LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMAKOGNOZIJOS KATEDRA

**AGNĖ STANKAITYTĖ**

# FENOLINIŲ JUNGINIŲ ANALIZĖ DILGĖLIŲ (*URTICA DIOICA* L.) ŠAKNYSE, STIEBUOSE IR LAPUOSE

**Magistro baigiamasis darbas**

**Darbo vadovas**

Dr. Audronis Lukošius

KAUNAS, 2019

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMAKOGNOZIJOS KATEDRA

**TVIRTINU:**
Farmacijos fakulteto dekanė prof. dr. Ramunė Morkūnienė
Data:

# FENOLINIŲ JUNGINIŲ ANALIZĖ DILGĖLIŲ (*URTICA DIOICA* L.) ŠAKNYSE, STIEBUOSE IR LAPUOSE

**Magistro baigiamasis darbas**

Darbo vadovas
Dr. Audronis Lukošius
Data

Recenzentas

Data

Darbą atliko
Magistrantė
Agnė Stankaitytė
Data

KAUNAS, 2019

# TURINYS

SANTRAUKA ..... 5

SUMMARY ..... 6

SANTRUMPOS ..... 7

ĮVADAS ..... 8

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI ..... 9

1. LITERATŪROS APŽVALGA ..... 10

1.1. Didžiųjų dilgėlių (*Urtica dioica* L.) morfologiniai požymiai ir paplitimas ..... 10

1.2. Didžiųjų dilgėlių biologiškai aktyvios medžiagos ..... 10

1.3. Didžiųjų dilgėlių žaliavų preparatų farmakologinės savybės ..... 11

1.4. Fenolinių junginių apžvalga, klasifikacija ..... 14

1.4.1. Flavonoidai ..... 15

1.4.2. Fenolinės rūgštys ..... 16

1.5. Fenolinių junginių kokybinio ir kiekybinio nustatymo metodai ..... 16

1.5.1. Spektrofotometriniai metodai ..... 17

1.5.2. Chromatografiniai metodai ..... 18

1.5.3. Kapiliarinė elektroforezė ..... 19

2. TYRIMO METODIKA ..... 20

2.1. Tyrimo objektas ..... 20

2.2. Tyrimo metu naudoti reagentai ..... 20

2.3. Tyrimo metu naudota aparatūra ..... 21

2.4. Tiriamųjų ekstraktų paruošimas ..... 21

2.5. Tyrimo metodai ..... 22

2.5.1. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu ..... 22

2.5.2. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu ..... 22

2.5.3. Hidroksicinamono rūgšties darinių nustatymas spektrofotometriniu metodu ..... 23

2.5.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ..... 23

2.5.4.1. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH radikalų surišimo metodu ..... 23

2.5.4.2. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS katijonų - radikalų surišimo metodu..... 24

2.5.4.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas FRAP redukcinio aktyvumo metodu ..... 24

2.5.5. Ultraefektyviosios skysčių chromatografijos su tandemine masių spektrometrija metodas .....25

2.6. Tyrimo duomenų analizė ..... 25

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS ..... 26

3.1. Fenolinių junginių ekstrakcijos sąlygų parinkimas didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų augalinėms žaliavoms ..... 26

3.2. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu ..... 27

3.3. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu ..... 31

3.4. Bendras hidroksicinamono rūgšties darinių kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu. 34

3.5. Didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas..... 36

3.6. Didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų analizė UESC-MS/MS metodu ..... 40

3.7. Didžiųjų dilgėlių fenolinių junginių kiekinės sudėties ir jų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo koreliacinių ryšių įvertinimas ..... 42

3.8. Rezultatų apibendrinimas ..... 43

IŠVADOS..... 44

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS..... 45

LITERATŪROS SĄRAŠAS..... 46

PRIEDAI ..... 53

# SANTRAUKA

A.Stankaitytės magistro baigiamasis darbas/ mokslinis vadovas dr. Audronis Lukošius; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Farmacijos fakulteto, Farmakognozijos katedra. – Kaunas

**Pavadinimas:** Fenolinių junginių analizė dilgėlių (*Urtica dioica* L.) šaknyse, stiebuose ir lapuose.

**Raktiniai žodžiai:** *Urtica dioica,* dilgėlė, fenoliniai junginiai, hidroksicinamono rūgšties dariniai, flavonoidai, spektrofotometrija, ultraefektyvioji skysčių chromatografija, antioksidacinis aktyvumas.

**Tyrimo objektas ir metodai:** Didžiųjų dilgėlių lapai, stiebai ir šaknys rinkti skirtinguose Lietuvos regionuose ir vegetacijos laikotarpio metu. Bendras fenolinių junginių, hidroksicinamono rūgšties darinių, flavonoidų kiekis ir antioksidacinis aktyvumas nustatytas UV–VIS spektrofotometriniu analizės metodu. Kokybinė ir kiekinė fenolinių junginių sudėties analizė atlikta taikant UESC/MS metodą.

**Tyrimo tikslas:** nustatyti natūraliai Lietuvoje augančių didžiųjų dilgėlių (*Urtica dioica* L.) kaupiamų fenolinių junginių kokybinę ir kiekinę sudėtį bei įvertinti antioksidacinį aktyvumą.

**Tyrimo uždaviniai:** parinkti didžiųjų dilgėlių šaknų, stiebų ir lapų fenolinių junginių ekstrakcijos sąlygas. Nustatyti bendrą fenolinių junginių, flavonoidų ir hidroksicinamono rūgšties darinių kiekį *Urtica dioica* L. lapų, stiebų ir šaknų ekstraktuose vegetacijos metu bei žaliavose surinktose iš skirtingų Lietuvos augaviečių. Nustatyti didžiųjų dilgėlių ėminių ekstraktų antioksidantinį aktyvumą, įvertinti koreliacinius ryšius tarp didžiosios dilgėlės ėminiuose kaupiamo fenolinių junginių kiekio ir ekstraktų antioksidantinio aktyvumo. Įvertinti didžiosios dilgėlės lapų, stiebų ir šaknų fenolinių junginių kokybinę ir kiekinę sudėtį ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

**Tyrimo rezultatai ir išvados:** Bendras fenolinių junginių kiekis lapuose vegetacijos metu svyruoja nuo 64,90 ±0,54 mg/g iki 114,80±0,80 mg/g, skirtingose augimvietėse nuo 122,95±4,98 mg/g iki 154,97±1,68 mg/g. Lapuose flavonoidų kiekis vegetacijos metu įvairuoja nuo 11,47±0,11 mg/g iki 16,27 ± 0,16 mg/g, skirtingose augavietėse nuo 11,04 ± 0,41 mg/g iki 20,16 ± 0,16 mg/g. Stiebuose ir šaknyse fenolinių junginių kiekiai statistiškai reikšmingai mažesni, nei lapuose. Vidutinis bendras hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis lapuose yra 23,87 mg/g, stiebuose – 3,37 mg/g, šaknyse – 2,74 mg/g. Stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu, pasižymėjo Jurbarko raj. Girdžiuose ir Rokiškyje surinktų dilgėlių lapų ekstraktai. Nustatytas labai stiprus koreliacijos ryšys tarp bendro fenolinių junginių kiekio ir antioksidacinio aktyvumo, nustatyto FRAP metodu (0,975, $p<0,05$). UESC/MS metodu didžiųjų dilgėlių žaliavose identifikuoti šie junginiai: chlorogeno rūgštis, chino rūgštis, kavos rūgštis, kumaro rūgštis, rutinas, izokvercitrinas, izoramnetin-3-O-rutinozidas.

# SUMMARY

**The title of the master thesis:** Phenolic compounds analysis of roots, stalks and leaves of nettle (*Urtica dioica* L.)

**Key words:** *Urtica dioica*, nettle, phenolic compounds, hidroxycinnamic acid derivatives, flavonoids, spectrophotometry, ultrahigh performance liquid chromatography, antioxidant activity.

**The object and methods of the research:** the samples of roots, stalks and leaves of Stinging nettle collected during vegetation period and from various regions of Lithuania. Total phenolic compounds amount, total hidroxycinnamic acid derivatives amount, total flavonoids amount and antioxidant activity were determined by UV – VIS spectrophotometric analysis method. The qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds was performed by UHPLC/MS method.

**The aim of the research:** to determine the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds of roots, stalks and leaves of Stinging nettle, which grow in Lithuanian climatic conditions and to evaluate the antioxidant activity of their extracts.

**The objectives of the research:** to select the extraction conditions of phenolic compounds from the samples of roots, stalks and leaves of Stinging nettle. To determine total phenolic compounds, total hidroxycinnamic acid derivatives and total flavonoids content variation in the samples of roots, stalks and leaves of Stinging nettle collected during vegetation period and from various regions of Lithuania. To determine the antioxidant activity and correlation between the phenolic compounds content in the samples of Stinging nettle and the antioxidant activity of their extracts. To evaluate the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds in samples of roots, stalks and leaves of Stinging nettle by UHPLC methodology.

**The results and conclusions of the research:** Total phenolic compounds amount in leaves of Stinging nettle varies from 64,90±0,54 mg/g to 114,80±0,80 mg/g during vegetation period and from 122,95±4,98 mg/g to 154,97±1,68 mg/g in different regions of Lithuania. During vegetation period total flavonoids amount in leaves of Stinging nettle varies from 11,47 ± 0,11 mg/g to 16,27±0,16 mg/g, and in different regions of Lithuania varies from 11,04±0,41 mg/g to 20,16±0,16 mg/g. Total phenolic compounds amount in stalks and roots of Stinging nettle was significantly lower than in leaves. The average amount of hydroxycinnamic acid derivates in leaves – 23,87 mg/g, stalks – 3,37 mg/g, roots – 2,74 mg/g. The strongest antioxidant activity was determined in extracts of leaves, cultivated in Jurbarkas reg., Girdžiai and in Rokiškis town. The strongest correlation was determined between the total amount of phenolic compounds and antioxidant activity, which was measured by FRAP method (0,975, $p<0,05$). The seven phenolic compounds (chlorogenic, quinic, caffeic and coumaric acids, rutin, isoquercitrin, isorhamnetin-3-O-rutinoside) were identified and quantified by UHPLC/MS method.

# SANTRUMPOS

**ANOVA –** vienfaktorinė dispersinė analizė;

**ABTS** – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sulfono rūgštis);

**CRE** – chlorogeno rūgšties ekvivalentas;

**DPPH** – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalas;

**ESC** – efektyvioji skysčių chromatografija;

**FRAP** – geležies (III) jonų redukcijos antioksidantinė galia;

**GRE** – galo rūgšties ekvivalentas;

**HepG2** – žmogaus kepenų vėžio linijos ląstelės;

**IL-6** – interleukinas-6;

**NF-kB** – branduolio transkripcijos faktorius;

**MTT** – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas;

**RE** – rutino ekvivalentas;

**TE** – trolokso ekvivalentas;

**TPTZ** – 2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazinas;

**UESC** – ultraefektyvioji skysčių chromatografija.

# ĮVADAS

Oksidacinis stresas yra vienas iš pagrindinių veiksnių, sukeliančių lėtines ir degeneracines ligas, tokias kaip vežys, širdies ir kraujagyslių ligos, artritas, autoimuniniai sutrikimai, neurodegeneracinės ligos, senėjimas. Pastaraisiais metais susirgimų lėtinėmis bei degeneracinėmis ligomis Europoje ir visame pasaulyje vis daugėja, todėl itin svarbu laiku jas diagnozuoti ir pradėti gydymą. Viena iš priemonių gydymui – augaliniai vaistiniai preparatai.

Didžiosios dilgėlės (*Urtica dioica* L.) lapai ir šaknys įtraukti į Europos farmakopėją, kaip vaistinės augalinės žaliavos. Senovėje daugelyje šalių šis augalas buvo vartojamas reumatinių ligų gydymui [1]. Šiuo metu didžioji dilgėlė yra vartojama ne tik liaudies medicinoje ar maisto pramonėje, bet taip pat farmacijos ir kosmetikos pramonėje. Šis augalas kaupia daug naudingų biologiškai aktyvių medžiagų – fenolinius junginius, sterolius, taninus, vitaminus ir mineralus, organines rūgštis [1, 2]. Fitocheminiu požiūriu vieni reikšmingiausių yra fenoliniai junginiai. Ištirta, jog jie pasižymi antioksidaciniu, priešuždegiminiu, priešvirusiniu, antibakteriniu, priešvėžiniu, kardioapsauginiu poveikiais [1].

Pasaulyje atlikta daug didžiųjų dilgėlių sudėties ir gydomojo poveikio tyrimų, skiriamas dėmesys antioksidaciniams šio augalo tyrimams. Lietuvoje ištirti didžiųjų dilgėlių lektinai, nustatyta jų kiekinė sudėtis ir biologinis aktyvumas, tačiau fenolinių junginių ir jų antioksidacinio aktyvumo tyrimų trūksta.

Fenolinių junginių kokybinė ir kiekinė sudėtis priklauso nuo klimato sąlygų, augalo augimo vietos, vegetacijos periodo. Atsižvelgiant į tai, yra naudinga ištirti šių parametrų įtaką fenolinių junginių kiekinei sudėčiai. Gauti tyrimų rezultatai suteiks žinių apie didžiųjų dilgėlių fenolinių junginių sudėties ir antioksidacinio aktyvumo įvairavimą žaliavose, surinktose vegetacijos laikotarpiu ir skirtingose Lietuvos vietovėse.

Šio darbo tikslas: nustatyti natūraliai Lietuvoje augančių didžiųjų dilgėlių (*Urtica dioica* L.) kaupiamų fenolinių junginių kokybinę ir kiekinę sudėtį bei įvertinti antioksidacinį aktyvumą.

# DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

**Darbo tikslas:** nustatyti vegetacijos laikotarpiu ir skirtinguose Lietuvos regionuose natūraliai augančių dilgėlių (*Urtica dioica* L.) šaknų, stiebų ir lapų fenolinių junginių kokybinę, kiekinę sudėtį ir įvertinti antioksidacinį aktyvumą.

**Darbo uždaviniai:**

1. Parinkti didžiųjų dilgėlių šaknų, stiebų ir lapų fenolinių junginių optimalias ekstrakcijos sąlygas.
2. Nustatyti Lietuvos natūraliose augavietėse augančių didžiųjų dilgėlių šaknų, stiebų ir lapų mėginiuose suminį flavonoidų, bendrą fenolinių junginių ir hidroksicinamono rūgšties darinių kiekį.
3. Nustatyti fenolinių junginių ir flavonoidų kiekio įvairavimą dilgėlių šaknų, stiebų ir lapų mėginiuose vegetacijos laikotarpiu.
4. Ištirti didžiųjų dilgėlių fenolinių junginių kokybinę ir kiekinę sudėtį ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodu.
5. Nustatyti didžiųjų dilgėlių šaknų, stiebų ir lapų antioksidacinio aktyvumo įvairavimą vegetacijos laikotarpiu ir skirtingose Lietuvos augavietėse.
6. Įvertinti koreliacinius ryšius tarp didžiųjų dilgėlių mėginių fenolinių junginių kiekio ir jų ištraukų antioksidacinio aktyvumo.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Didžiųjų dilgėlių (*Urtica dioica* L.) morfologiniai požymiai ir paplitimas

Didžioji dilgėlė (*Urtica dioica* L.) – dilgėlinių (*Urticaceae*) šeimos daugiametis 60–150 cm aukščio žolinis augalas, apaugęs dilginamaisiais plaukeliais (1 pav.). Lapai priešiniai, ovalios arba kiaušiniškos formos, dantytais kraštais, smailėjančia viršūne. Lapo viršutinė pusė yra tamsiai žalios, apatinė pilkšvai žalios spalvos. Stiebas keturbriaunis, stačias, siekia iki 1 m aukščio. Lapai ir stiebai apaugę trapiais dilginamaisiais plaukeliais, savo sudėtyje turinčiais dirginančių medžiagų. Šakniastiebis briaunuotas, ilgas, geltonos spalvos. Vaisius – ovalios formos riešutėlis. Didžioji dilgėlė yra dvinamis augalas – vyriški ir moteriški žiedai susidaro ant skirtingų augalų [1, 2].

Didžioji dilgėlė žydi birželio–spalio mėnesiais, sėklos sunoksta liepos–spalio mėnesiais. Dauginasi sėklomis bei šakniastiebiais. Vaistinei žaliavai vartojama dilgėlių žolė renkama birželį– rugpjūtį, šaknys anksti pavasarį arba vėlai rudenį, vaisiai renkami liepą–rupjūtį [2].

***1 pav. Didžioji dilgėlė (Urtica dioica L.)***

Šis augalas auga vidutinio klimato juostoje, daugelyje Europos šalių, Azijoje, JAV, Kanadoje, Afrikoje, Pietų Amerikoje, Australijoje. Indijoje esančiuose Himalajų kalnuose dilgėlių randama net 3000 metrų aukštyje. Lietuvoje tai labai paplitęs ir dažnas augalas, auga drėgnose ir derlingose vietose, miškuose, patvoriuose, soduose, pievose [2, 3].

Pagal Europos farmakopėją, kaip vaistinė augalinė žaliava vartojami didžiųjų dilgėlių lapai ir šaknys, nuodžiūvio šiose žaliavose gali būti ne daugiau kaip 12 proc. [4].

## 1.2. Didžiųjų dilgėlių biologiškai aktyvios medžiagos

Mokslinėje literatūroje yra pateikta nemažai didžiųjų dilgėlių fitocheminės sudėties tyrimų. Biologiškai aktyvios medžiagos dilgėlėse nustatytos taikant dujų chromatografijos [5, 6], efektyviosios skysčių chromatografijos [7, 8], atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos [9, 10] metodus. Apžvelgus literatūra, įvertinta *Urtica dioica* L. antžeminės dalies ir šaknų fitocheminė sudėtis.

**Antžeminė dalis:**

- Flavonoidai: rutinas, kemferolio-3-O-rutinozidas, izoramnetinas, izoramnetino-3-O-gliukozidas, kvercetinas.
- Organinės rūgštys: kavos rūgštis ir jos esteriai, ferulo rūgštis, chlorogeninė rūgštis, chino, citrinos, fumaro, siringo, galo ir fosforo rūgštys, skruzdžių, salicilo, oksalo, fosforo rūgštys.
- Mineralai ir mikroelementai: kalcis (853–1050 mg/100 g), kalis (532–613 mg/100g), magnis (175 mg/100g), fosforas (50–265 mg/100g), geležis (2–200 mg/100g), natris (16–58 mg/100 g), siera, cinkas, manganas, varis, nikelis, selenas.
- Eteriniai aliejai: karvakrolis (38,2 proc.), karvonas (9,0 proc.), naftalenas (8,9 proc.), anetolis (4,7 proc.), heksahidrofarnesil acetonas (31,20 proc.), α-jononas (4,04 proc.), geranilacetatas (2,9 proc.).
- Vitaminai: A, $B_2$, $B_5$ , $B_9$, K, C.
- Karotinoidai: liuteinas, β-karotinas, ksantofilas [11, 12, 13, 14, 15, 18].

Dilginimo pojūtį sukelia lapų trichomose esančios medžiagos: acetilcholinas, histaminas, serotoninas, leukotrienai, skruzdžių rūgštis, silicis [16]. Pakistano mokslininkai išskyrė ir identifikavo naują fenolinį junginį didžiųjų dilgėlių etilacetato ekstrakte – diokanolį [17].

**Šaknys:**

- Polisacharidai: gliukanai, arabinogalaktanai, ramnogalakturonai.
- Flavonoidai: miricetinas, kvercetinas, kemferolis, rutinas, kemferolio-3-O-rutinozidas, izoramnetinas.
- Lektinai: specifinis *Urtica dioica* L. agliutininas (UDA), sudarytas iš 89 aminorūgščių.
- Fitosteroliai: β-sitosterolis, β-sitosterolio-3-O-β-gliukozidas, stigmasterolis.
- Lignanai: sekoizolaricirezinolis, pinorezinolis, 3,4-divanililtetrahidrofuranas.
- Kumarinai: skopoletinas [19, 20, 21].

## 1.3. Didžiųjų dilgėlių žaliavų preparatų farmakologinės savybės

Nuo seniausių laikų žmonės naudojo šviežias dilgėles reumatoidinio artrito, raumenų paralyžiaus, juosmens ir nugaros skausmo mažinimui [13]. Liaudies medicinoje didžiųjų dilgėlių preparatai taip pat vartojami palengvinti pilvo skausmą, pykinimą, viduriavimą. Preparatai vartojami šlapimo takų infekcijų gydymui, turi diuretinį poveikį, stabdo kraujavimą. Išoriškai lapų ir stiebų nuoviras padeda gydant odos ligas, podagrą, stiprinant plaukus, slopinant reumatinius ir neuralginius

skausmus. Sirupas pagamintas iš šaknų ar lapų sulčių sumažina bronchų ir astmos sutrikimus. Manoma, jog dilgėlių sultys stimuliuoja virškinimo sistemą ir pieno laktacijos procesą [2, 22, 23].

