphenols and Flavonoids Composition, Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Andean *Baccharis macrantha* Extracts. *Plants* [Internet]. 2022;11(12). Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/12/1555>
 199. Naczka M, Pegg RB, Amarowicz R. Protein-precipitating capacity of bearberry-leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) polyphenolics. *Food Chem* [Internet]. 2011;124(4):1507–13. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610009891>
 200. Pegg RB, Rybarczyk A, Amarowicz R. Chromatographic Separation of Tannin Fractions From a Bearberry-Leaf (*Arctostaphylos Uva-Ursi* L. Sprengel) Extract By Se-Hplc -- a Short Report. *Polish J Food Nutr Sci* [Internet]. 2008;58(4):485–90. Available from: <http://proxy.lib.ohio-state.edu/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=36471041&site=ehost-live>
 201. Wang S, Li Q, Yang S, Yu H, Chai J, Zhu M. H-bond-induced luminescence enhancement in a Pt(1)Ag(30) nanocluster and its application in methanol detection. *Nanoscale*. 2022

Nov;14(44):16647–54.

202. Huffman BA, Poltash ML, Hughey CA. Effect of polar protic and polar aprotic solvents on negative-ion electrospray ionization and chromatographic separation of small acidic molecules. *Anal Chem.* 2012;84(22):9942–50.
203. Varga E, Becsek E, Bartha SG, Stranczinger S, Mihalovits F, Papp N. Determination of polyphenols and in vitro antimicrobial and antioxidant activity of *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Biol Futur.* 2021 Jun;72(2):251–6.
204. Rodrigues F, Moreira T, Pinto D, Pimentel FB, Costa ASG, Nunes MA, et al. The phytochemical and bioactivity profiles of wild *Calluna vulgaris* L. flowers. *Food Res Int* [Internet]. 2018;111:724–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918304575>