**Antidiabetinis poveikis:** Tradicinėje medicinoje diabeto gydymui vartojami didžiosios dilgėlės lapai. Nustatyta, jog dilgėlių lapų ekstraktai pasižymi PPAR-alfa agonistiniu, α-gliukozidazę inhibuojančiu bei insulino sekreciją skatinančiu poveikiu [24]. Cholinas, esantis dilgėlių lapų ekstrakte, padeda išvengti dažnos diabeto komplikacijos – aterosklerozinių plokštelių susidarymo kraujagyslių sienelėse [15]. Klinikinio tyrimo, kurio metu buvo įvertintas didžiųjų dilgėlių ekstrakto poveikis ir efektyvumas gydant cukrinį diabetą, rezultatai parodė, jog dilgėlių lapų ekstraktas reikšmingai sumažina cukriniu diabetu sergančiu žmonių gliukozės bei glikozilinto hemoglobino kiekį kraujyje, nesukelia toksinio poveikio tiriamųjų inkstams ir kepenims, padidina insulino koncentraciją kraujyje; vartojant dilgėlių lapų ekstraktą suaktyvėja β-ląstelių funkcija ir jautrumas insulinui [25]. Taip pat nustatyta, jog didžiosios dilgėlės lapų ekstraktai turi potencialų antilipideminį poveikį sumažindami cholesterolio, lipidų ir lipoproteinų koncentraciją kraujyje [26, 27]. *Urtica dioica* L. ekstraktas turi teigiamą poveikį kitai dažnai diabeto komplikacijai – arterinei hipertenzijai. Nustatyta, jog didžiosios dilgėlės lapų ekstraktas sukelia hipotenzinį poveikį. Iš endotelio išsiskyręs azoto oksidas ir kalio kanalų atsidarymas sukelia vazorelaksacinį poveikį, kurio metu sumažėja kraujo spaudimas [28]. Taigi, didžiųjų dilgėlių ekstraktą rekomenduojama vartoti kaip antioksidantą papildomam diabeto gydymui, nes jis gali sumažinti širdies ir kraujagyslių sistemos ligų bei kitų komplikacijų atsiradimo riziką [29].

**Poveikis gėrybinei prostatos hiperplazijai.** Atlikti klinikiniai tyrimai rodo, kad dilgėlių šaknų ekstraktas sumažina padidėjusią prostatą ir palengvina su šia liga susijusius simptomus. Už šį poveikį atsakingi dilgėlių šaknyse esantys lektinai, polisacharidai, steroliai ir lignanai. Šios medžiagos blokuoja 5α-reduktazės fermentų aktyvumą, slopina testosterono virtimą dihidrotestosteronu. Sumažėjęs dihidrotestosterono jungimąsis prie androgenų receptorių lemia prostatos uždegimo ir paburkimo sumažėjimą. Taip pat teigiama, jog lignanai, esantys dilgėlėje, slopina lytinius hormonus sujungiančio globulino prisijungimą prie jo receptorių žmogaus prostatos ląstelių membranoje. Tuo tarpu polisacharidai ir lektinai slopina ryšį tarp epidermio augimo faktoriaus ir jo receptorių, lėtėja prostatos ląstelių metabolizmas, slopinamas ir jų augimas. Lektinai taip pat prisideda prie antiproliferacinės ir priešuždegiminės veiklos prostatoje [30, 31, 32, 33]. Atliktame klinikiname tyrime 558 pacientai (55–72 metų amžiaus) 6 mėnesius tris kartus per dieną vartojo 120 mg didžiųjų dilgėlių šaknų ekstraktą arba placebą. 81 proc. pacientų, vartojusių dilgėlių šaknų ekstratą, nustatytas apatinių šlapimo takų simptomų pagerėjimas, palyginti su 16 proc. placebo grupėje. Tiriamojoje grupėje taip pat reikšmingai sumažėjo tarptautinės prostatos simptomų skalės balų suma, prostatos specifinio antigeno kiekis kraujyje bei prostatos dydis [34].

**Antibakterinis ir antimikrobinis poveikis.** Atlikta tyrimų, įrodančių dilgėlių antibakterinį aktyvumą. Antibakterinis *Urtica dioica* L. antžeminės dalies etanolinio ekstrakto aktyvumas *in vitro*

prieš aštuonias skirtingas bakterijų padermes atliktas taikant Kirby-Bauer indikatorinių diskų metodą. Rezultatai parodė, jog didžiųjų dilgėlių ekstraktas yra veiksminga antibakterinė priemonė prieš *S. aureus, E. coli* ir *S. epidermidis* padermes [35]. Metanolinis *Urtica dioica* L. lapų ekstraktas pasižymi antibakteriniu poveikiu prieš meticilinui atsparius *S. aureus* patogenus [36, 37]. Gulcin ir kt. atlikto tyrimo metu, buvo tirtas didžiųjų dilgėlių lapų vandeninio ekstrakto antimikrobinis aktyvumas prieš devynis skirtingus mikrobus (*E. coli, S. aureus, Citrobacter koseri, S. pneumonia, P. aeruginosa, Proteus mirabilis, Enterobacter aerogenes, M. luteus, S. epidermidis*) ir grybelį (*Candida albicans*). Tyrimo rezultatai parodė, jog *Urtica dioica* L. ekstraktas pasižymėjo antimikrobiniu aktyvumu prieš daugelį mikrobų rūšių, o stipriausiai veikė *S. aureus* bakterijas [38].

**Priešuždegiminis poveikis.** Priešuždegiminis didžiųjų dilgėlių aktyvumas dažniausiai siejamas su jų vartojimu gydant artritą ir alerginį rinitą. *In vitro* tyrimas patvirtino didžiųjų dilgėlių lapų priešuždegimines savybes alerginio rinito atveju ir nustatė, kad veikimo mechanizmas yra pagrįstas ciklooksigenazių slopinimu ir putliųjų ląstelių triptazės inhibavimu. Tai lemia sumažėjusį uždegimo mediatorių prostaglandinų ir citokinų kiekį [40]. Atliktame klinikiname tyrime nustatyta, jog dilgėlių lapų ekstraktas lyginant su placebu ženkliai sumažino alerginio rinito sukeltus simptomus, o tiriant nosies sekretą pastebėtas reikšmingas eozinofilų kiekio sumažėjimas [41]. Gydant artritą, *Urtica dioica* L. lapų ekstrakto priešuždegiminis poveikis lemia NF-kB faktoriaus, atsakingo už uždegimo mediatorių susidarymą ir genų raišką, slopinimą [42]. Johnson ir kt. ištyrė dilgėlių šaknų, stiebų, lapų ir žiedų ekstraktų priešuždegiminį aktyvumą, atliekant NF-kB liuciferazės ir MTT citotoksiškumo tyrimus. Rezultatai patvirtino, jog didžiųjų dilgėlių ekstraktų sudėtyje yra biologiškai aktyvių junginių, lemiančių ekstraktų priešuždegiminį aktyvumą [43]. *Urtica dioica* L. lapų ekstraktas parodė reikšmingą efektyvumą ir 2 tipo cukriniu diabetu sergančių pacientų uždegiminiams rodikliams. 8 savaites vartojant 100 mg/kg dilgėlių lapų ekstrakto, ženkliai sumažėjo interleukino 6 (IL-6) ir didelio jautrumo C-reaktyvaus baltymo kiekiai [44, 43].

**Hepatoprotekcinis poveikis.** *Urtica dioica* L. ekstrakte esanti ferulo rūgštis pasižymi hepatoprotekciniu poveikiu $CCl_4$ sukeltam hepatotoksiniam poveikiui *in vitro* HepG2 ląstelėse ir *in vivo* žiurkėse [45]. Didžiųjų dilgėlių lapų ekstraktas sumažina alanino transaminazės, aspartato transaminazės, šarminės fosfatazės, kreatinino, bendro bilirubino kiekius kepenyse [46, 47]. Didžiųjų dilgėlių sėklų ekstraktas veikia hepatoprotekciškai kepenų pažeidimams, atsiradusiem dėl išemijos-reperfuzijos, padidindamas paraoksonazės, arilesterazės ir kepenų fermento katalazės aktyvumą [48].

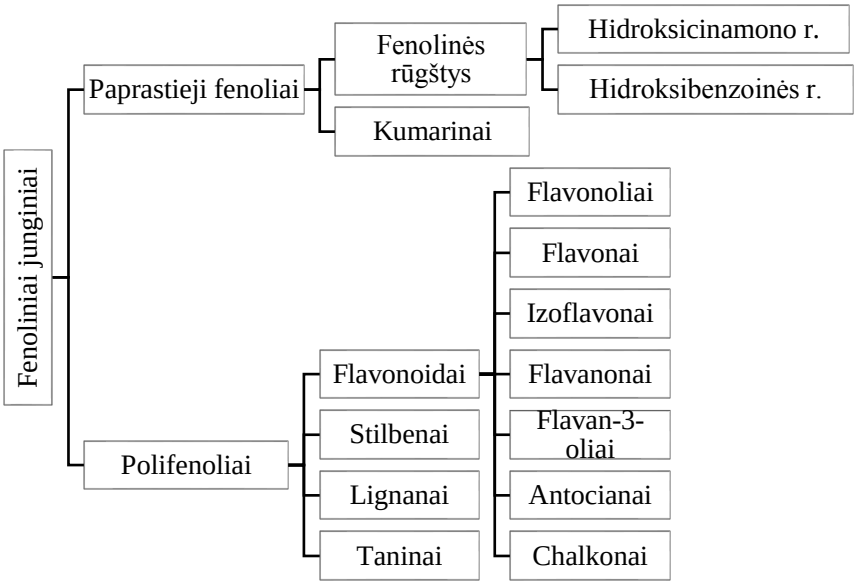
**Antioksidacinis poveikis.** Dilgėlių ekstraktuose yra biologiškai aktyvių junginių, atsakingų už antioksidacinį aktyvumą. Vandeniniai 50, 100 ir 250 µg dilgėlių lapų ekstraktai sukėlė linolo rūgšties emulsijos peroksidacijos slopinimą atitinkamai 39, 66 ir 98 proc., tuo tarpu 60 µg/ml tokoferolio sukėlė tik 30 proc. slopinimą. Dilgėlių ekstraktas pasižymi didele redukcine galia, laisvųjų ir superoksido radikalų surišimu, vandenilio peroksido surišimu, metalų chelatiniu aktyvumu [38, 49]. Didžiųjų dilgėlių

antioksidacinis aktyvumas panašus į tokoferolio, askorbo rūgšties, butilinto hidroksianisolo. Veikiant šio vaistinio augalo ekstraktams, reikšmingai sumažėja malono dialdehido, atspindinčio oksidacijos procesų intensyvumą, kiekis, taip pat ženkliai padidėja superoksido dismutazės kiekis, kuri apsaugo ląsteles ir audinius nuo laisvųjų radikalų žalos. Teigiama, jog fenoliniai junginiai, esantys dilgėlių ekstrakte, slopina lipidų peroksidaciją ir antioksidacinių fermentų veiklą, taip stabdydami naviko susidarymą [50].

## 1.4. Fenolinių junginių apžvalga, klasifikacija

Fenoliniai junginiai – aromatiniai junginiai, antriniai augalų metabolitai, turintys vieną ar daugiau hidroksilo grupę, prijungtą prie aromatinio žiedo [51]. Augaluose jie susidaro iš pentozės fosfato, šikimato ir fenilpropanoido [52]. Fenoliniai junginiai yra viena iš dažniausiai aptinkamų biologiškai aktyvių junginių grupių augaluose ir yra plačiai tyrinėjami mokslininkų dėl plataus poveikio spektro. Yra žinoma ir aprašyta daugiau kaip 10 000 fenolinių junginių [51].

Atsižvelgiant į fenolinių grupių skaičių, fenoliniai junginiai skiriami į paprastuosius fenolius ir polifenolius. Dauguma fenolių susijungia su monosacharidais, polisacharidais, esteriais. Galima fenolinių junginių klasifikacija pagal anglies atomų skaičių, kuris yra prisijungęs prie pagrindinės fenolinės struktūros [53, 84] (2 pav).




***2 pav. Fenolinių junginių klasifikacija***

### 1.4.1. Flavonoidai

Flavonoidai yra didžiausia augalinių polifenolinių junginių klasė, jie sudaro daugiau nei pusę visų fenolinių junginių. Jie yra antriniai augalų metabolitai, sintezuojami fenilpropanoidiniu keliu ir yra atsakingi už daugelį farmakologinių poveikių [54]. Flavonoidai plačiai paplitę augalų karalystėje, jų aptinkama vaistažolėse, vaisiuose, daržovėse, grūduose, žievėje, šaknyse, stiebuose, žieduose, arbatoje, vyne [55]. Flavonoidai siejami su teigiamu poveikiu sveikatai, todėl yra vartojami farmacijos, medicinos ir kosmetikos srityse. Šie junginiai turi antioksidacinių, priešuždegiminių, antimutageninių, antikarcinogeninių, antivirusinių, antibakterinių, antiišeminių, vazodilatacinių savybių. Žinoma ir tai, jog flavonoidai yra stiprūs kai kurių fermentų inhibitoriai, pvz.: ksantino oksidazės, ciklooksigenazės, lipoksigenazės ir fosfoinozito-3-kinazės [56, 57, 58]. Flavonoidams yra būdinga $C_6$-$C_3$-$C_6$ konfigūracija, jie sudaryti iš 15 anglies atomų. Flavonoidų struktūra susideda iš dviejų aromatinių žiedų, sujungtų pirano žiedu. Augaluose naturaliai jie randami aglikonų, glikozidų ir metilintų darinių pavidalu. Flavonoidai jungiasi su glikozidais: gliukoze, ramnoze, ksiloze ir kitais. Flavonoiduose cukraus liekana dažniausiai jungiasi C3 ir C7 padėtyse [59, 60].

Augaluose flavonoidai atlieka svarbų vaidmenį dauginantis, apsisaugant nuo patogenų. Fenoliniai junginiai suteikia augalams ir daržovėms spalvą, juslines savybes, taip pritraukia vabzdžius apdulkinimui. Jie apsaugo augalą nuo ultravioletinių spindulių poveikio, padeda prisitaikyti prie naujų klimato sąlygų [60, 61].

Flavonoidai atlieka svarbų vaidmenį žmonių sveikatai. Šie junginiai turi daug naudingų savybių, tačiau plačiausiai ištirta ir didžiausią susidomėjimą kelia jų gebėjimas veikti kaip antioksidantams, užkertant kelią ligoms, susijusioms su oksidaciniu stresu. Flavonoidai pasižymi apsauginiu poveikiu daugeliui infekcinių (bakterinių ir virusinių ligų) ir degeneracinių ligų, tokių kaip širdies ir kraujagyslių ligos, vėžys ir kitos su amžiumi susijusios ligos [62]. Jie slopina uždegimo mediatorius ciklooksigenazę ir lipooksigenazę, kurie katalizuoja arachidono rūgšties virtimą į prostaglandinus ir tromboksanus [56]. Mažėjant prostaglandinų koncentracijai, slopinamas uždegimas, o mažėjant tromboksano kiekiui, slopinama trombocitų agregacija. Ištirtas ir anticholinesterazinis aktyvumas – jis pasireiškia blokuojant sinapsiniame plyšyje esantį fermentą acetilcholinesterazę, tokiu būdu gerėja cholinerginė funkcija. Šis poveikis svarbus Alzhaimerio ligos gydyme [63]. Flavonoidai veikia kaip insulino receptorių aktyvatoriai ir mažina diabeto sukeltas komplikacijas [15, 24]. Taip pat jie veikia antihipertenziškai, mažina širdies ir kraujagyslių ligų riziką, veikia antilipidemiškai [26, 28]. Flavonoidai slopina fermentą ksantino oksidazę, kuris katalizuoja purinį virtimą šlapimo rūgštimi. Hiperurikemija, šlapimo rūgšties koncentracijos padidėjimas kraujyje, sukelia tokias komplikacijas kaip podagra ar inkstų akmenligė [64]. Taip pat šie junginiai slopina tumorigenezę ir žmogaus krūties vėžio ląstelių augimą – priešvėžinis flavonoidų aktyvumas siejamas su laisvųjų radikalų surišimu, tokiu būdu

stabdant ląstelių mutacijas. Slavonoidai stabdo ir angiogenezę – nesusidaro naujos kraujagyslės, tad navikas nebeaprūpinamas krauju žūva [65].

### 1.4.2. Fenolinės rūgštys

Fenolinės rūgštys – fenoliniai junginiai, kurie turi vieną karboksirūgšties funkcinę grupę. Jos skirtomi skirstomos į dvi grupes:

1. Hidroksibenzoinės rūgštys – turi C6-C1 fragmentą (pvz.: galo rūgštis, siringinė, hidroksibenzoinė, protokatechino rūgštis);
2. Hidrocinamono rūgštys – turi C6-C3 fragmentą (chlorogeno, kavos, ferulo, sinapo, hidroksicinamono rūgštys).

Nors pagrindinė struktūra vienoda, fenolinės rūgštys viena nuo kitos skiriasi hidroksilo grupių skaičiumi ir padėtimi. Mažai rūgščių egzistuoja laisva forma, dauguma susijungia su esteriais, eteriais, acetalinėmis jungtimis su augalų struktūriniais komponentais (celiulioze, baltymais, ligninu), didesniais polifenoliniais junginiais ar mažesnėmis organinėmis molekulėmis [66]. Fenolinės rūgštys augaluose dalyvauja įvairiuose procesuose: maisto medžiagų įsisavinime, baltymų sintezėje, fermentų aktyvacijoje, fotosintezėje [67]. Taip pat nustatyta, kad fenolinės rūgštys turi savybių, naudingų žmonių sveikatai. Jos svarbios dėl antioksidacinio ir priešvėžinio aktyvumo, antibakterinio, priešuždegimio ir antivirusinio poveikio. Kofeino rūgštis, viena iš dažniausių hidroksicinamonų rūgščių, palengvina astmą ir alergines reakcijas. Ji selektyviai blokuoja leukotrienų, sukeliančių bronchų spazmus, biosintezę [66].

## 1.5. Fenolinių junginių kokybinio ir kiekybinio nustatymo metodai

Fenolinių junginių nustatymui itin svarbus etapas yra ekstrakcija iš augalinės žaliavos. Fenoliniai junginiai gali būti ekstrahuojami iš šviežių, šaldytų ar džiovintų augalinių žaliavų. Ekstrakcija tirpikliais yra plačiausiai naudojamas ekstrakcijos būdas, nes yra paprastas, efektyvus, plataus pritaikymo. Ekstrakcijos efektyvumas priklauso nuo tirpiklio parinkimo, laiko, temperatūros, žaliavos ir tirpiklio santykio, mėginio cheminų ir fizinių savybių. Ekstrakcijai naudojami tirpikliai, tokie kaip etanolis, metanolis, acetonas, etilacetatas ir kiti. Nuo pasirinkto tirpiklio priklauso išekstrahuotų fenolinių junginių kiekis. Nustatyta, jog metanolis yra efektyvus tirpiklis ekstrahuojant mažos molekulinės masės polifenolius, tuo tarpu didesnės molekulinės masės junginiai geriau ekstrahuojami acetono ir vandens mišiniu. Taip pat efektyviai polifenolius ekstrahuoja įvairių koncentracijų etanolis.

Ruošiant ekstraktus iš antocianų turinčių augalinių žaliavų, naudojami parūgštinti organiniai tirpikliai [68].

Šiuo metu yra sukurta ir aprašyta daug ekstrakcijos metodų. Tradiciniai metodai, tokie kaip maceracija ar ekstrakcija Soksleto aparatu yra mažiau efektyvūs, jų metu sunaudojami dideli organinių tirpiklių kiekiai. Sukurti nauji metodai: ekstrakcija mikrobangomis, ultragarsu, superkritinių skysčių, suslėgtų skysčių ekstrakcija. Ekstrakcija ultragarsu yra vienas iš dažniausiai naudojamų ekstrakcijos metodų dėl paprastos aparatūros, efektyvumo, pigumo [68, 81]. Serbijos mokslininkai optimizavo didžiųjų dilgėlių ekstrakcijos ultragarso bangomis metodiką, taikydami paviršiaus-atsako metodą. Pasirinkta įvertinti metanolio koncentracijos (50–100 proc.) ir ekstrakcijos laiko (30–90 min.) įtaką bendro fenolinių junginių kiekio nustatymui *Urtica dioica* L. ekstraktuose. Nustatyta, jog didžiausias fenolinių junginių kiekis žaliavų ėminiuose yra atliekant ekstrakciją 54 proc. metanoliu 38 min. ultragarso vonelėje, o didėjant metanolio koncentracijai bendras fenolinių junginių kiekis mažėja [69]. Tuo tarpu mokslininkai Libane ištyrė, jog didžiųjų dilgėlių ekstrakcija mikrobangų pagalba turi daugiausiai privalumų lyginant su kitais metodais – trumpesnis ekstrakcijos laikas, didesnis efektyvumas, sunaudojamas mažesnis tirpiklio kiekis [70].

Siekiant tiksliai įvertinti kokybinę ir kiekinę fenolinių junginių sudėtį išekstrahuotoje augalinėje žaliavoje, svarbu tinkamai parinkti nustatymo metodą. Moksliniuose tyrimuose aprašoma daug metodų, tinkamiausias pasirenkamas pagal jautrumą, atrankumą, efektyvumą. Plačiausiai taikomi spektrofotometriniai metodai, efektyvioji skysčių chromatografija, dujų chromatografija ir jų deriniai su masių spektrometrija, didelės spartos priešpriešinė chromatografija, plonasluoksnė chromatografija, kapiliarinė elektroforezė [71].

### 1.5.1. Spektrofotometriniai metodai

Spektrofotometrija – paprastas augalų fenolinių junginių kiekinės sudėties įvertinimo būdas. Analizės metu tiriami ultravioletinis ir regimasis spektrai. Dėl fenolinių junginių struktūroje esančių aromatinių žiedų, šios medžiagos gali absorbuoti UV šviesą [59]. Spektrofotometriniai metodai fenoliniams junginiams nustatyti yra paprasti, greiti, ekonomiški, jais galima ištirti daug mėginių per trumpą laiką [71]. Spektrofotometriniais analizės metodais išmatuojamas ne tik tam tikrų biologiškai aktyvių medžiagų kiekis, bet taip pat ir antioksidacinis aktyvumas [49].

Fenolinių junginių nustatymui daugelį metų plačiausiai naudojami Folin-Ciocalteu, Folin-Denis metodai [72]. Taikant Folin-Ciocalteu metodą, fenoliniai junginiai šarminėje terpėje redukuoja fosfomolibdato ir fosfovolframo rūgščių reagentą (Folin-Ciocalteu), susidaro mėlynos spalvos junginys, kurio absorbcija matuojama 760 nm bangos ilgyje. Standartu dažnai pasirekama galo rūgštis, rezultatai

išreiškiami galo rūgšties ekvivalentu mg/g. Metodas turi trūkumą, jog reagentai reaguoja ne tik su fenoliais, bet taip pat ir su kitomis medžiagomis, pvz.: askorbo rūgštimi, aromatiniais aminais, cukrumi [68, 73].

Bendram flavonoidų kiekiui išmatuoti naudojama reakcija su $AlCl_3$. Šio metodo metu, aliuminio chloridas suformuoja stabilius rūgštinius junginius flavonuose ir flavonoliuose su C-4 keto grupėmis ir C-3 ar C-5 hidroksilo grupėmis. Naudojamo aliuminio chlorido tirpalo koncentracija pasirenkama nuo 2 iki 10 proc., o absorbcijos matavimai atliekami po 2–60 minučių, esant 404–430 nm bangos ilgiui. Standartais pasirenkamos medžiagos: kvercetinas, rutinas, galanginas, kvercetrinas [74].

Flavanonų ir dihidroflavonolių nustatymui naudojamas 2,4-dinitrofenilhidrazinas. Metodas grindžiamas tuo, kad 2,4-dinitrofenilhidrazinas sureaguoja su ketonine ar aldehidine grupe, susidarant 2,4-dinitrofenilhidrazonui. Reakcija vykdoma metanolio aplinkoje, absorbcija matuojama praėjus 10– 15 min. 486 nm bangos ilgyje. Standartu naudojamas pinokembrinas [75].

Vanilino ir DMCA – paprasti, jautrūs ir specifiški metodai naudojami flavan-3-olių ir proantocianidinų nustatymui augalinėje žaliavoje. Vanilino metodu nustatomi flavan-3-olių ir proantocianidinų polimerizacijos laipsniai, stereochemija, hidroksilinimo būdas. Kaip standartas dažniausiai naudojamas katechinas [72 ,76]. DMCA metodas taip pat naudojamas proantocianidinų nustatymui. Proantocianidinams ir flavan-3-oliams sureagavus su 4-(dimetilamino)-cinamaldehidu susidaro žalios spalvos chromoforas, kurio absorbcija matuojama ties 640 nm bangos ilgiu [77].

Literatūroje aprašomas metodas fenolinių rūgščių nustatymui, naudojant Arnow reagentą (10 proc. natrio molibdatas ir 10 proc. natrio nitritas santykiu 1:1). Tiriamųjų mėginių absorbcija matuojama esant 505–525 nm bangos ilgiui. Suminis hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis išreiškiamas naudojant chlorogeno arba kavos rūgšties standartą [78, 79].

### 1.5.2. Chromatografiniai metodai

Efektyvioji skysčių chromatografija ir dujų chromatografija bei jų deriniai su masių spektrometrija yra dažniausiai taikomi metodai fenolinių junginių kiekinės sudėties nustatymui [72]. Efektyvioji skysčių chromatografija – plačiausiai naudojamas fenolinių junginių atskyrimo, kokybinio ir kiekinio nustatymo metodas, kuriam būdingas didelis jautrumas [71]. Tokie faktoriai kaip mėginių grynumas, judančioji fazė, kolonėlių tipai ir detektorius yra svarbūs metodo tikslumui. Acetonitrilas ir metanolis yra dažniausiai naudojamos judančios fazės, nustatant fenolinius junginius ESC metodu. Norint išvengti fenolių jonizacijos, rekomenduojama judriosios fazės pH palaikyti 2–4 intervale. Dažnai taikomas izokratinis eliuavimo metodas [72]. Didžiųjų dilgėlių ekstraktuose esančių fenolinių junginių detekcijai atlikti naudojami ultravioletinio-regimojo spektro (UV/Vis), diodų matricos, fluorescencinis,

masių spektrofometrinis detektoriai [71, 8]. Fenolinių junginių kiekinės sudėties nustatymui dažnai naudojamas efektyviosios skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos metodas [22, 80].

Dujų chromatografija – metodas, taikomas fenolinių junginių, fenolinių rūgščių, taninų ir flavonoidų atskyrimui, identifikavimui ir kiekiniam nustatymui. Dėl mažo fenolinių junginių lakumo, šis metodas nėra itin dažnai naudojamas. Taikant dujų chromatografiją, kiekinis fenolinių rūgščių nustatymas gali būti atliktas kartu su ekstraktų gryninimu – iš ekstrakto pašalinami lipidai, nutraukiami glikozidiniai ir esteriniai ryšiai, vykdant chemines modifikacijas fenoliniai junginiai paverčiami lakesniais dariniais [72].

### 1.5.3. Kapiliarinė elektroforezė

Kapiliarinė elektroforezė – alternatyvus kiekinės sudėties nustatymo metodas, ypač tinkantis mažos ir vidutinės molekulinės masės fenoliniams junginiams. Metodas vis dažniau taikomas dėl didelio efektyvumo, didelės skiriamosios gebos, trumpo analizės laiko ir mažo mėginio ir reagentų suvartojimo. Vienas iš trūkumų, palyginant su ESC ar dujų chromatografija, yra mažas jautrumas ir blogesnis kiekinių rezultatų atkartojamumas [71].

Genzera ir kt. panaudojo kapiliarinę elektroforezę *Urtica dioica* L. izolektinų kokybinei ir kiekinei analizei. Rezultatai, gauti naudojant kapiliarinę elektroforezę, buvo panašūs į ESC analizės duomenis. Lyginant su skysčių chromatografija, kapiliarinė elektroforezė nesiskyrė kokybinės ir kiekinės sudėties rezultatais. Tačiau teigiama, jog vertinant skiriamąją galią ir atskyrimo laiką, kapiliarinės elektroforezės metodas yra pranašesnis už skysčių chromatografiją [83].

# 2. TYRIMO METODIKA

## 2.1. Tyrimo objektas

Tirti didžiųjų dilgėlių (*Urtica dioica* L.) lapų, stiebų ir šaknų ėminiai, surinkti 7 skirtinguose Lietuvos regionuose 2017 metais rugpjūčio ir rugsėjo mėnesiais. Kiekviename regione surinktos trys *Urtica dioca* L. vaistinės žaliavos: lapai, stiebai ir šaknys (1 lentelė).

***1 lentelė. Tiriamųjų vaistinių augalinių žaliavų rinkimo vieta ir data***

| Žaliavos rinkimo vieta | Žaliavos rinkimo data |
|---|---|
| Vilniaus raj., Panerių sen. | 2017-09-24 |
| Kauno raj., Domeikavos sen. | 2017-09-22 |
| Jurbarko raj., Girdžių sen. | 2017-08-28 |
| Vilkaviškis | 2017-09-05 |
| Ignalinos raj., Trainiškio k. | 2017-08-20 |
| Tauragės raj., Dauglaukio k. | 2017-09-17 |
| Rokiškis | 2017-09-21 |

Vaistinė augalinė žaliava taip pat rinkta 2018 metais birželio–spalio mėnesiais Jurbarko raj., Girdžių sen. (2018-06-02, 2018-06-23, 2018-07-14, 2018-08-04, 2018-08-25, 2018-09-15, 2018-10-06). Surinkta didžiųjų dilgėlių vaistinė augalinė žaliava buvo džiovinama kambario temperatūroje gerai vėdinamoje patalpoje, apsaugota nuo tiesioginių saulės spindulių. Išdžiovinta žaliava buvo laikoma popieriniuose maišeliuose, ne aukštesnėje kaip 25 °C temperatūroje, sausoje ir gerai vėdinamoje vietoje.

## 2.2. Tyrimo metu naudoti reagentai

Tyrimų metu naudoti reagentai: metanolis (≥99,9 proc., SIGMA-ALDRICH, Vokietija), etanolis (96,3 proc., AB „Stumbras“, Kaunas, Lietuva), Folin-Ciocalteu reagentas (Chempur, Lenkija), natrio karbonatas, galo rūgštis, natrio hidroksidas (Chempur, Lenkija), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karbokslinės rūgšties standartas (Trolox), ledinė acto rūgštis, heksametilentetraminas (Lachema, Čekija), aliuminio chloridas, ABTS (2-2’-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninė rūgštis), vandenilio chlorido rūgštis (Sigma-Aldrich, Vokietija), rutino standartas (Extrasynthese, Prancūzija), natrio acetatas (Scharlau, Ispanija), kalio persulfatas, TPTZ (Carl

Roth, Karlsruhe, Vokietija), geležies (III) chlorido heksahidratas (Vaseline-Fabrik Themania, Vokietija), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas), natrio molibdatas (Alfa Aesar, Vokietija), natrio nitritas (Sigma-Aldrich, Vokietija), išgrynintas vanduo.

## 2.3. Tyrimo metu naudota aparatūra

Didžiųjų dilgėlių žaliavos susmulkintos elektiniu malūnėliu „Retsch GM 200" (Vokietija). Žaliavos ir reagentai sveriami analitinėmis svarstyklėmis „Sartorius Cp6M-0CE" (Vokietija). Bandinių ekstrakcija atlikta ultragarso vonelėje „Bandelin Sanorex Digital 10P" (Vokietija). Visi spektrofotometriniai tyrimai atlikti naudojant UV-VIS spektrofotometrą „CamSpec – M550" (Jungtinė Karalystė). Fenolinių junginių identifikavimui ir kiekinės sudėties nustatymui naudota ultraefektyviosios skysčių chromatografijos sistema „Waters" (JAV) su tandeminiu masių spektrometru „Xevo", „Waters" (JAV).

## 2.4. Tiriamųjų ekstraktų paruošimas

Tiriamieji ekstraktai ruošiami atsveriant 1 g (0,001 g tikslumu) sausos susmulkintos *Urtica dioica* L. lapų, stiebų, šaknų vaistinės augalinės žaliavos ir užpilant 30 ml 80 proc. V/V metanoliu. Ekstrakcija vykdoma ultragarso vonelėje 30 min. sandariuose rudo stiklo buteliukuose. Ultragarso bangų dažnis 40 kHz, ekstrakcija pradedama kambario temperatūroje. Gauti ekstraktai filtruojami per 0,2 µm porų dydžio filtravimo popierių ir praskiedžiami 80 proc. metanoliu iki 30 ml.

Nuodžiūvis nustatytas pagal galiojančio leidimo Europos farmakopėjos (Ph. Eur. 2.2.32) nurodytą metodiką. Tiriamoji augalinė žaliava susmulkinta elektriniu malūnėliu, atsverta po 1 g tiriamos augalinės žaliavos ir džiovinama 105 °C 2 val. iki pastovios masės. Atlikus analizę, dilgėlių lapuose ir šaknyse nustatytas nuodžiūvis atitiko Europos Farmakopėjos „*Urticae folium*" 01/2011:1897 ir „*Urticae radix*" 01/2015:2538 monografijose reglamentuojamas ribas (ne daugiau kaip 12 proc.) [4].

## 2.5. Tyrimo metodai

### 2.5.1. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas spektrofotometriniu Folin-Ciocalteu metodu. Mėgintuvėlyje 1 ml tiriamojo ekstrakto sumaišoma su 5 ml 10 proc. Folin-Ciocalteu reagento ir pridedama 4 ml 7,5 proc. natrio karbonato tirpalo. Mėginiai 1 val. laikomi tamsioje vietoje, kambario temperatūroje. Lyginamasis tirpalas ruošiamas taip pat, tik vietoje 1 ml tiriamojo ekstrakto pilama 1 ml 80 proc. (V/V) metanolio. Spektrofotometru matuojama absorbcija 765 nm bangos ilgyje.

Kalibracinės kreivės **($y = 0{,}8736x + 0{,}044$; $R^2 = 0{,}9974$)** sudarymui naudojami skirtingų koncentracijų galo rūgšties tirpalai (0–1 mg/ml). Bendras fenolinių junginių kiekis išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentu gramui sausos žaliavos (mg/g) ir yra apskaičiuojamas pagal formulę:

$$X = \frac{C \times V \times a}{m}; mg/g$$

C – galo rūgšties koncentracija (mg/ml) nustatyta iš kalibracinės kreivės;

V – pagaminto ekstrakto tūris (ml);

a – skiedimo faktorius;

m – sausos žaliavos masė (g).

### 2.5.2. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

Paruoštuose didžiųjų dilgėlių ekstraktuose buvo nustatomas bendras flavonoidų kiekis, išreikštas rutino ekvivalentu. Pagaminamas pradinis reagentas tyrimui atlikti: 60 ml 99,6 proc. metanolio sumaišoma su 3 ml 33 proc. acto rūgštimi, 12 ml 5 proc. heksametilentetraminu, 9 ml 10 proc. aliuminio chlorido tirpalu ir pridedama 60 ml išgryninto vandens. Analizei 1920 µl paruošto tirpalo sumaišoma su 80 µl vaistinės augalinės žaliavos ekstrakto. Palyginamasis tirpalas gaminamas taip pat, tik vietoj vaistinės augalinės žaliavos ekstrakto pilama 80 µl 80 proc. metanolio. Po 30 min. matuojama absorbcija 407 nm bangos ilgyje.

Bendram flavonoidų kiekio nustatymui sudaroma kalibracinė rutino kreivė **($y = 0{,}6823x + 0{,}0299$; $R^2 = 0{,}9944$)**. Jai sudaryti naudojami standartiniai rutino (0–1 mg/l) tirpalai. Bendras flavonoidų kiekis sausoje žaliavoje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$X = \frac{C \times V}{m}; mg/g$$

C - rutino koncentracija (mg/ml), nustatyta iš kalibracinės kreivės;

V- pagaminto ekstrakto tūris (ml);

m - sausos žaliavos masė (g).

### 2.5.3. Hidroksicinamono rūgšties darinių nustatymas spektrofotometriniu metodu

Hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis didžiųjų dilgėlių ekstraktuose nustatomas naudojant Arnow reagentą. Arnow reagentas ruošiamas iš 10 proc. natrio molidbato tirpalo ir 10 proc. natrio nitrito tirpalo santykiu 1:1. Kiekvieno ekstrakto analizei buvo ruošiami tiriamasis ir palyginamasis tirpalai. Analizei buvo imama 1 ml tiriamojo ekstrakto, pridedama 2 ml 0,5 M vandenilio chlorido rūgšties tirpalo, 2 ml Arnow reagento, 2 ml 8,5 proc. natrio hidroksido tirpalo ir praskiedžiama išgrynintu vandeniu iki 10 ml. Palyginamasis tirpalas ruošiamas į 1 ml tiriamojo vaistinės žaliavos ekstrakto įpylus 2 ml 0,5 M vandenilio chlorido rūgšties tirpalo, 2 ml 8,5 proc. natrio hidroksido tirpalo ir praskiedžiant išgrynintu vandeniu iki 10 ml. Spektrofotometru matuojamas tiriamų tirpalų absorbcijos dydis, esant 525 nm šviesos bangos ilgiui.

Hidroksicinamono rūgšties darinių kiekiui apskaičiuoti sudaroma kalibracinė **($y = 0,8858x - 0,0003$; $R^2 = 0,9997$)** chlorogeno rūgšties (0–1,0 mg/ml) standarto kreivė.

### 2.5.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

#### 2.5.4.1. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH radikalų surišimo metodu

0,0012 g DPPH miltelių ištirpinami 50 ml 80 proc. metanolyje. Darbinis tirpalas gaunamas motininį tirpalą skiedžiant 80 proc. metanoliu tol, kol ties 517 nm šviesos bangos ilgiu nustatoma 0,800±0,03 absorbcijos reikšmė. Ruošiant tiriamąjį tirpalą, į mėgintuvėlį pilama 3 ml paruošto darbinio DPPH tirpalo ir įpilama 20 µl tiriamojo didžiųjų dilgėlių ekstrakto. Gautas mišinys gerai išmaišomas ir laikomas 30 min. kambario temperatūroje, tamsioje aplinkoje. Matuojamas absorbcijos pokytis ties 517 nm bangos ilgiu. Kaip lyginamasis tirpalas naudojamas 80 proc. metanolis.

Kalibracinei kreivei **(y = 4E-05x + 0,1577; $R^2$ = 0,9913)** sudaryti naudojami skirtingų koncentracijų trolokso tirpalai (125–16000 µmol/l). Laisvųjų radikalų surišimo geba išreikšta mg/g pagal trolokso ekvivalentą (TE).

### 2.5.4.2. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS katijonų - radikalų surišimo metodu

Paruošiamas 2 mmol/l koncentracijos motininis ABTS tirpalas: tamsaus stiklo buteliuke 0,0548 g ABTS miltelių ištirpinami 50 ml išgrynintojo vandens. Į gautą tirpalą pridedama 0,0095 g kalio persulfato. Gautas motininis tirpalas laikomas tamsioje vietoje 16 val.

Darbinis ABTS tirpalas ruošiamas skiedžiant motininį tirpalą išgrynintu vandeniu tol, kol nustatoma 0,800±0,03 absorbcijos reikšmė, esant 734 nm bangos ilgiui. Kaip palyginamasis tirpalas naudojamas išgrynintas vanduo. Analizei imama 3 ml darbinio ABTS tirpalo, įpilama 20 µl tiriamojo ektrakto ir gerai sumaišoma. Gautas tirpalas laikomas 1 val. tamsioje vietoje, kambario temperatūroje. Absorbcijos pokytis matuojamas spektrofotometru, esant 734 nm bangos ilgiui.

Kalibracinės kreivės **(y = 6E-05x + 0,0824; $R^2$=0,9986)** sudarymui naudojamas trolokso standartas. Trolokso koncentracijų ribos: (125–8000 µmol/l).

### 2.5.4.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas FRAP redukcinio aktyvumo metodu

Paruošiami reagentai iš kurių bus gaminamas darbinis FRAP reagentas:

1) 300 mmol/l acetatinio buferio ruošimas: atsveriama 3,1 g natrio acetato, suberiama į 1 litro talpos matavimo kolbą. Tuomet įpilama 16 ml ledinės acto rūgšties ir skiedžiama išgrynintu vandeniu iki žymės.
2) 10 mmol/l TPTZ tirpalo ruošimas: Į 50 ml išgryninto vandens įpilama 0,1695 ml koncentruotos vandenilio chlorido rūgšties. Gautame tirpale ištirpinami 0,1562 g TPTZ miltelių.
3) 20 mmol/l geležies (III) chlorido heksahidrato tirpalo ruošimas: 0,2703 g geležies (III) chlorido heksahidrato miltelių ištirpinama 50 ml išgryninto vandens.

Darbinis FRAP reagentas yra gaunamas sumaišius pagamintus reagentus santykiu 10:1:1 (10 dalių acetatinio buferio, 1 dalis TPTZ tirpalo ir 1 dalis geležies (III) chlorido heksahidrato tirpalo). Tiriamajam tirpalui paruošti imama 3 ml darbinio FRAP reagento ir sumaišoma su 20 µl tiriamojo augalinės žaliavos ekstrakto. Palyginamasis tirpalas gaminamas taip pat, tik vietoj tiriamojo augalinės

žaliavos ekstrakto pilamas 80 proc. metanolis. Praėjus 1 valandai, spektrofotometru matuojama mišinio absorbcija, esant 593 nm bangos ilgiui.

Kalibracinės kreivės **($y = 0,0002x + 0,0145$; $R^2 = 0,9902$)** sudarymui naudojamas trolokso standartas. Trolokso koncentracijų ribos: (125–4000 µmol/l).

### 2.5.5. Ultraefektyviosios skysčių chromatografijos su tandemine masių spektrometrija metodas

Fenolinių junginių kiekinės sudėties nustatymui didžiųjų dilgėlių vaistinės augalinės žaliavos ekstraktuose taikytas ultraefektyviosios skysčių chromatografijos su tandemine masių spektrometrija metodas (ESC-MS/MS), aprašytas González-Burgos ir kt. tyrime [82]. Fenolinių junginių išskirstymui buvo naudota YMC Triart C18 („YMC”, Vokietija) kolonėlė (100 × 2,0 mm; dalelių dydis 1,9 µm). Kolonėlėje buvo palaikoma 40 ºC temperatūra. Eliuentas sudarytas iš 0,1 proc. skruzdžių rūgšties vandeninio tirpalo (tirpiklis A) ir acetonitrilo (tirpiklis B). Eliuento tėkmės greitis – 0,5 ml/min. Tirpikliui A taikomas linijinis gradiento profilis: iš pradžių 95 proc. per 1 min; iki 70 proc. per 4 min; 50 proc. per 7 min; 95 proc. per 2 min. Analizei taikoma neigiama elektropurkštuvinė jonizacija: kapiliaro įtampa 2 kV, šaltinio temperatūra 150 °C, išgarinimo (desolvatacijos) temperatūra 400 °C. Tyrime naudoti šie dujų srauto parametrai: kūgiui – 20 l/val., išgarinimui (desolvacijai) – 700 l/val.

## 2.6. Tyrimo duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta „MS Excel 2016“ (Microsoft, JAV) ir „SPSS 20“ („IBM“, JAV) kompiuterinėmis programomis. Apskaičiuoti trijų pakartojimų aritmetiniai vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai. Koreliacinių ryšių stiprumas nustatytas taikant Pirsono tiesinės koreliacijos koeficientą. Rezultatų statistinis patikimumas įvertintas taikant vienfaktorinę dispersinę analizę ANOVA.

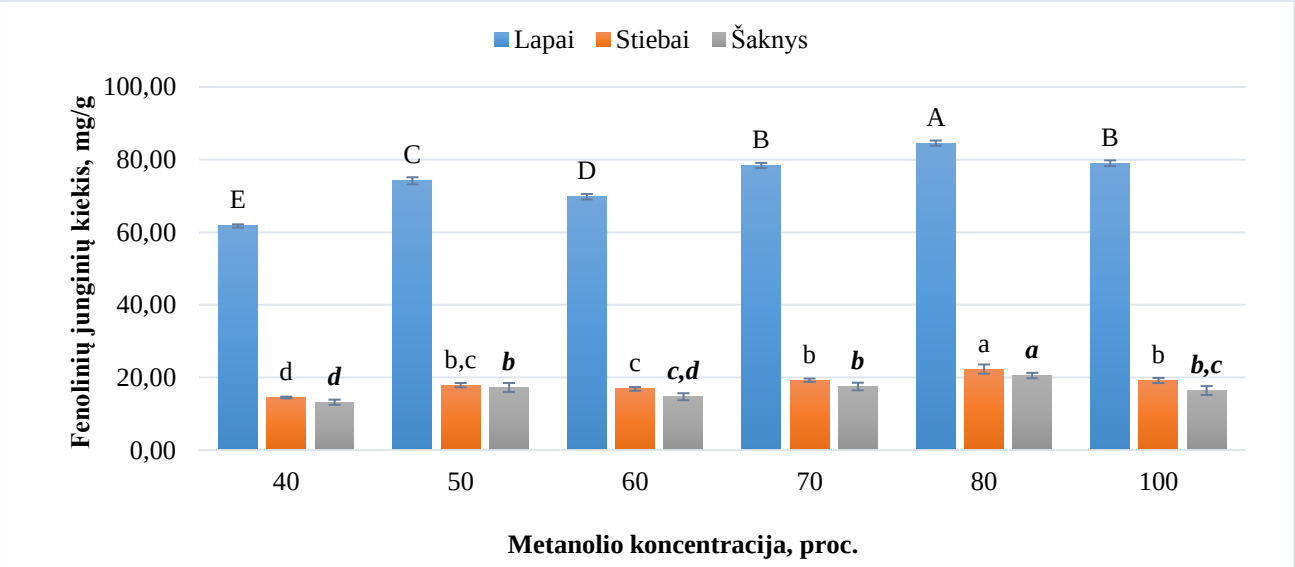
# 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

## 3.1. Fenolinių junginių ekstrakcijos sąlygų parinkimas didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų augalinėms žaliavoms

Nustatant kokybinę bei kiekinę fenolinių junginių sudėtį augalinės žaliavos ekstraktuose, itin svarbu tinkamai parinkti ekstrahentą ir ekstrakcijos trukmę. Optimalios ekstrakcijos sąlygos nustatytos vertinant tirpiklio koncentraciją ir ekstrakcijos trukmę. Tyrimui naudota Vilkaviškyje rinkta didžiųjų dilgėlių vaistinė augalinė žaliava.

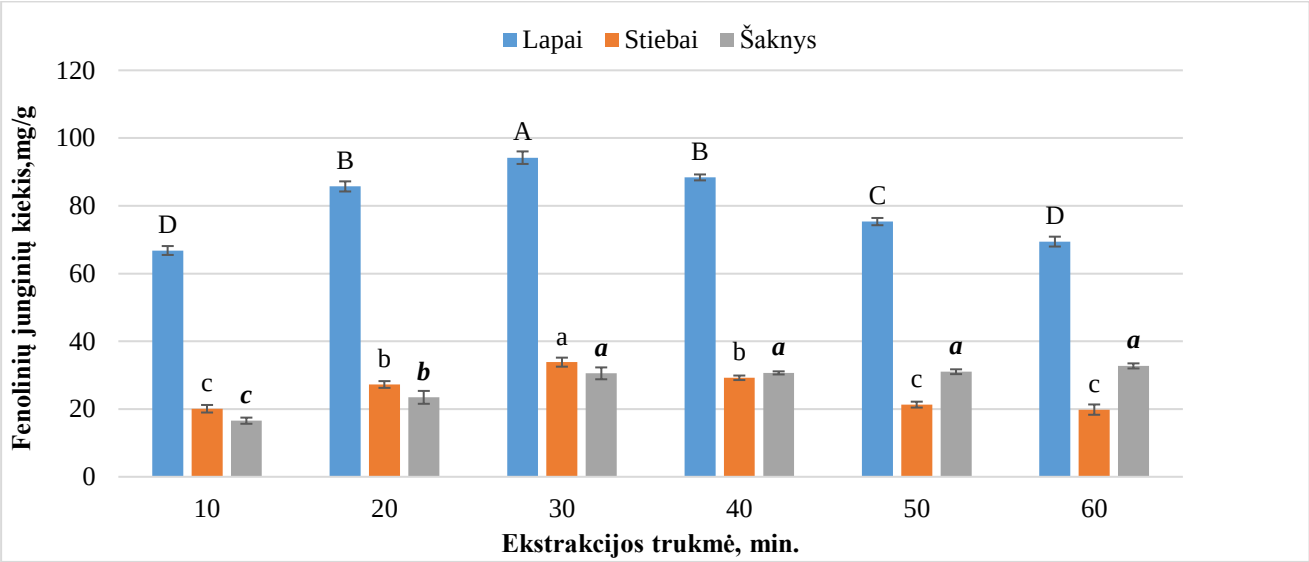
**Ekstrahento koncentracijos parinkimas.** Tyrimo metu pasirinkta įvertinti metanolio (40, 50, 60, 70, 80, 100 proc.) įtaką didžiųjų dilgėlių fenolinių junginių ekstrakcijai. Mokslinėje literatūroje nurodoma, jog dėl didelio metanolio poliškumo, šiame tirpiklyje gerai ekstrahuojasi mažos molekulinės masės ir vidutinio poliškumo fenoliniai junginiai [85, 86]. Vajić ir kt. atliktos *Urtica dioica* L. ekstrakcijos optimizacijos metu nustatė, jog ekstrakcijos metu naudojant metanolį, apskaičiuotas didesnis fenolinių junginių kiekis nei ekstrahuojant *Urtica dioica* L. lapų žaliavas etanoliu [69].

Tyrimo metu didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis visose augalo organų dalyse (lapuose – 84,54 ± 0,71 mg GRE/g, stiebuose – 2,3 ± 1,27 mg GRE/g, šaknyse – 20,53 ± 0,74 mg GRE/g; $p<0,05$) nustatytas ekstrakcijai naudojant 80 proc. (V/V) metanolį. Atsižvelgiant į gautus rezultatus, šis ekstrakcijos tirpiklis pasirinktas tolimesniems tyrimams (3 pav.).




***3 pav. Fenolinių junginių kiekio įvairavimas, naudojant skirtingos koncentracijos metanolį; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

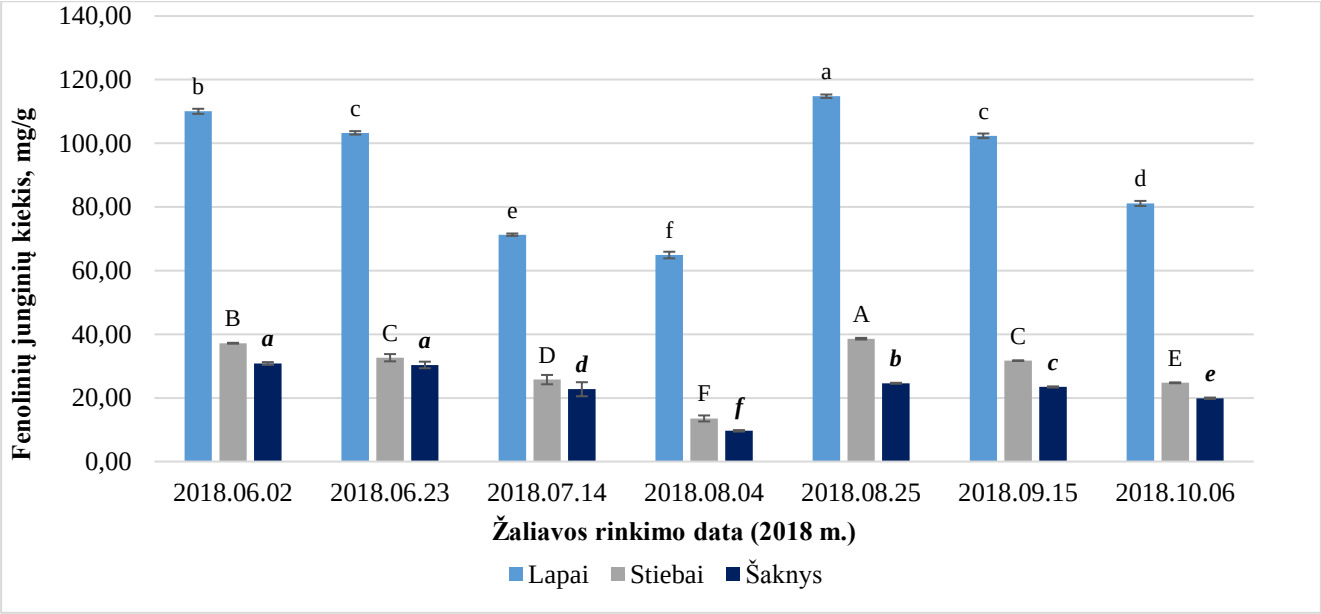
**Ekstrakcijos trukmės parinkimas.** Šiam nustatymui naudoti didžiųjų dilgėlų lapų, stiebų ir šaknų bandiniai, paruošti naudojant 80 proc. (V/V) metanolį ir esant 40 kH ultragarso vonelės dažniui. Ekstrakcijos laiko parinkimui vaistinių augalinių žaliavų ruošiniai ekstrahuoti skirtingais laiko intervalais 10, 20, 30, 40, 50 ir 60 min. Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis, ekstrahuojant augalines žaliavas ultragarso vonelėje 30 min., nustatytas lapuose (94,21 ± 1,849 mg GRE/g) ir stiebuose (33,84 ± 1,33 mg GRE/g). Šaknyse didžiausias fenolinių junginių kiekis (32,73 ± 0,75 mg GRE/g) nustatytas po 60 min. ekstrakcijos. Pritaikius vienfaktorinę dispersinę ANOVA analizę, nenustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp 30, 40, 50 ir 60 min. ekstrakcijos laiko bendram fenolinių junginių kiekiui šaknyse. Atsižvelgianti į tai, tolimesniems tyrimams pasirinkta lapus, stiebus ir šaknis ekstrahuoti 30 min. (4 pav.). Vajić ir kt. atliktame didžiųjų dilgėlių augalinės žaliavos ekstrakcijos optimizavimo tyrime gauti rezultatai skiriasi. Nurodoma, jog didžiausias fenolinių junginių kiekis augalinių žaliavų ekstraktuose nustatytas ekstrakcijai naudojant 54 proc. (V/V) metanolį ir veikiant ekstraktus ultragarsu 38 minutes.




***4 pav. Fenolinių junginių kiekio įvairavimas, esant skirtingai ekstrakcios trukmei; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

## 3.2. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

**Bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse vegetacijos laikotarpiu.** Atliktas didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų ėminių, surinktų skirtingais vegetacijos laikotarpiais, metanolinių augalinių ekstraktų bendro fenolinių junginių kiekio tyrimas. Šiam tyrimui didžiųjų dilgėlių vaistinė augalinė žaliava rinkta Girdžių apylinkėse (Jurbarko raj.) 2018 m. nuo birželio 2d. iki spalio 6 d. Tyrimo metu gauti rezultatai pateikti 5 paveiksle.

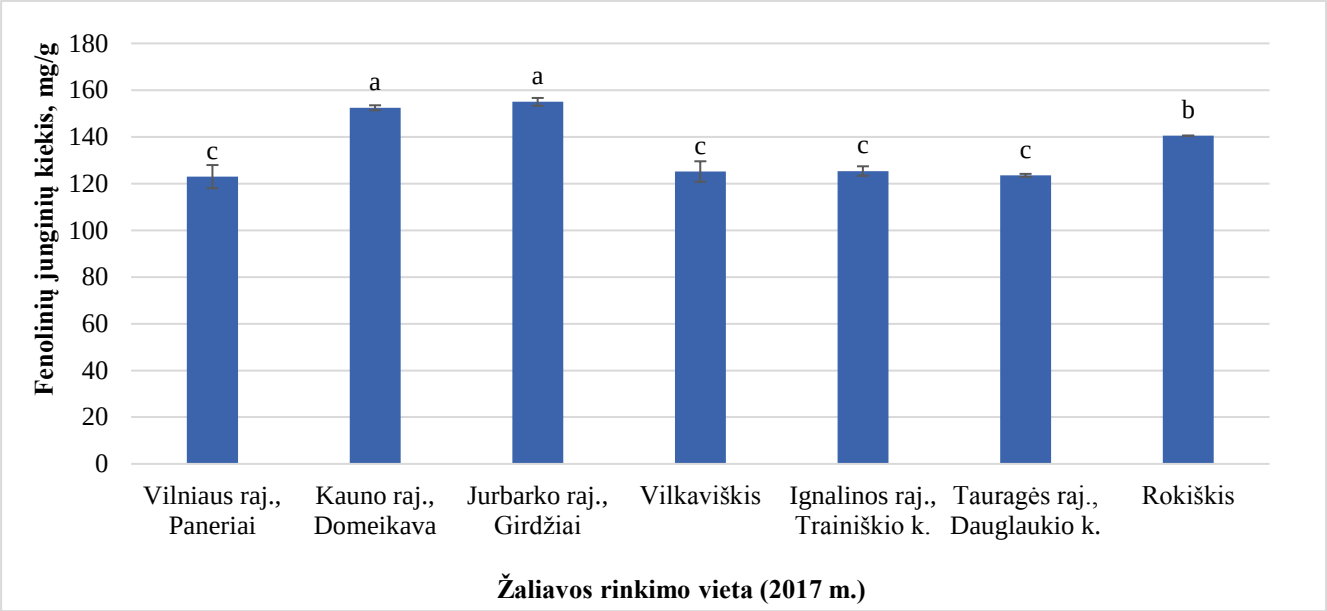



***5 pav. Bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse vegetacijos laikotarpiu (2018 m. birželio–spalio mėn.), p<0,05***

Ištyrus natūralioje Jurbarko raj., Girdžiuose esančioje augavietėje augančių didžiųjų dilgėlių lapuose esančių fenolinių junginių kiekinę sudėtį nustatyta, kad didžiausias fenolinių junginių kiekis lapuose ir stiebuose yra rugpjūčio 25 dieną, žydėjimo pabaigos metu: lapuose – 114,80 ± 0,80 mg GRE/g, stiebuose – 38,61 ± 0,14 mg GRE/g. Šaknyse didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas birželio 2 dieną, prieš žydėjimą – 30,82 ± 0,22 mg GRE/g. Mažiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas rugpjūčio 4 dieną, žydėjimo metu: lapuose – 64,90 ± 0,54 mg GRE/g, stiebuose – 13,55 ± 1,14 mg GRE/g, šaknyse – 9,67 ± 1,03 mg GRE/g. Prieš žydėjimą, birželio 2 dieną, nustatytas reikšmingai didelis fenolinių junginių kiekis visuose augalo organuose (lapuose – 110,05 ± 1,04 mg GRE/g, stiebuose – 37,18 ± 0,94 mg GRE/g, šaknyse – 30,82 ± 0,22 mg GRE/g). Nuo šios datos, žydėjimo periodo metu, fenolinių junginių kiekis dilgėlių ekstraktuose mažėjo iki rugpjūčio pradžios. Šią savybę patvirtino ir kiti mokslininkai. Adomėnienė ir kt. nustatė, jog didžiausias fenolinių junginių kiekis dilgėlių lapų etanoliniuose ekstraktuose yra žaliavose, surinktose iki žydėjimo ir įvairuoja nuo 19,71 iki 30,28 mg GRE/g. Taip pat teigiama, jog žydėjimo metu surinktose didžiųjų dilgėlių žaliavose fenolinių junginių kiekis mažėjo [87].

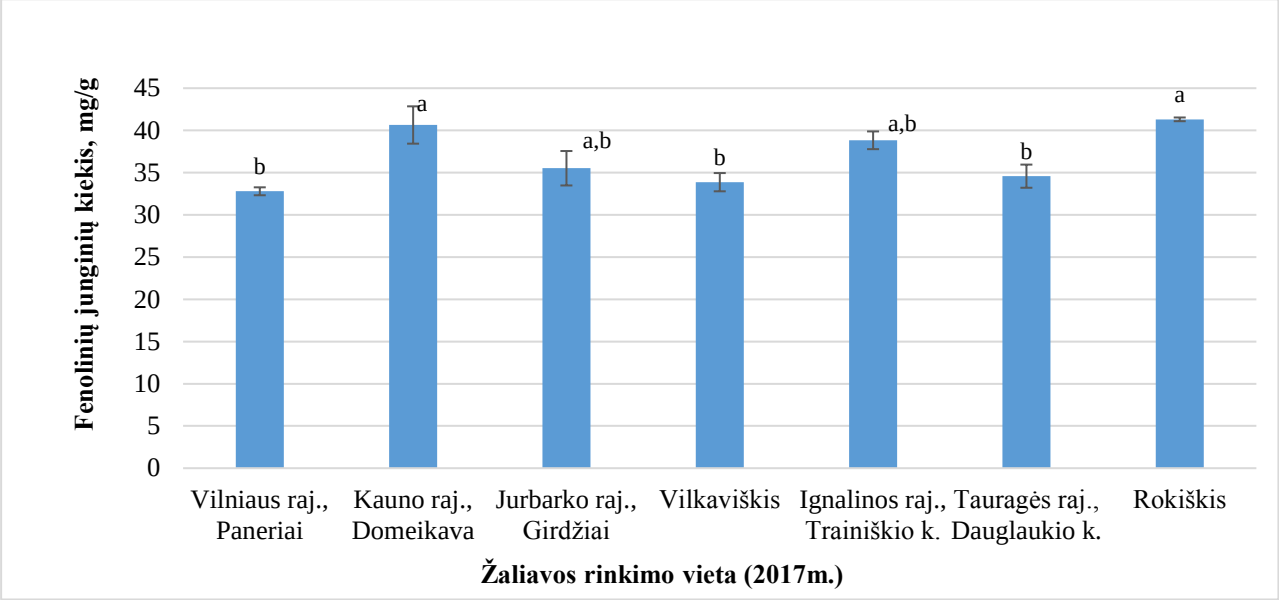
**Bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse skirtingose Lietuvos vietovėse.** Bendras fenolinių junginių kiekis didžiųjų dilgėlių lapuose skirtingose Lietuvos vietovėse įvairuoja nuo 122,95 ± 4,98 mg GRE/g iki 154,97 ± 1,68 mg GRE/g. Vidutiniškai Lietuvoje augančių dilgėlių lapai sukaupia 134,98 mg GRE/g fenolinių junginių. Didžiųjų dilgėlių lapuose didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas Jurbarko raj., Girdžiuose (154,97 ± 1,68 mg GRE/g) ir Kauno raj., Domeikavoje (152,44 ± 1,06 mg GRE/g) rinktoje žaliavoje, šiek tiek mažesnis kiekis nustatytas Rokiškyje – 140,47 ± 0,10 mg GRE/g rinktoje žaliavoje. Mažiausi

fenolinių junginių kiekiai nustatyti Vilniaus raj., Paneriuose (122,95 ± 4,98 mg GRE/g), Vilkaviškyje (125,16 ± 4,38 mg GRE/g), Ignalinos raj., Trainiškio kaime (125,36 ± 2,03 mg GRE/g) ir Tauragės raj., Dauglaukio kaime (123,51 ± 0,64 mg GRE/g.) surinktų žaliavų ėminiuose (6 pav.). Serbijos mokslininkai didžiųjų dilgėlių lapuose nustatė didesnį fenolinių junginių kiekį – 208,37 ± 4,39 mg GRE/g [8]. Šį skirtumą galėjo nulemti tai, jog pastarajame tyrime buvo naudota šviežia bei užšaldyta dilgėlių žaliava, o tirpikliu pasirinktas parūgštintas etanolis.



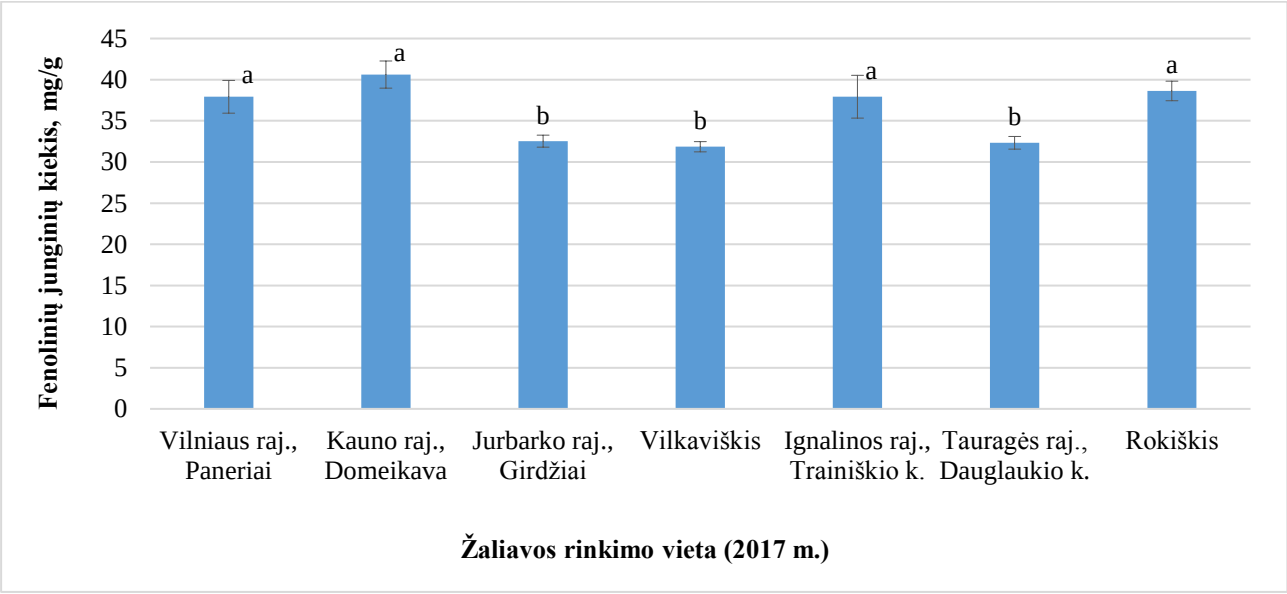

***6 pav. Bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

Atlikus bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimo didžiųjų dilgėlių stiebuose tyrimą, nustatyta jog didžiausias kiekis fenolinių junginių yra Rokiškyje (41,34 ± 0,22 mg GRE/g) ir Kauno raj., Domeikavoje (40,64 ± 2,21 mg GRE/g) rinktoje žaliavoje. Vidutinis fenolinių junginių kiekis Lietuvoje augančių didžiųjų dilgėlių stiebuose yra 36,79 mg GRE/g. Kiek mažesni, bet vidurkį siekiantys kiekiai nustatyti Jurbarko raj., Girdžių sen. (35,52 ± 2,04 mg GRE/g) ir Ignalinos raj., Trainiškio kaime (38,83 ± 1,05 mg GRE/g). Mažiausias fenolinių junginių kiekis didžiųjų dilgėlių stiebuose nustatytas Vilniaus raj., Paneriuose (32,79 ± 0,47 mg GRE/g) rinktos žaliavos ėminiuose (7 pav.). Stiebuose bendras fenolinių junginių kiekis yra 3,6 karto mažesnis, nei lapuose.




***7pav. Bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių stiebuose skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

Didžiųjų dilgėlių šaknyse didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas Kauno raj., Domeikavoje, Rokiškyje, Ignalinos raj., Traniškio kaime ir Vilniau raj., Paneriuose surinktoje žaliavoje, atitinkamai 40,62 ± 1,65 mg GRE/g, 38,63 ± 1,19 mg GRE/g, 37,93 ± 2,60 mg GRE/g ir 37,92 ± 1,99 mg GRE/g. Tarp šių vietovių nenustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai. Mažiausias fenolinių junginių kiekies ištirtas Vilkaviškyje surinktoje šaknų žaliavoje – 31,85 ± 0,62 mg GRE/g (8 pav.). Vidutinis fenolinių junginių kiekis šaknyse yra 35,97 mg GRE/g. Fenolinių junginių kiekis didžiųjų dilgėlių šaknyse lyginant su lapais ir stiebais yra mažiausias.



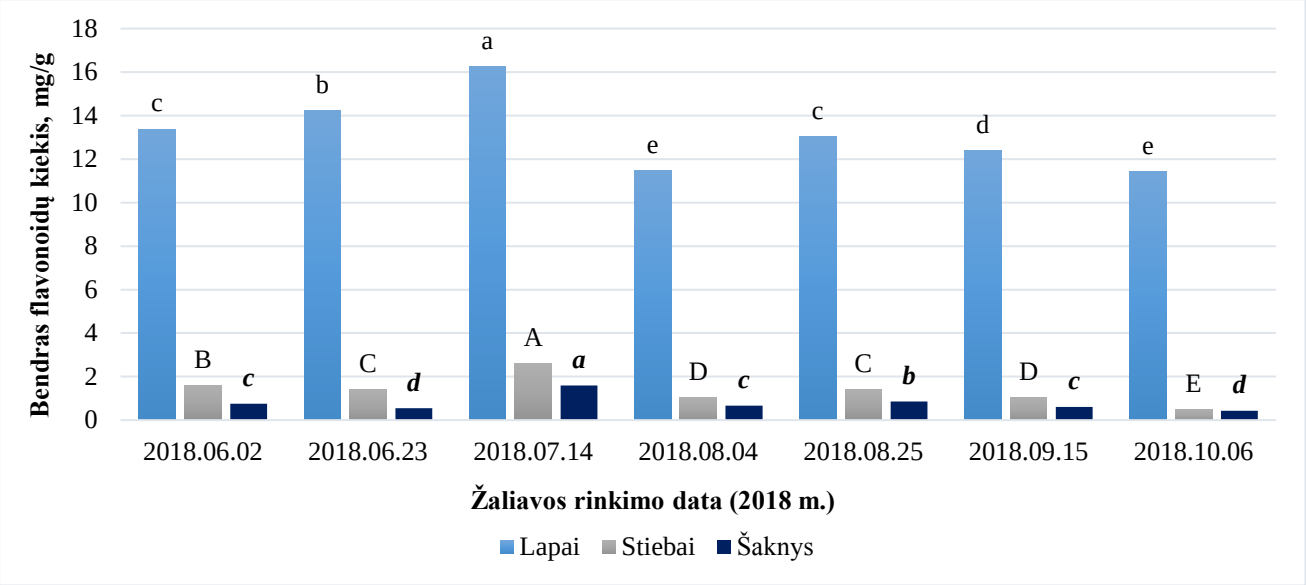

***8 pav. Bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių šaknyse skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

Ištyrus bendro fenolinių junginių kiekio įvairavimą didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse skirtingose Lietuvos vietovėse, nustatyti statistiškai reikšmingi fenolinių junginių skirtumai tarp Lietuvos regionų bei augalo dalių. Daugiausiai fenolinių junginių visuose augalo organuose aptikta Kauno raj., Domeikavoje, Rokiškyje ir Jurbarko raj., Girdžiuose, mažiausiai – Vilniaus raj., Paneriuose, Vilkaviškyje ir Tauragės raj., Dauglaukio kaime rinktų žaliavų ėminiuose. Vertinant fenolinių junginių įvairavimą skirtinguose augalo organuose, galima teigti, kad lapuose šių junginių kiekis buvo didžiausias ir reikšmingai skyrėsi nuo fenolinių junginių kiekio stiebuose ir šaknyse. Stiebuose ir šaknyse fenolinių junginių kiekis statistiškai reikšmingai nesiskyrė; nustatyta jog fenolinių junginių kiekis stiebuose ir šaknyse yra 3 kartus mažesnis nei lapuose.

Šių tyrimų metu gauti bendro fenolinių junginių kiekio rezultatai skyrėsi nuo Slovakijos mokslininkų nustatytų rezultatų. Ekstrahavę didžiųjų dilgėlių žaliavas maceracijos metodu, dilgėlių ekstraktuose jie nustatė mažesnius fenolinių junginių kiekius: šaknyse – 7,82 mg GRE/g, stiebuose – 9,91 mg GRE/g ir lapuose – 7,62 mg GRE/g. Galima daryti prielaidą, jog skirtumus tarp rezultatų galėjo lemti skirtingi ekstrakcijos metodai, klimato sąlygos [89].

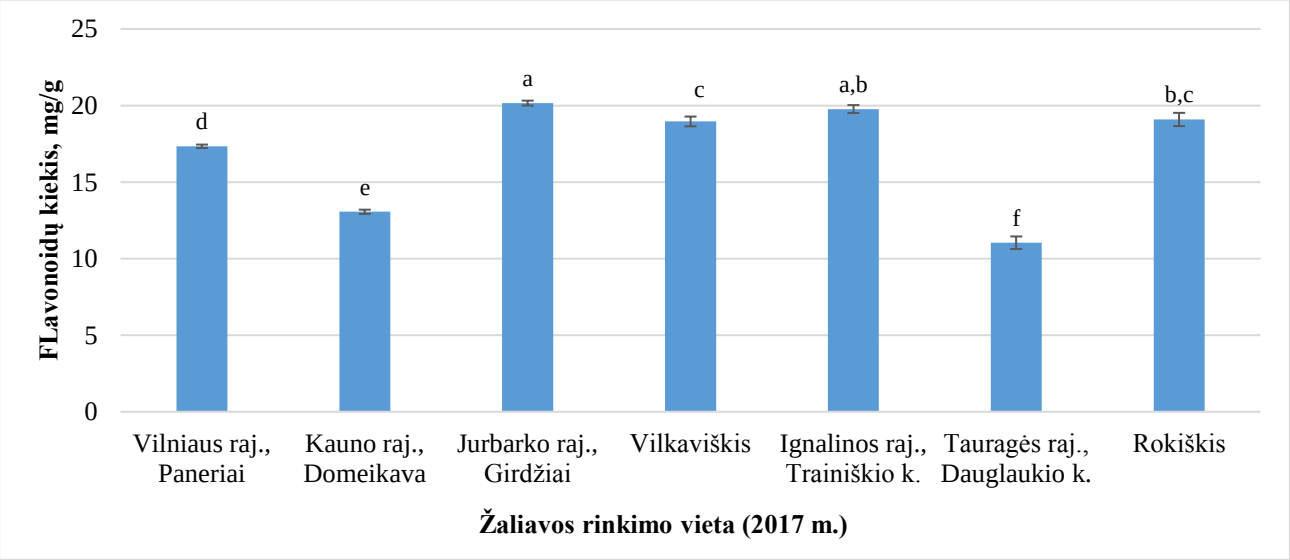
## 3.3. Bendro flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

**Bendro flavonoidų kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse vegetacijos eigoje.** Ištyrus natūralioje Jurbarko raj., Girdžiuose esančioje augavietėje augančių didžiųjų dilgėlių žaliavose esantį bendrą flavonoidų kiekį nustatyta, kad didžiausias kiekis lapuose, stiebuose ir šaknyse buvo žydėjimo metu liepos 14 dieną (lapuose – 16,27 ± 0,16 mg RE/g, stiebuose – 2,6 ± 0,09 mg RE/g, šaknyse – 1,59 ± 0,18 mg RE/g). Mažiausias kiekis visose žaliavose nustatytas sėklų brandinimo metu, spalio 6 dieną (lapuose – 11,47 ± 0,11 mg RE/g, stiebuose – 0,49 ± 0,07 mg RE/g, šaknyse – 0,43 ± 0,09 mg RE/g). Atlikus statistinę analizę, prieš žydėjimą (birželio 2 d.) ir žydėjimo pabaigoje (rugpjūčio 25 d.) nenustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp bendro flavonoidų kiekio didžiųjų dilgėlių lapuose. Taip pat statistiškai reikšmingai nesiskyrė žydėjimo (rugpjūčio 4 d.) ir sėklų brandinimo (spalio 6 d.) metu surinktų žaliavų flavonoidų kiekiai (9 pav.).



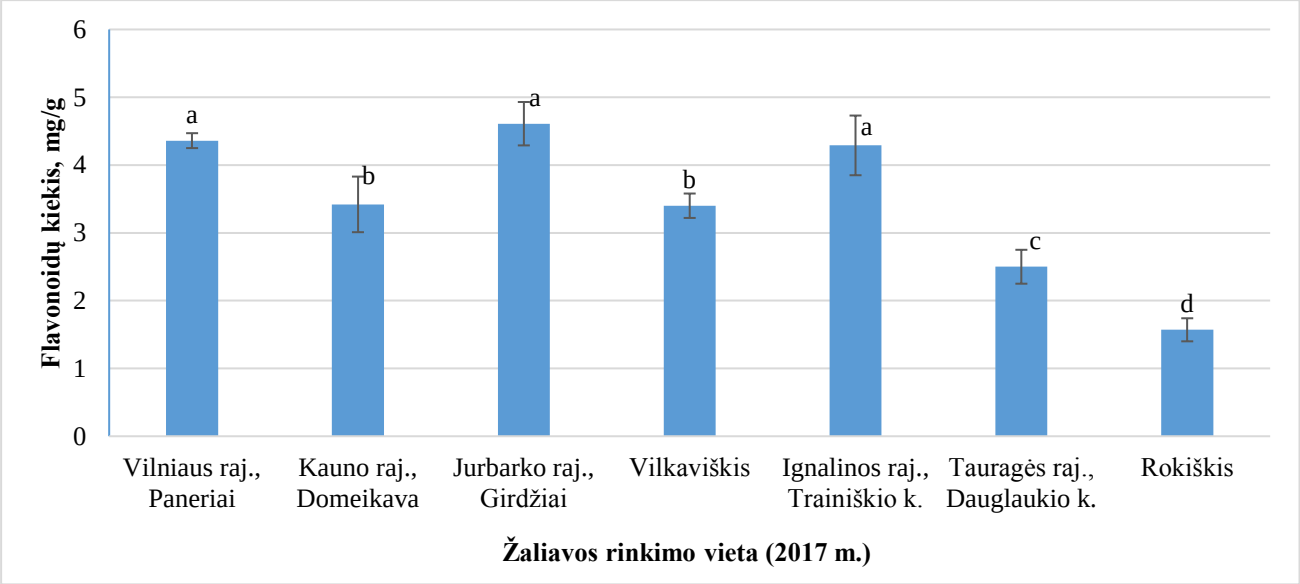

***9 pav. Bendro flavonoidų kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse vegetacijos metu (birželio – spalio mėn.), p<0,05***

**Bendro flavonoidų kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse skirtingose Lietuvos vietovėse.** Didžiųjų dilgėlių lapuose flavonoidų kiekio maksimumas nustatytas Jurbarko raj., Girdžiuose (20,16 ± 0,16 mg RE/g) surinktoje žaliavoje. Kiek mažesnis kiekis Ignalinos raj., Trainiškio kaime – 19,77 ± 0,26 mg RE/g. Mažiausias bendras flavonoidų kiekis nustatytas Tauragės raj., Dauglaukio kaime – 11,04 ± 0,41 mg RE/g surinktuose žaliavų ėminiuose. Vidutinis ištirtų Lietuvoje augančių didžiųjų dilgėlių lapų flavonoidų kiekis yra 17,06 mg RE/g (10 pav.). Šis kiekis panašus į Serbijoje atlikto tyrimo metu nustatytą bendrą flavonoidų kiekį didžiųjų dilgėlių lapuose – 20,29 ± 0,48 mg RE/g [88].



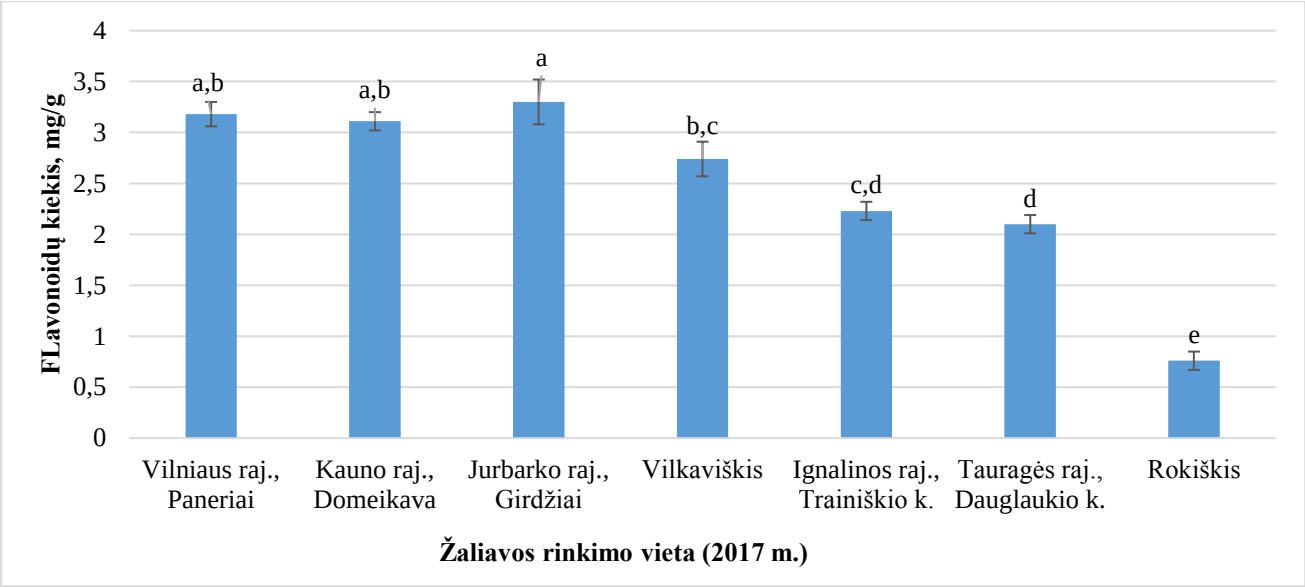

***10 pav. Bendro flavonoidų kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

Stiebuose bendras flavonoidų kiekis skirtingose Lietuvos vietovėse varijuoja nuo 1,57 ± 0,17 mg RE/g (Rokiškis) iki 4,61±0,32 mg RE/g (Jurbarko raj., Girdžiai). Reikšmingai nuo Jurbarko raj., Girdžiuose surinktų žaliavų ėminiuose nustatyto flavonoidų kiekio nesiskyrė Vilniaus raj., Paneriuose (4,36 ± 0,11 mg RE/g) bei Ignalinos raj., Trainiškių kaime (4,29 ± 0,44 mg RE/g) nustatyti flavonoidų kiekiai. Mažiausias kiekis ištirtas Rokiškyje rinktoje žaliavoje – 1,57 ± 0,17 mg RE/g, tai 3 kartus mažesnis flavonoidų kiekis nei Jurbarke raj., Girdžiuose rinktoje žaliavoje. Vidutinis flavonoidų kiekis Lietuvoje augančių dilgėlių stiebuose – 3,45 mg RE/g. Rezultatai pateikti 11 paveiksle.




***11 pav. Bendro flavonoidų kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių stiebuose skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių (p<0,05)***

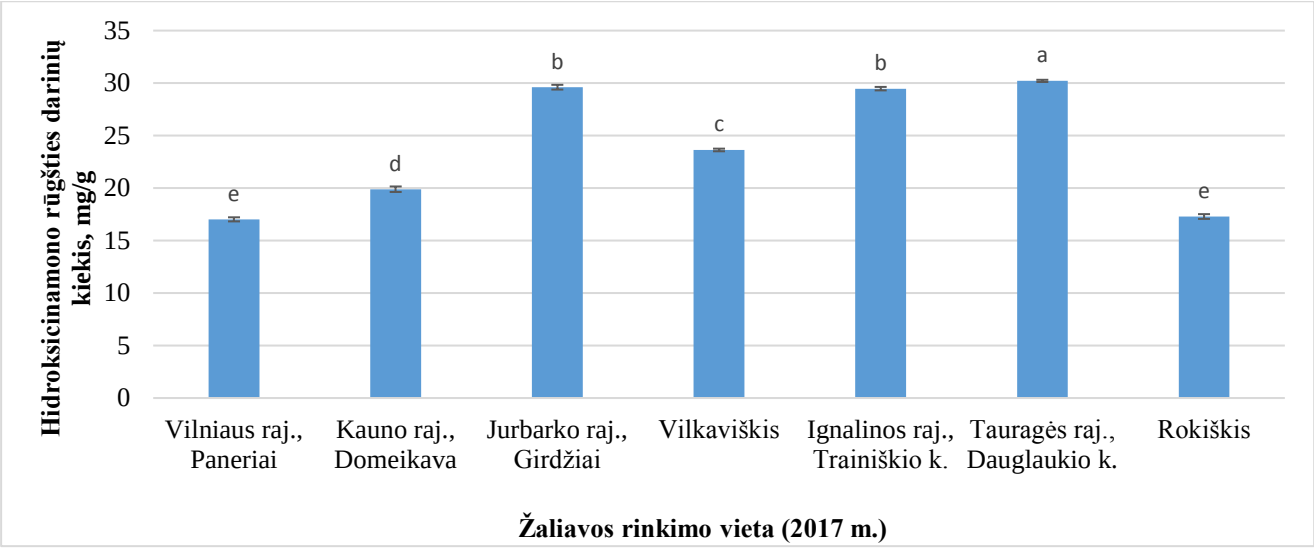
Atlikus bendro flavonoidų kiekio įvairavimo didžiųjų dilgėlių šaknyse tyrimą, nustatyta jog didžiausias kiekis yra Jurbarko raj., Girdžiuose (3,3 ± 0,22 mg RE/g), kiek mažiau Vilniaus raj., Paneriuose (3,18 ± 0,12 mg RE/g) ir Kauno raj. Domeikavoje (3,11 ± 0,09 mg RE/g) rinktoje žaliavoje. Šiose vietovėse flavonoidų kiekiai statistiškai nesiskyrė. Bendras flavonoidų kiekis mažiausias Rokiškyje – 0,76 ± 0,09 mg RE/g. Vidutinis Lietuvoje augančių didžiųjų dilgėlių šaknyse sukauptas flavonoidų kiekis – 2,49 mg RE/g (12 pav.).




***12 pav. Bendro flavonoidų kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių šaknyse skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

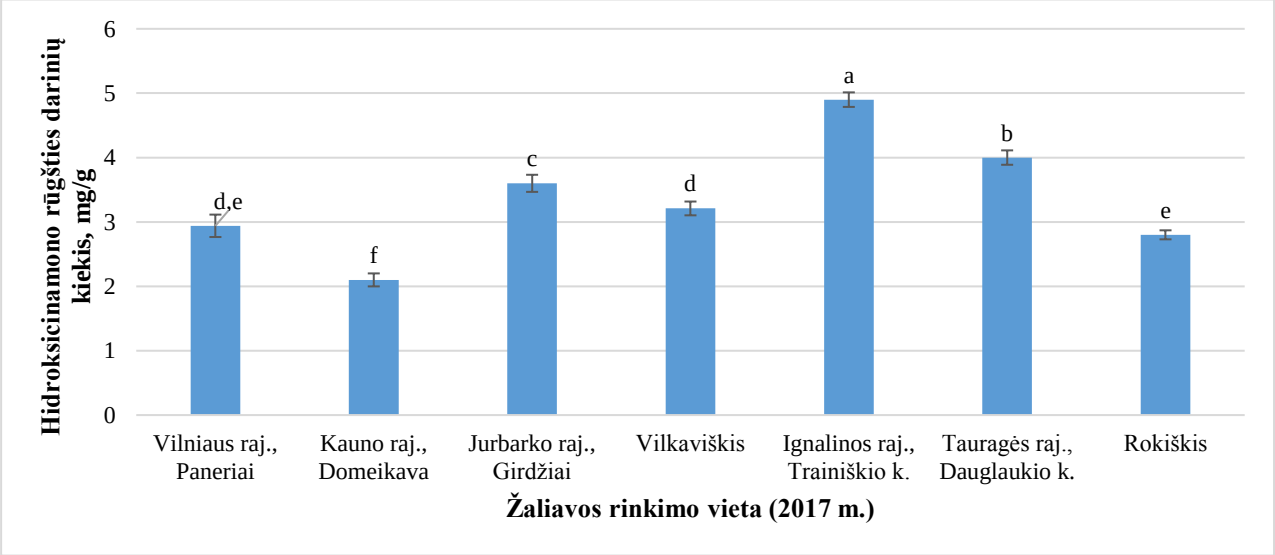
## 3.4. Bendras hidroksicinamono rūgšties darinių kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

Tyrimo metu tirtas bendras hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis skirtingose Lietuvos vietovėse surinktų didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse. Didžiausias hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis lapuose nustatytas Tauragės raj., Dauglaukio kaime (30,21 ± 0,10 mg CRE/g), mažiausias hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis lapuose nustatytas Vilniaus raj., Paneriuose (17,02 ± 0,19 mg CRE/g) rinktoje žaliavoje. Vidutinis skirtingose Lietuvos vietovėse augančių didžiųjų dilgėlių lapų ekstraktų hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis – 23,87 mg CRE/g (13 pav.). Jurbarko raj., Girdžiuose ir Ignalinos raj., Trainiškių kaime rinktų žaliavų ėminiuose nustatyti hidroksicinamono rūgšties darinių kiekiai taip pat dideli, atitinkamai 29,61 ± 0,11 mg CRE/g ir 29,47 ± 0,09 mg CRE/g, šie kiekiai reikšmingai nesiskyrė.



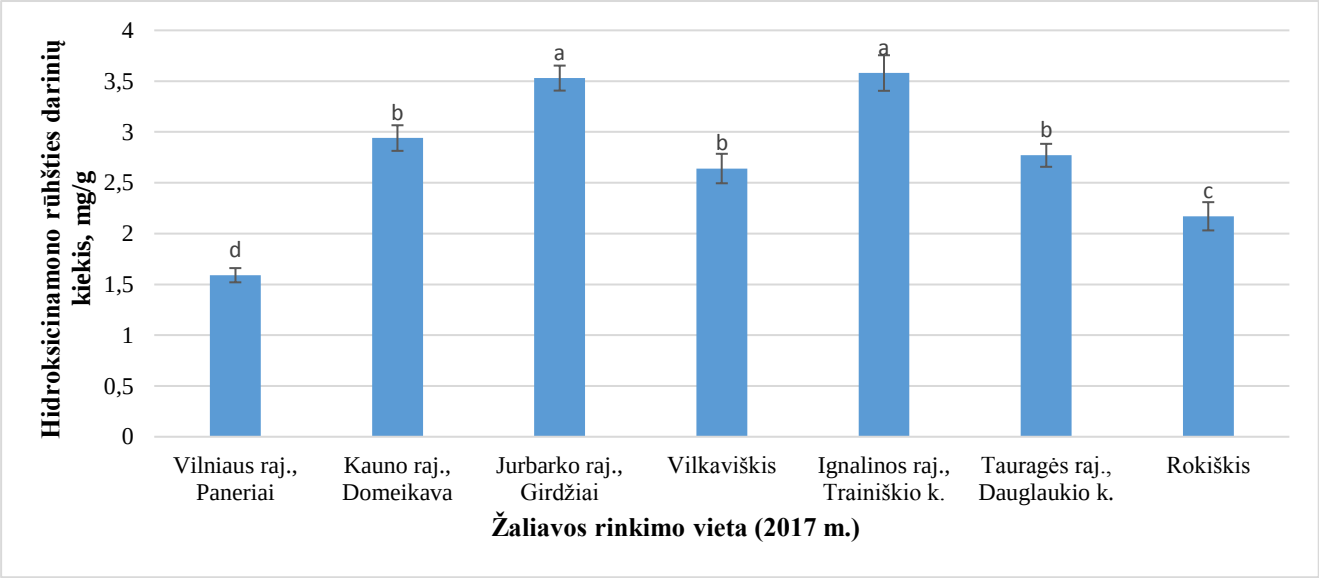

***13 pav. Bendro hidroksicinamono rūgšties darinių kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

Tiriant didžiųjų dilgėlių stiebus, didžiausias bendras hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis nustatytas Ignalinos raj.,Trainiškio kaime (4,9 ± 0,11 mg CRE/g), šiek tiek mažiau Tauragės raj., Dauglaukio kaime (4,0 ± 0,11 mg CRE/g) bei Jurbarko raj., Girdžiuose (3,6 ±0,13 mg CRE/g) surinktų žaliavų ėminiuose. Mažiausias hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis nustatytas Kauno raj., Domeikavoje – 2,1 ± 0,10 mg CRE/g, tai 2,3 karto mažesnis nei Ignalinos raj., Dauglaukio kaime surinktų žaliavų ėminiuose nustatytas kiekis. Vidutinis hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis didžiųjų dilgėlių stiebuose – 3,37 mg CRE/g (14 pav.).




***14 pav. Bendro hidroksicinamono rūgšties darinių kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių stiebuose skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

Didžiųjų dilgėlių šaknyse didžiausias bendras hidroksicinamono rūgšties kiekis nustatytas Ignalinos raj., Trainiškio kaime (3,58 ± 0,17 mg CRE/g) ir Jurbarko raj., Girdžiuose (3,53 ± 0,12 mg CRE/g) rinktoje žaliavoje. Vidutinis hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis nustatytas keliose vietovėse: Kauno raj., Domeikavoje, Tauragės raj., Dauglaukio kaime ir Vilkaviškyje rinktoje žaliavoje, atitinkamai 2,94 ± 0,13 mg CRE/g, 2,77 ± 0,11 mg CRE/g ir 2,64 ± 0,14 mg CRE/g. Tarp šiose vietovėse ištirto bendro hidroksicinamono rūgšties darinių kiekio nenustatytas statistiškai reikšmingų skirtumas. Mažiausias kiekis ištirtas Vilniaus raj., Paneriuose – 1,59 ± 0,07 mg CRE/g surinktų didžiųjų dilgėlių žaliavų ėminių (15pav.).



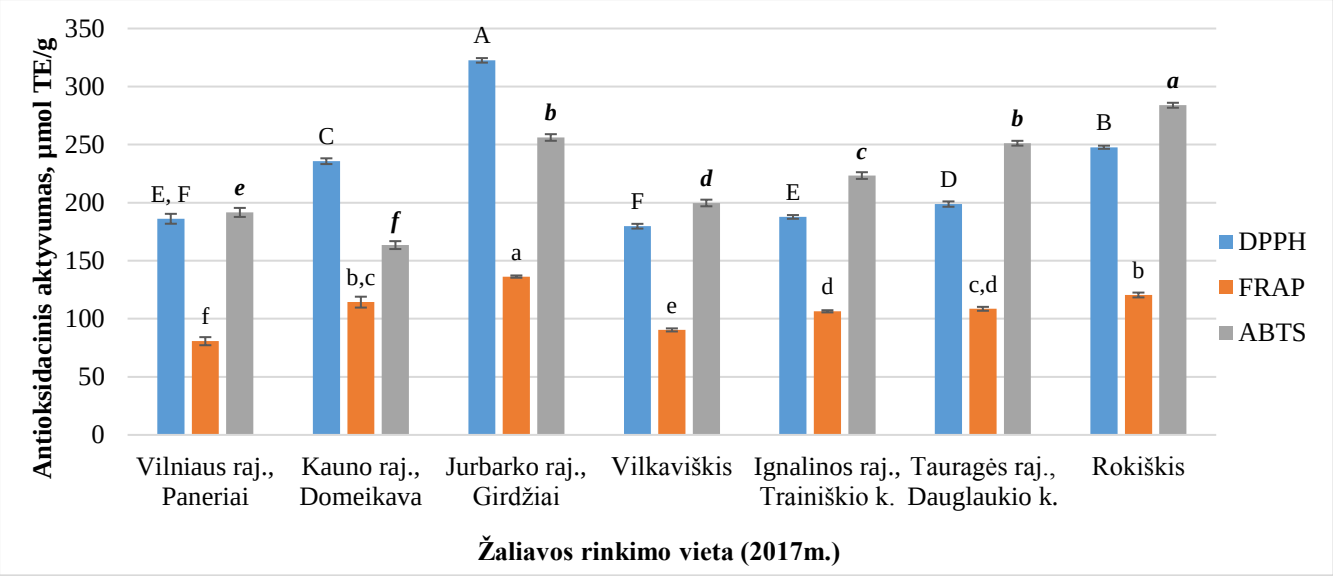

***15 pav. Bendro hidroksicinamono rūgšties darinių kiekio įvairavimas didžiųjų dilgėlių šaknyse skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

## 3.5. Didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas

**Antioksidacinio aktyvumo įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse skirtingose Lietuvos vietovėse.** Antioksidacinio aktyvumo įvertinimui taikyti skirtingi metodai: antiradikalinio aktyvumo nustatymui DPPH ir ABTS metodai, redukcinio aktyvumo nustatymui – FRAP metodas. Didžiųjų dilgėlių lapų ėminių, surinktų skirtinguose Lietuvos regionuose antioksidacinis aktyvumas pateiktas 16 paveiksle.

Stipriausias antioksidacinis aktyvumas, taikant DPPH metodą, nustatytas lapų mėginiuose, rinktuose Jurbarko raj., Girdžiuose (322,56 ± 1,95 µmol TE/g) ir Rokiškyje (247,73 ± 1,34 µmol TE/g). Šiose dviejose vietovėse antioksidacinis aktyvumas buvo didžiausias, taikant ir kitus metodus: FRAP metodu Jurbarke nustatytas 136,34 ± 0,97 µmol TE/g, Rokiškyje 120,48 ± 2,08 µmol TE/g, Kauno

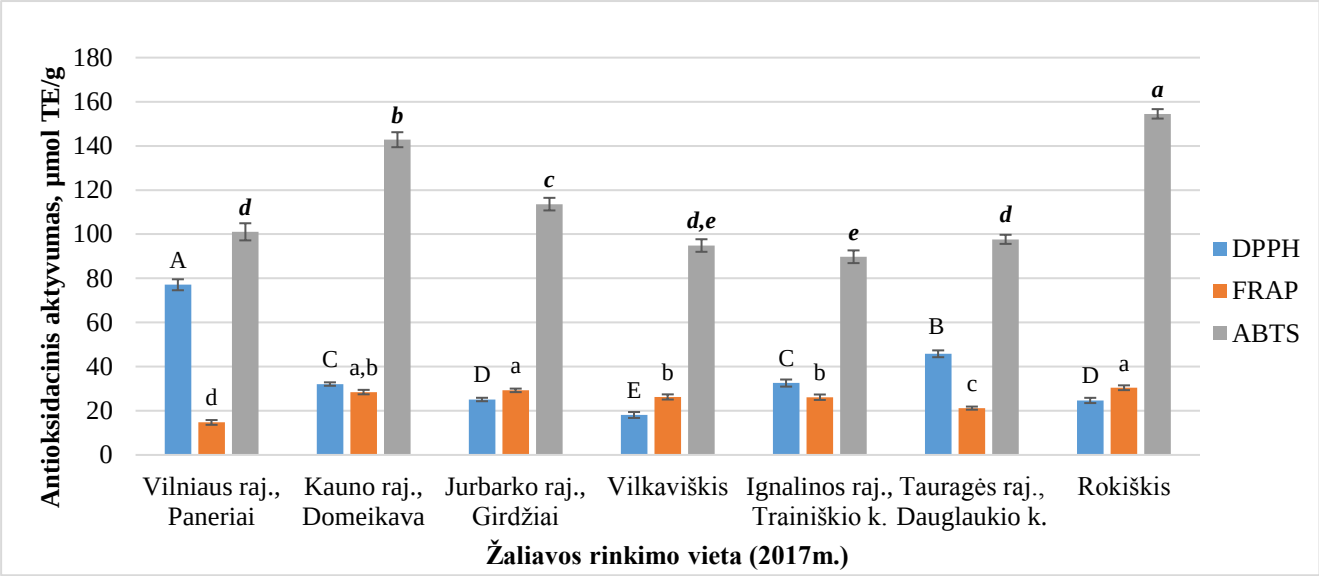
rajone, Domeikavoje (114,35 ± 4,69 µmol TE/g) antioksidacinis aktyvumas. ABTS metodu didžiausia antiradikalinio aktyvumo reikšmė nustatyta tiriant augalinių žaliavų, surinktų taip pat Rokiškyje (283,9 ± 2,36 µmol TE/g), Jurbarke (256,14 ± 1,81 µmol TE/g) bei Tauragės raj., Dauglaukio kaime (251,2 ± 3,59 µmol TE/g) ekstraktus. Mažiausias antiradikalinis aktyvumas didžiųjų dilgėlių lapuose DPPH metodu nustatytas Vilkaviškyje (179,73 ± 2,04 µmol TE/g) ir Vilniaus raj., Paneriuose (186,12 ± 4,26µmol TE/g), ABTS metodu – Kauno raj., Domeikavoje (163,46 ± 1,80 µmol TE/g) surinktoje žaliavoje. Redukcinis aktyvumas FRAP metodu mažiausias nustatytas Vilniaus raj., Paneriuose (80,72 ± 3,49 µmol TE/g) rinktoje žaliavoje. Vertinant vidutinį Lietuvoje augančių didžiųjų dilgėlių lapų antioksidacinį aktyvumą, taikant antiradikalinį ABTS metodą, nustatytas stipriausias aktyvumas – 224,20 ± 2,18 µmol TE/g, kiek mažesnis DPPH metodu – 222,62 ± 2,28 µmol TE/g. Silpniausias vidutinis antioksidacinis aktyvumas ištirtas taikant FRAP redukcinio aktyvumo metodą – 108,19 ± 2,17 µmol TE/g.




***16 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

Tiriant didžiųjų dilgėlių stiebus, didžiausias antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu nustatytas Vilniaus raj., Paneriuose (77,09 ± 2,48 µmol TE/g) ir Tauragės raj., Dauglaukio kaime (45,82 ± 1,55 µmol TE/g) rinktų žaliavų ekstraktuose. Stipriausias FRAP metodu įvertintas redukcinis aktyvumas nustaytas Jurbarko raj., Girdžiuose (29,25 ± 0,80 µmol TE/g) ir Rokiškyje (30,44 ± 1,08 µmol TE/g) surinktų žaliavų ėminiuose. Vertinant skirtingose Lietuvos vietose rinktų didžiųjų dilgėlių stiebų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą keliais metodais, galima teigti, jog ABTS metodo rezultatai skyrėsi nuo DPPH ir FRAP metodais gautų rezultatų: stipriausias aktyvumas Rokiškyje (154,52 ± 2,14 µmol TE/g) ir Kauno raj., Domeikavoje (142,81 ± 3,40 µmol TE/g). Vertinant vidutinį Lietuvoje augančių didžiųjų dilgėlių stiebų antioksidacinį aktyvumą, taikant skirtingus metodus,

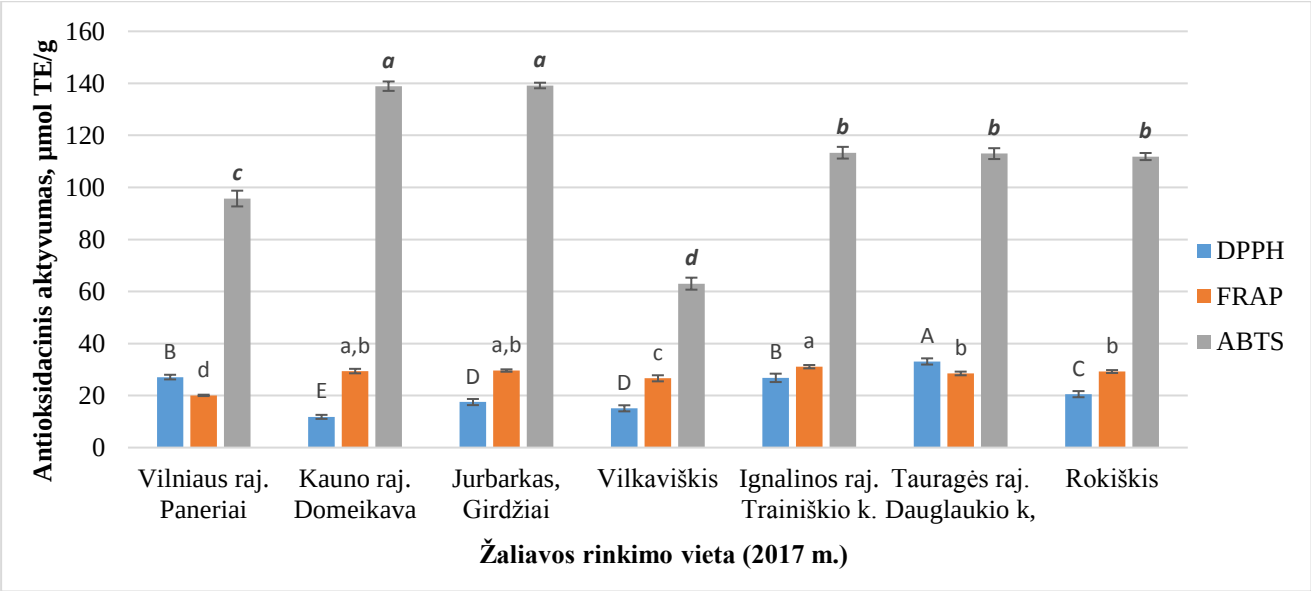
nustatyta, jog ABTS metodu gauti rezultatai yra 3,1 karto didesni nei DPPH ir 4,5 karto didesni nei FRAP metodu gauti antioksidacinio aktyvumo rezultatai (17 pav.).




***17 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvairavimas didžiųjų dilgėlių stiebuose skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

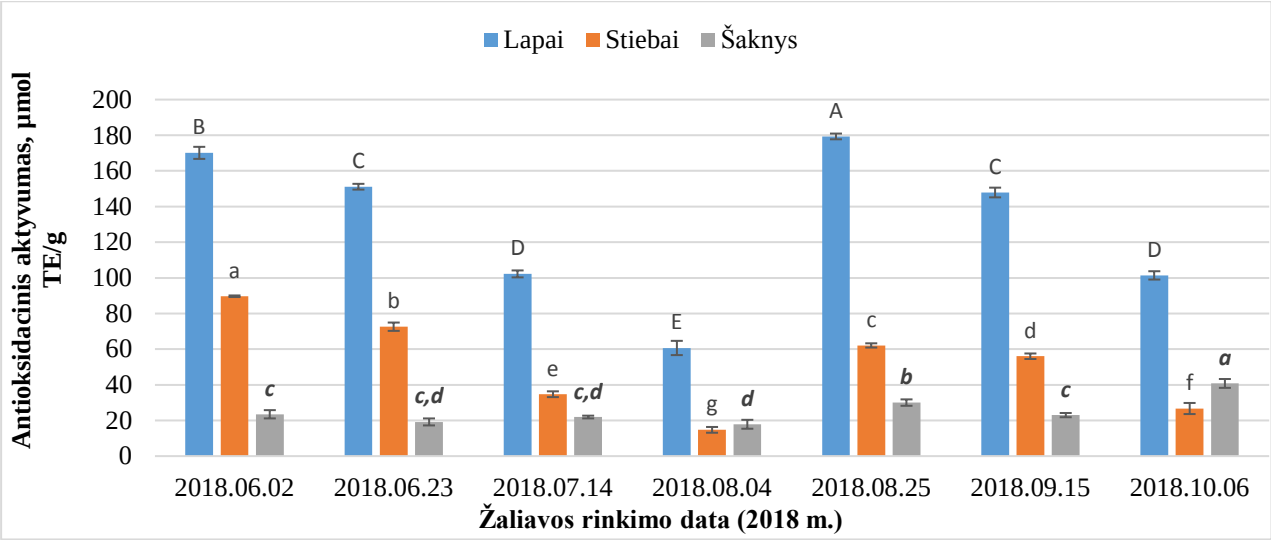
Nustatyta, jog vidutinis antioksidacinis aktyvumas skirtingose Lietuvos vietovėse didžiųjų dilgėlių šaknyse yra mažesnis nei stiebuose, tačiau statistiškai reikšmingi skirtumai nenustatyti. Didžiausias antiradikalinis aktyvumas didžiųjų dilgėlių šaknyse DPPH metodu įvertintas Tauragės raj., Dauglaukio kaime (33,11 ± 1,19µmol TE/g), ABTS metodu – Jurbarko raj., Girdžiuose (139,18 ± 1,07 µmol TE/g) ir Kauno raj., Domeikavoje (138,91 ± 1,81 µmol TE/g). Redukcinio aktyvumo FRAP metodu didžiausia reikšmė nustatyta Ignalinos raj., Trainiškio kaime – 31,10 ± 0,64µmol TE/g) surinktoje žaiavoje (18 pav.).

Didžiųjų dilgėlių šaknyse, lyginant su su kitais augalo organais, antioksidacinis aktyvumas tiriant DPPH metodu nustatytas mažiausias. Lapuose antioksidacinis aktyvumas didesnis net 10 kartų nei šaknyse, o stiebuose – 1,7 karto. Šie rezultatai skiriasi nuo Serbijoje atlikto DPPH tyrimo, kuriame teigiama, jog didžiųjų dilgėlių šaknyse nustatomas didžiausias antioksidacinis aktyvumas, lyginant su kitais augalo organais [7]. Tokiems rezultatams įtakos galėjo turėti skirtingas žaliavos rinkimo laikas, klimato sąlygos, skirtingos metodikos.




***18 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvairavimas didžiųjų dilgėlių šaknyse skirtingose Lietuvos vietovėse; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

**Antioksidacinio aktyvumo įvairavimas didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse vegetacijos laikotarpiu.** Antioksidacinis aktyvumas didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse vegetacijos laikotarpiu įvertintas antiradikaliniu DPPH metodu. Didžiųjų dilgėlių lapuose didžiausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas rugpjūčio 25 d. (žydėjimo pabaigoje) – 179,33 ± 1,61 µmol TE/g, stiebuose birželio 2 d. (prieš žydėjimą) – 89,69 ± 0,45 µmol TE/g, o šaknyse spalio 6 d. (sėklų brandimo metu) – 40,78 ± 2,49 µmol TE/g surinktose žaliavose. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas visuose augalo organuose nustatytas rugpjūčio 4 dieną (žydėjimo metu) surinktoje žaliavoje (19 pav.). Nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų antioksidacinio aktyvumo skirtingais vegetacijos laikotarpiais. Adomėnienė ir kt. savo tyrime pastebėjo, jog stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi iki žydėjimo rinktų dilgėlių lapų ekstraktai [87]. Mūsų atliktame tyrime prieš žydėjimą nustatytas antioksidacinis aktyvumas taip pat stiprus, tačiau reikšmingai skyrėsi nuo didžiausio antioksidacinio aktyvumo žydėjimo pabaigoje.




***19 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvairavimas didžiųjų dilgėlių žaliavose vegetacijos metu; skirtingos raidės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp ėminių, (p<0,05)***

## 3.6. Didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų analizė UESC-MS/MS metodu

Didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties analizė atlikta taikant ultraefektyviosios skysčių chromatografijos su tandemine masių spektrometrija metodą. Tirtų skirtingose Lietuvos vietovėse surinktų didžiųjų dilgėlių žaliavų ekstraktuose identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti šie vyraujantys fenoliniai junginiai: chlorogeno rūgštis, chino rūgštis, kavos rūgštis, kumaro rūgštis, rutinas, izokvercitrinas, izoramnetin-3-O-rutinozidas. Pavieniuose mėginiuose mažais kiekiais nustatyti ir kiti junginiai: sinapo rūgštis, katechinas, rozmarino rūgštis, arbutinas, kemferolio-3-O-gliukozidas.

Nustatyta, kad didžiųjų dilgėlių lapuose dominuojantis junginys yra chlorogeno rūgštis, jos kiekis įvairuoja nuo 3078 ± 153,94 µg/g (Vilkaviškis) iki 5367,21 ± 268,36 µg/g (Rokiškis). Lietuvoje augančių didžiųjų dilgėlių lapuose vidutiniškai chlorogeno rūgšties nustatyta 4087,43 ± 204,37 µg/g. Daugiausiai chlorogeno rūgšties nustatyta Rokiškyje surinktos didžiųjų dilgėlių žaliavos ekstrakte – 5367,21 ± 268,36 µg/g. Mažesniais kiekiai didžiųjų dilgėlių lapuose randama chino rūgšties ir rutino, atitinkamai 1053,01 ± 52,65 µg/g ir 464,05 ± 23,20 µg/g. Tiek chino rūgšties, tiek rutino daugiausiai nustatyta Vilkaviškyje rinktoje žaliavoje. Nustatyti maži kiekiai izokvercitrino, izoramnetin-3-O-rutinozido ir kavos rūgšties, atitinkamai 47,16 ± 0,36 µg/g, 25,24 ± 1,26 µg/g ir 47,18 ± 0,36 µg/g (2 lentelė). Orčić ir kt. atlikto tyrimo metu nustatyta, jog didžiųjų dilgėlių lapuose daugiausiai aptinkama chlorogeno rūgšties, rutino ir izokvercitrino, taip pat dideli kiekiai nustatyti chino rūgšties ir kavos rūgšties [22]. Đurović ir kt. tyrinėjo didžiųjų dilgėlių lapų cheminę sudėtį, augalines žaliavas ekstrahuojant skirtingais metodais. Nustatyta, jog chlorogeno, kavos, ferulo, sinapo rūgštys aptinkamos tik tose ištraukose, pagamintose žaliavas ekstrahuojant ultragarso pagalba [90].

***2 lentelė. UESC-MS/MS metodu nustatyti fenolinių junginių kiekiai didžiųjų dilgėlių lapuose; $C_{min}$ – mažiausias fenolinio junginio kiekis (µg/g), $C_{max}$ – didžiausias fenolinio junginio kiekis (µg/g)***

| **Junginiai** | **Kiekis, µg/g** | | |
|---|---|---|---|
| | $C_{min}$ | $C_{max}$ | Vidurkis |
| Chlorogeno rūgštis | 3078,79 | 5367,21 | 4087,43 |
| Chino rūgštis | 616,29 | 1568,85 | 1053,01 |
| Rutinas | 142,54 | 1005,35 | 464,05 |
| Izokvercitrinas | 14,554 | 107,67 | 47,16 |
| Izoramnetin-3-O-rutinozidas | 8,86 | 111,34 | 25,24 |
| Kavos rūgštis | 24,74 | 64,76 | 47,18 |

Nustatyta, jog chlorogeno rūgštis yra dominuojantis junginys ir didžiųjų dilgėlių stiebuose, jos kiekis varijuoja nuo 203,04 ± 10,15 µg/g (Tauragės raj., Dauglaukio k.) iki 1405,84 ± 70,29 µg/g (Rokiškis). Mažesni kiekiai nustatyti chino rūgšties: nuo 205,68 ± 10,28 µg/g (Vilkaviškis) iki 560,47 ± 28,02 µg/g (Jurbarko raj., Girdžiai). Rutino ir kumarino rūgšties nustatyta kiek mažiau – 168,49 ± 8,42 µg/g ir 73,60 ± 3,68 µg/g atitinkamai. Didžiųjų dilgėlių stiebuose mažiausia nustatyta izokvercitrino – 15,57 ± 0,78 µg/g (3 lentelė). Pinelli ir kt. atliktame tyrime nustatyta, kad dominuojantis fenolinis junginys didžiųjų dilgėlių stiebuose taip pat yra chlorogeno rūgštis [8]. Pastarajame tyrime stiebuose taip pat identifikuotas rutinas, kumarino rūgštis, kavos rūgštis, kvercetinas.

***3 lentelė. UESC-MS/MS metodu nustatyti fenolinių junginių kiekiai didžiųjų dilgėlių stiebuose; $C_{min}$ – mažiausias fenolinio junginio kiekis (µg/g), $C_{max}$ – didžiausias fenolinio junginio kiekis (µg/g)***

| **Junginiai** | **Kiekis, µg/g** | | |
|---|---|---|---|
| | $C_{min}$ | $C_{max}$ | Vidurkis |
| Chlorogeno rūgštis | 203,04 | 1405,84 | 462,51 |
| Chino rūgštis | 205,68 | 560,47 | 400,26 |
| Rutinas | 59,50 | 404,30 | 168,49 |
| Kumarino rūgštis | 36,614 | 107,655 | 73,60 |
| Izokvercitrinas | 8,491 | 39,209 | 15,57 |

Šaknyse didžiausias kiekis nustatytas chino rūgšties, jos kiekis įvairuoja nuo 282,37 ± 14,12 µg/g (Ignalinos raj., Trainiškio k.) iki 645,81 ± 32,29 µg/g (Tauragė), vidutinis kiekis – 526,20 ± 26,31 µg/g. Daugiau nei 3 kartus mažesnis kiekis didžiųjų dilgėlių šaknyse nustatytas chlorogeno rūgšties – 138,32 ± 6,19 µg/g. Rutino didžiųjų dilgėlių šaknyse nustatyta mažiausiai – 15,73 ± 0,79 µg/g (4 lentelė). Tyrimo rezultatai patvirtina ir kitų mokslininkų tyrimų teiginius, jog didžiųjų dilgėlių šaknų ėminių kiekinė ir kokybinė sudėtis skiriasi nuo augalo antžeminės dalies ėminių sudėties, šaknų ekstraktuose fenolinių junginių kiekis yra žymiai mažesnis [8, 22].

***4 lentelė. UESC-MS/MS metodu nustatyti fenolinių junginių kiekiai didžiųjų dilgėlių šaknyse; $C_{min}$ – mažiausias fenolinio junginio kiekis (µg/g), $C_{max}$ – didžiausias fenolinio junginio kiekis (µg/g)***

| **Junginiai** | **Kiekis, µg/g** | | |
|---|---|---|---|
| | $C_{min}$ | $C_{max}$ | Vidurkis |
| Chlorogeno rūgštis | 17,57 | 434,47 | 138,32 |
| Chino rūgštis | 282,37 | 645,81 | 526,20 |
| Rutinas | 7,80 | 32,74 | 15,73 |

## 3.7. Didžiųjų dilgėlių fenolinių junginių kiekinės sudėties ir jų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo koreliacinių ryšių įvertinimas

Atlikta koreliacinė analizė norint išsiaiškinti, ar yra ryšys tarp skirtingose Lietuvos vietovėse augančių didžiųjų dilgėlių sudėtyje esančių fenolinių junginių ir antioksidacinio aktyvumo. Apskaičiuotas Pirsono koreliacijos koeficientas. Rezultatai pateikti 5 lentelėje.

***5 lentelė. Skirtingose vietovėse surinktų didžiųjų dilgėlių bendro fenolinių junginių, flavonoidų, hidroksicinamono rūgšties ir antioksidacinio aktyvumo Pirsono koreliacijos koeficientai ($p<0,05$)***

| | **Antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodas** | | |
|---|---|---|---|
| | DPPH | ABTS | FRAP |
| Bendras fenolinių junginių kiekis, mg/g | 0,969 | 0,777 | 0,975 |
| Bendras flavonoidų kiekis, mg/g | 0,822 | 0,616 | 0,864 |
| Hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis, mg/g | 0,904 | 0,747 | 0,948 |

Nustatyta, jog bendras fenolinių junginių ir hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis stipriai koreliuoja su DPPH, ABTS ir FRAP metodais įvertintu antioksidaciniu aktyvumu. Bendras flavonoidų

kiekis stipriai koreliuoja su antioksidaciniu aktyvumu, nustatytu DPPH ir FRAP metodais, vidutiniškai stipriai su ABTS metodo gautais rezultatais.

Taip pat įvertinti individualių fenolinių junginių kiekio nustatyto UESC metodu ir antioksidacinio aktyvumo koreliaciniai ryšiai (6 lentelė). Gauti fenolinių junginių priežastinio ryšio su antioksidaciniu aktyvumu *in vitro* rezultatai leidžia prognozuoti antioksidacinį aktyvumą *in vivo*.

***6 lentelė. Skirtingose vietovėse surinktų didžiųjų dilgėlių UESC metodu identifikuotų fenolinių junginių ir antioksidacinio aktyvumo Pirsono koreliacijos koeficientai (p<0,05)***

| **Junginiai** | **Antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodas** | | |
|---|---|---|---|
| | DPPH | ABTS | FRAP |
| Chlorogeno rūgštis | 0,889 | 0,788 | 0,930 |
| Chino rūgštis | 0,655 | 0,657 | 0,705 |
| Rutinas | 0,574 | 0,509 | 0,596 |
| Izokvercitrinas | 0,491 | 0,378 | 0,491 |

Chlorogeno rūgštis stipriai koreliuoja su DPPH, ABTS ir FRAP tyrimais nustatytu antioksidaciniu aktyvumu. Visais trimis tyrimais nustatytas antioksidacinis aktyvumas vidutiniškai koreliuoja su chino rūgštimi ir rutinu. Silpniausias koreliacinis ryšys nustatytas tarp izokvercitrino ir antioksidacinio aktyvumo.

## 3.8. Rezultatų apibendrinimas

Atlikus didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų, surinktų skirtingose Lietuvos vietovėse metanolinių ištraukų sudėties ir antioksidacinio aktyvumo tyrimus, galima teigti, jog bendras fenolinių junginių, flavonoidų, hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis ir ekstraktų antioksidacinis aktyvumas stipriai įvairuoja. Fenolinių junginių kiekis, nustatytas ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodu, taip pat įvairuoja skirtingose Lietuvos vietovėse rinktų žaliavų ištraukose. Šiuos skirtumus galėjo nulemti skirtingi augalo genotipai, skirtingos didžiųjų dilgėlių augimo sąlygos. Tokie augimo vietos parametrai kaip temperatūra, drėgmės kiekis, dirvožemio cheminė sudėtis, šviesos intensyvumas galimai turėjo įtakos fenolinių junginių įvairavimui didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse.

# IŠVADOS

1. Atlikus tyrimus, parinktos optimalios ekstrakcijos sąlygos fenolinių junginių kiekio nustatymui didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų ėminiuose: 30 min. ultragarso poveikio trukmė, ekstrakcijos tirpiklis – 80 proc. (V/V) metanolis.
2. Ištyrus bendro fenolinių junginių kiekio pasiskirstymą didžiųjų dilgėlių lapuose, stiebuose ir šaknyse skirtingose Lietuvos vietovėse, nustatyta, kad didžiausias fenolinių junginių kiekis visuose augalo organuose aptiktas Kauno raj., Domeikavoje, Rokiškyje ir Jurbarko raj., Girdžiuose surinktų žaliavų ištraukose. Bendras fenolinių junginių kiekis didžiųjų dilgėlių lapų ėminiuose varijavo nuo 122,95 ± 4,98 mg GRE/g iki 154,97 ± 1,68 mg GRE/g, stiebų ėminiuose – nuo 32,79 ± 0,47 mg GRE/g iki 41,31 ± 0,22 mg GRE/g, o šaknų ėminiuose – nuo 31,85 ± 0,62 mg GRE/g iki 40,62 ± 1,65 mg GRE/g. Didžiausias bendras flavonoidų kiekis nustatytas Jurbarke surinktų didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų ėminiuose (atitinkamai 20,16 ± 0,16 mg RE/g, 4,6 ± 0,32 mg RE/g ir 3,30 ± 0,22 mg RE/g). Didžiausias hidroksicinamono rūgšties darinių kiekis nustatytas Tauragės raj., Dauglaukio kaime rinktų lapų ėminiuose (30,21 ± 0,10 mg CRE/g).
3. Tyrimo metu nustatyta, jog didžiųjų dilgėlių lapuose ir stiebuose didžiausias fenolinių junginių kiekis rastas žydėjimo pabaigoje, o šaknyse – prieš žydėjimą. Didžiausias flavonoidų kiekis visuose augalo organuose nustatytas žydėjimo metu.
4. Stipriausias antioksidacinis aktyvumas, tiriant DPPH, FRAP ir ABTS metodais buvo nustatytas didžiųjų dilgėlių lapų, mažiausias – šaknų ėminiuose. Stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu, tiriant DPPH ir FRAP metodais, pasižymėjo Jurbarko raj., Girdžiuose, o ABTS metodu – Rokiškyje surinktų žaliavų ėminiai. Nustatyta, kad didžiausias antiradikalinis aktyvumas lapuose yra žydėjimo pabaigoje, stiebuose – prieš žydėjimą, o šaknyse – sėklų brendimo metu.
5. Atlikus didžiųjų dilgėlių lapų, stiebų ir šaknų ištraukų analizę UESC metodu, nustatyta, jog lapų ir stiebų ekstraktuose dominuojantis junginys yra chlorogeno rūgštis. Didžiausias chlorogeno rūgšties kiekis lapuose ir stiebuose nustatytas Rokiškyje surinktų žaliavų ištraukose, atitinkamai 5367,21 ± 268,36 µg/g ir 1405,84 ± 70,29 µg/g. Šaknų ekstraktuose daugiausiai nustatyta chino rūgšties, vidutinis jos kiekis ekstraktuose – 526,20 ± 26,31 µg/g.
6. Nustatytas stiprus koreliacinis ryšys tarp bendro fenolinių junginių bei chlorogeno rūgšties kiekio ir redukcinio aktyvumo, įvertinto FRAP metodu (atitinkamai 0,975 ir 0,930).

# PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Remiantis atliktų tyrimų rezultatais, geriausias laikotarpis didžiųjų dilgėlių augalinių žaliavių rinkimui farmacijos, kosmetikos ar maisto pramonei yra liepos–rugpjūčio mėnesiais. Šiuo metu lapai ir šaknys kaupia didžiausią fenolinių junginių kiekį ir pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu.

Siūloma atlikti tolimesnius tyrimus, nustatyti kitose Lietuvos vietovėse augančių didžiųjų dilgėlių žaliavų fenolinių junginių sudėtį, ištirti šaknyse kaupiamus sterolius ir lignanus.

# LITERATŪROS SĄRAŠAS


1. Asgarpanah J, Mohajerani R. Phytochemistry and pharmacologic properties of Urtica dioica L. Journal of Medicinal Plants Research. 2012; 6(46): 5714-9.
2. Ragažinskienė O, Rimkienė S, Sasnauskas V. Vaistinių augalų enciklopedija. Kaunas: Lututė; 2005.
3. Pullalah T and Naidu KC: Antidiabetic Plants in India and Herbal Based Antidiabetic Research 2003;3
4. European Pharmacopoeia 9th ed. Strasbourg, 2017.
5. Fiamegos Y, Nanos C, Vervoort J, Stalikas C. Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. Journal of Chromatography A. 2004;1041(1-2):11-18.
6. Huda J, Mohammed Y, Imad H. Phytochemical analysis of Urtica dioica leaves by fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 2015;7(10):238-252.
7. Otles S, Yalcin B. Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. The Scientific World Journal. 2012;2012:1-12.
8. Pinelli P, Ieri F, Vignolini P, Bacci L, Baronti S, Romani A. Extraction and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Leaves, Stalks, and Textile Fibers of Urtica dioica L. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008;56(19):9127-9132.
9. Proestos C, Boziaris I, Nychas G, Komaitis M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food Chemistry. 2006;95(4):664-671.
10. Hoşbaş, S., Aslan, M. and Sezik, E. Quality assessment of Urtica dioica L. samples collected from different locations of Turkey. Turkey Journal Pharm Science.2014; 11(2), 223–230.
11. Gul S, Demirci B, Başer KH, Akpulat HA, Aksu P. Chemical composition and in-vitro cytotoxic, genotoxic eects of essential oil from Urtica dioica L. Bull Environ Contam Toxicol. 2012;88:666-71.
12. EMEA.Assessment report on urtica dioica l., and urtica urens l., herba. Prieiga per internetą: http://www.ema.europa.eu.
13. Upton R. Stinging nettles leaf (Urtica dioica L.): Extraordinary vegetable medicine. Journal of Herbal Medicine. 2013;3(1):9-38.

14. Rajput P, Chaudhary M and Sharma RA: Phytochemical and pharmacological importance of genus Urtica - A review. Int J Pharm Sci Res 2018; 9(4): 1387-96.
15. Savickienė N., Dagilytė A., Lukošius A., Žitkevičius V. Biologiškai veikliųjų junginių ir augalų reikšmė cukrinio diabeto komplikacijų prevencijai. Medicina. 2002; 38(10): 970-975.
16. Kregiel D, Pawlikowska E, Antolak H. Urtica spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. Molecules. 2018;23(7):1664.
17. Ullah R, Hussain I, Ahmad S. Diocanol; one new phenol derivative isolated and characterized from Urtica dioica. Arabian Journal of Chemistry. 2017;10:S1284-S1286.
18. Ilies DC, Tudor I, Radulescu V. Chemical composition of the essential oil of Urtica dioica. Chem Nat Comp 2012; 48(3): 506-7.
19. Chemical Composition and Immuno-Modulatory Effects of Urtica dioica L. (Stinging Nettle) Extracts. Phytotherapy Research, 2017;31(8), 1183–1191.
20. Nencu I, Vlase L; Istudor V, Mircea T. Preliminary research regarding urtica urens and urtica dioica. Farmacia 2015; 63(5): 710-5.
21. Nahata A, Dixit VK. Ameliorative effects of stinging nettle (Urtica dioica) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats. Andrologia 2012; 44: 396-409.
22. Orčić D, Francišković M, Bekvalac K, Svirčev E, Beara I, Lesjak M et al. Quantitative determination of plant phenolics in Urtica dioica extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. Food Chemistry. 2014;143:48-53.
23. How to use the monographs. Principles and Practice of Phytotherapy. 2013;353-961.
24. Kianbakht S, Khalighi-Sigaroodi F, Dabaghian F. Improved Glycemic Control in Patients with Advanced Type 2 Diabetes Mellitus Taking Urtica dioica Leaf Extract: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. Clinical Laboratory. 2013;59(09+10/2013):1071-1076.
25. The Effect of Urtica Dioica Extract on Glycemic Control and Insulin Resistance Indices in Patients with Type2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial [Internetas]. [žiūrėta 2019-03-28]. Prieiga per internetą: http://ijdo.ssu.ac.ir/article-1-208-en.pdf.
26. Daher C, Baroody K, Baroody G. Effect of Urtica dioica extract intake upon blood lipid profile in the rats. Fitoterapia. 2006;77(3):183-188.
27. Das M, Sharma BP, Rokeya B. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activity of Urtica dioica on type 2 diabetic model rats. J Diabetol 2011; 2(2): 1-6.
28. Testai L, Chericoni S, Calderone V, Nencioni G, Nieri P, Morelli I et al. Cardiovascular effects of Urtica dioica L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. Journal of Ethnopharmacology. 2002;81(1):105-109.

29. Amiri Behzadi A, Kalalian-Moghaddam H, Ahmadi AH. Effects of Urtica dioica supplementation on blood lipids, hepatic enzymes and nitric oxide levels in type 2 diabetic patients: A double blind, randomized clinical trial. Avicenna J phytomedicine.2016; 6(6):686–95.
30. Pagano E, Laudato M, Griffo M, Capasso R. Phytotherapy of benign prostatic hyperplasia. A mini review. Phytother Res 2014;28(7):949–55.
31. Nahata A, Dixit V. Ameliorative effects of stinging nettle (Urtica dioica) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats. Andrologia. 2011;44:396-409.
32. Ghorbanibirgani A, Khalili A, Zamani L. The Efficacy of Stinging Nettle (Urtica Dioica) in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia: A Randomized Double-Blind Study in 100 Patients. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2013;15(1).
33. Morgia G, Privitera S. Phytotherapy in Benign Prostatic Hyperplasia. Lower Urinary Tract Symptoms and Benign Prostatic Hyperplasia. 2018;:135-175.
34. Safarinejad M. Urtica dioicafor Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia. Journal of Herbal Pharmacotherapy. 2005;5(4):1-11.
35. Motamedi H, Seyyednejad S, Bakhtiari A, Vafaei M. Introducing Urtica dioica, A Native Plant of Khuzestan, As an Antibacterial Medicinal Plant. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2014;9(4).
36. Salehzadeh A, Asadpour L, Naeemi AS, Houshmand E. Antimicrobial activity of methanolic extracts of Sambucus ebulus and Urtica dioica against clinical isolates of methicillin resistant staphylococcus aureus. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2014; 11(5): 38-40.
37. Zenão S, Aires A, Dias C, Saavedra M, Fernandes C. Antibacterial potential of Urtica dioica and Lavandula angustifolia extracts against methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from diabetic foot ulcers. Journal of Herbal Medicine. 2017;10:53-58.
38. Gülçin İ, Küfrevioğlu Ö, Oktay M, Büyükokuroğlu M. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (Urtica dioica L.). Journal of Ethnopharmacology. 2004;90(2-3):205-215.
39. Jan KN and Zarafshan K: Stinging nettle (*Urtica dioica* ): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential, Journal of food measurement and Characterizaton, 2017; 11(2): 423-433.
40. Roschek Jr. B, Fink RC, McMichael M, Alberte RS. Nettle extract (Urtica dioica) affects key receptors and enzymes associated with allergic rhinitis. Phytother Res 2009;23(7):9206.
41. Bakhshaee M, Mohammad Pour AH, Esmaeili M, Jabbari Azad F, Alipour Talesh G, Salehi M, et al. Efficacy of Supportive Therapy of Allergic Rhinitis by Stinging Nettle (Urtica dioica) root

extract: a Randomized, Double-Blind, Placebo- Controlled, Clinical Trial. Iran J Pharm Res IJPR. 2017;16(Suppl):112–8.

42. Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. Plant extracts from stinging nettle (Urtica dioica), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-κB. FEBS Letters. 1999;442(1):89-94.
43. Johnson TA, Sohn J, Inman WD, Bjeldanes LF, Rayburn K. Lipophilic stinging nettle extracts possess potent anti-inflammatory activity, are not cytotoxic and may be superior to traditional tinctures for treating inflammatory disorders. Phytomedicine 2013; 20(2): 143-7.
44. Asgarpanah J, Mohajerani R. Phytochemistry and pharmacologic properties of Urtica dioica L. J Med Plants Res 2012; 6(46): 5714-9.
45. Joshi BC, Prakash A, Kalia AN. Hepatoprotective potential of antioxidant potent fraction from Urtica dioica Linn.(whole plant) ion CCl4 challanged rats. Toxicol Reports 2015; 2: 1101-10.
46. Kataki MS, Murugamani V, Rajkumari A, Mehra PS, Awasthi D, Yadav RS. Antioxidant, hepatoprotective and anthelmintic activities of methanol extract of Urtica dioica L. Leaves. Pharm Crops 2012; 3: 38-46.
47. Ozkol H, Musa D, Tuluce Y, Koyuncu I. Ameliorative influence of Urtica dioica L against cisplatin induced toxicity in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. Drug Chem Toxicol 2011; 1-7.
48. KandisH, KarapolatS, YildirimU, SaritasA, GezerS, MemisogullariR. Effects of Urtica dioica on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Clin (Sao Paulo) 2010;65:1357-61.
49. Joshi BC, Mukhija M, Semwal S. Antioxidant potential and total phenolic content of Urtica dioica (whole plant). J App Pharm 2015; 7(2): 120-8.
50. Telo S, Halifeoglu I, Ozercan IH. Effects of Stinging Nettle (Urtica Dioica L.,) on Antioxidant Enzyme Activities in Rat Model of Mammary Gland Cancer. Iran J Pharm Res IJPR. 2017;16(Suppl):164–70.
51. Richard T, Temsamani H, Cantos-Villar E, Monti J. Application of LC–MS and LC–NMR Techniques for Secondary Metabolite Identification. Advances in Botanical Research. 2013;:67-98.
52. Vuolo M, Lima V, Maróstica Junior M. Phenolic Compounds. Bioactive Compounds. 2019;:33-50.
53. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013. Dietary (Poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxidants and Redox Signaling. 18, 1818–1892
54. Falcone Ferreyra M, Rius S, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Frontiers in Plant Science. 2012;3.

55. Sangeetha, K.S.S., S. Umamaheswari, C.U.M. Reddy and S.N. Kalkura. Flavonoids: Therapeutic potential of natural pharmacological agents. Int. J. Pharm. Sci. Res. 7: 3924–3930, 2016.
56. UE S, CHENG J, MA W, CHEN K, LIU Y, LI J. Comparison of Lipoxygenase, Cyclooxygenase, Xanthine Oxidase Inhibitory Effects and Cytotoxic Activities of Selected Flavonoids. DEStech Transactions on Environment, Energy and Earth Sciences. 2017;(gmee).
57. Walker E, Pacold M, Perisic O, Stephens L, Hawkins P, Wymann M et al. Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. Molecular Cell. 2000;6(4):909-919.
58. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia. 2011;82(4):513-523.
59. Valdas Jakštas, Valdimaras Janulis, Sonata, Trumbeckaitė, Cheminis fitopreparatų tyrimas. 2009, P.75,7678,79,84,87.
60. Narayana, K.R.; Reddy, M.S.; Chaluvadi, M.R.; Krishna, D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Ind. J. Pharmacol., 2001, 33, 2-16.
61. Chikezie, P.C., Ibegbulem, C.O., Mbagwu, F.N., 2015. Bioactive principles from medicinal plants. Research Journal of Phytochemistry. 9, 88–115.
62. Kumar S, Pandey A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids. The Scientific World Journal. 2013;2013:1-16.
63. Khan H, Marya, Amin S, Kamal M, Patel S. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018;101:860-870.
64. Masuoka N, Matsuda M, Kubo I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. Food Chemistry. 2012;131(2):541-545.
65. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. The American Journal of Clinical Nutrition 2001; 74: 418–25.
66. Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazón J. Phenolic Acids. Natural Products. 2013;:1951-1973.
67. Lyu S-W, Blum U, Gerig TM, O'Brien TE. Effects of mixtures of phenolic acids on phosphorus uptake by cucumber seedlings. J Chem Ecol. 1990 Aug;16(8):2559–67.
68. Dai J, Mumper RJ. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. Molecules. 2010 Oct 21;15(10):7313–52.

69. Vajić U, Grujić-Milanović J, Živković J, Šavikin K, Gođevac D, Miloradović Z et al. Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. Industrial Crops and Products. 2015;74:912-917.
70. Bandar, H.; Hijazi, A.; Rammal, H.; Hachem, A.; Saad, Z.; Badran, B. Techniques for the Extraction of Bioactive Compounds from Lebanese Urticadioica. Am. J. Phytomed. Clin. Ther. 2013,6, 507–513.
71. Ignat I, Volf I, Popa V. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry. 2011;126(4):1821-1835.
72. Khoddami A, Wilkes M, Roberts T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Molecules. 2013;18(2):2328-2375.
73. Ainsworth E, Gillespie K. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature Protocols. 2007;2(4):875-877.
74. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. Food Analytical Methods. 2014;7(9):1776-1782.
75. Pontis J, Costa L, Silva S, Flach A. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. Food Science and Technology. 2014;34(1):69-73.
76. Naczk M SF. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A 2004;1054:95-111.
77. Feliciano R, Shea M, Krueger C, Howell A, Reed J. Comparison of Isolated Cranberry (Vaccinium macrocarpon Ait.) Proanthocyanidins to Catechin and Procyanidins A2 and B2 for Use as Standards in the 4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde Assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012;60(18):4578-4585.
78. Muresan M, Benedec D, Vlase L, Oprean R, Toiu A, Oniga I, Screening of polyphenolic compounds, antioxidant and antimicrobial properties of Tanacetum vulgare from Transylvania. Studia UBB Chemia, 2015; 60(1): 127-138.
79. Grubešić R, Kremer D, Končić M, Rodríguez J, Randić M. Quantitative analysis of polyphenols and antioxidant activity in four Daphne L. species. Open Life Sciences. 2012;7(6).
80. Dar S, Ganai F, Yousuf A, Balkhi M, Bhat T, Sharma P. Pharmacological and toxicological evaluation ofUrtica dioica. Pharmaceutical Biology. 2012;51(2):170-180.
81. Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, Sánchez-Contreras A, Pacheco N. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. Agronomy. 2017;7(3):47.
82. González-Burgos E, Liaudanskas M, Viškelis J, Žvikas V, Janulis V, Gómez-Serranillos M. Antioxidant activity, neuroprotective properties and bioactive constituents analysis of varying

polarity extracts from Eucalyptus globulus leaves. Journal of Food and Drug Analysis. 2018;26(4):1293-1302.

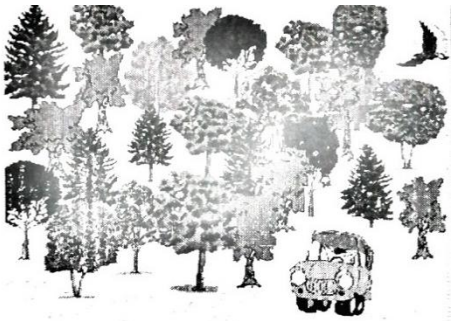
83. Ganzera M, Piereder D, Sturm S, Erdelmeier C, Stuppner H. Urtica dioica agglutinin: Separation, identification, and quantitation of individual isolectins by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry. Electrophoresis. 2005;26(9):1724-1731.
84. Soto M, Falqué E, Domínguez H. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. Cosmetics. 2015;2(3):259-276.
85. Babbar N, Oberoi H, Sandhu S, Bhargav V. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. Journal of Food Science and Technology. 2012;51(10):2568-2575.
86. Do Q, Angkawijaya A, Tran-Nguyen P, Huynh L, Soetaredjo F, Ismadji S et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. Journal of Food and Drug Analysis. 2014;22(3):296-302.
87. Adomėnienė A, Gaivelytė K, Gaurylienė R. Didžiųjų dilgėlių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo ir fenolinių junginių eksperimentiniai tyrimai. Sveikatos mokslai. 2016; 26 tomas, Nr. 6, p. 165-168.
88. Kukric Z, Topalic-Trivunovic L, Kukavica B, Matos S, Pavicic S, Boroja M et al. Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (Urtica dioica L.). Acta periodica technologica. 2012;(43):257-272.
89. Hudec J, Burdová M, Kobida L, Komora L, Macho V, Kogan G et al. Antioxidant Capacity Changes and Phenolic Profile ofEchinacea purpurea, Nettle (Urtica dioicaL.), and Dandelion (Taraxacum officinale) after Application of Polyamine and Phenolic Biosynthesis Regulators. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007;55(14):5689-5696.
90. Đurović S., Pavlić B., Šorgić S., Popov S., Savić S., Pertonijević M., Radojković M., Cvetanović A., Zeković Z. Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. J. Funct. Food. 2017;32:18–26.

# PRIEDAI

## 1. Magistro darbo rezultatai pristatyti konferencijoje

2019 m. gegužės 8-10 d. 25-oji tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija „ŽMOGAUS IR GAMTOS SAUGA 2019“. Stud. Agnė Stankaitytė, Vaidotas Žvikas, dr. Audronis Lukošius (LSMU). Didžiųjų dilgėlių (*Urtica dioica* L.) lapų, stiebų ir šaknų ėminių fenolinių junginių sudėties ir jų ištraukų redukcinio aktyvumo *in vitro* įvairavimo įvertinimas. Žodinis pranešimas.

VYTAUTO DIDŽIOJO
UNIVERSITETO
ŽEMĖS ŪKIO
AKADEMIJA



25th International Scientific-Practical Conference
***HUMAN AND NATURE SAFETY 2019***

8–10 May, 2019

# *CERTIFICATE*

This is to certify that

**Agnė Stankaitytė, Vaidotas Žvikas, Audronis Lukošius**

attended 25th International Scientific-Practical Conference
***HUMAN AND NATURE SAFETY 2019***

and presented a report

**Evaluation of the phenolic compounds and variability o f *in vitro* antioxidant activity in the extracts of Nettle (*Urtica dioica* L.) leaves, stems and roots**

Deputy Chancellor of Vytautas Magnus University Agriculture Academy

dr. Jurgita Baranauskienė

Vice-chairman of Organizational Scientific Committee of the Conference

assoc. prof. dr. Ričardas Butkus

Reg. No. M/2019-05-10/41