

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

FARMACIJOS FAKULTETAS

INA BARADINSKAITĖ

**AMINORŪGŠČIŲ ĮVAIRAVIMO TYRIMAI KRAUJAŽOLIŲ
(*ACHILLEA L.*) AUGALINĖJE ŽALIAVOJE TAIKANT DUJŲ
CHROMATOGRAFIJOS-MASIŲ SPEKTROMETRIJOS METODĄ**

Magistro baigiamasis darbas

Vientisujų studijų programa „Farmacija“, valstybinis kodas 6011GX003

Studijų kryptis „Farmacija“

Darbo vadovas:

Prof. Dr. Andrejus Ževžikovas

KAUNAS, 2022

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
FARMACIJOS FAKULTETAS
ANALIZINĖS IR TOKSIKOLOGINĖS CHEMIJOS KATEDRA

TVIRTINU:

Farmacijos fakulteto dekanė Ramunė Morkūnienė

**AMINORŪGŠČIŲ ĮVAIRAVIMO TYRIMAI KRAUJAŽOLIŲ
(ACHILLEA L.) AUGALINĖJE ŽALIAVOJE TAIKANT DUJŲ
CHROMATOGRAFIJOS-MASIŲ SPEKTROMETRIJOS METODĄ**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas:

Prof. Dr. Andrejus Ževžikovas

Data: Parašas:

Recenzentas:

Darbą atliko:

Magistrantė Ina Baradinskaitė

Parašas:

Parašas:

Data:

Data:

TURINYS

SANTRAUKA	5
SUMMARY	6
PADĖKA.....	7
SANTRUMPOS.....	8
ĮVADAS.....	9
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1. 1 Paprastoji kraujažolė (<i>Achillea millefolium</i> L.).....	11
1. 1. 1 Bendroji augalo charakteristika	11
1. 1. 2 Fitocheminė augalo sudėtis	12
1. 1. 3 Panaudojimas pramonėje ir tradicinėje medicinoje.....	13
1. 1. 4 Farmakologinės savybės.....	13
1. 2 Aminorūgštys.....	15
1. 2. 1 Bendroji charakteristika.....	15
1. 2. 2 Klasifikacija.....	16
1. 2. 3 Taikomi analizės metodai.....	19
1. 2. 4 Dujų chromatografija.....	19
2. TYRIMO METODIKA.....	21
2.1 Tyrimo organizavimas	21
2. 2 Tyrimo objektas	21
2. 3 Tyrimo reagentai ir aparatūra	21
2. 4 Dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodikos pritaikymas AR nustatymui	22
2. 4. 1 Tiriamųjų tirpalų paruošimas.....	22
2. 4. 2 Tyrimo sąlygos, atliekant dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu	23
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	24
3. 1 Aminorūgščių kokybinis nustatymas.....	24
3. 2 Aminorūgščių kiekybinis nustatymas.....	25

3. 2. 1 Alanino kiekybinis nustatymas skirtingų rūšių kraujažolės žaliavose	26
3. 2. 2 Valino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje	26
3. 2. 3 Leucino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje	27
3. 2. 4 Isoleucino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje	28
3. 2. 5 Prolino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje	28
3. 2. 6 Serino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje	29
3. 2. 7 Treonino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje	30
3. 2. 8 Fenilalanino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje	30
3. 2. 9 Asparto rūgšties kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje	31
3. 2. 10 Glutamo rūgšties kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje	32
3. 2. 11 Tirozino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje	32
4. IŠVADOS.....	37
5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	38
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	39
7. PRIEDAI	43

SANTRAUKA

I. Baradinskaitės magistro baigiamasis darbas/ mokslinis vadovas Prof. dr. A. Ževžikovas; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Farmacijos fakulteto, Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra. – Kaunas.

Pavadinimas: Aminorūgščių įvairavimo tyrimai kraujažolių (*Achillea L.*) augalinėje žaliavoje taikant dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodą.

Darbo tikslas: Kokybiškai bei kiekybiškai įvertinti aminorūgščių, išskirtų iš kraujažolių (*Achillea L.*) augalinės žaliavos, įvairavimą dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu.

Darbo uždaviniai: 1. Remiantis surinkta moksline literatūra, modifikuoti ir pritaikyti literatūros šaltiniuose publikuojamas aminorūgščių išskyrimo iš kraujažolių žaliavos metodikas. 2. Kokybiškai ir kiekybiškai įvertinti aminorūgštis, išskirtas iš kraujažolių (*Achillea L.*), dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu. 3. Palyginti identifikuotų aminorūgščių kokybinę ir kiekybinę sudėtį tarp įvairių kraujažolių (*Achillea L.*) rūšių.

Naudoti metodai:

Aminorūgščių išskyrimui iš augalinės žaliavos buvo naudoti ekstrakcijos metodai. Geriausios ekstrakcijos sąlygos buvo pasiektos naudojant metanolį kaip tirpiklį ir veikiant mėginius ultragarsu. Panaudojus derivatizacijos reagentą MTBSTFA, kokybinis ir kiekybinis aminorūgščių nustatymas buvo atliktas dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu.

Rezultatai ir išvados:

1. Optimaliausios sąlygos aminorūgščių ekstrakcijai iš kraujažolės žaliavos buvo pasiektos 1 g žaliavos ekstrahavus metanoliumi ir paveikus ultragarsu.
2. Naudojant 16 aminorūgščių standartų mišinį, dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu buvo identifikuota 11 AR. Vertinant atskirų aminorūgščių kiekius, rezultatai sutapo su kitų mokslininkų atliktais tyrimais – prolinas pasižymėjo didžiausiomis koncentracijomis visose tirtose rūšyse.
3. Leucinas, izoleucinas, serinas, prolinas ir valinas buvo identifikuoti visose tirtose rūšyse. Kiekybinio įvertinimo metu bendras didžiausias AR kiekis buvo nustatytas *Achillea arabica* rūšies žaliavoje – lapuose ir žieduose esančių aminorūgščių suma buvo 4944,92 µg/g. Mažiausias nustatytas bendras kiekis buvo 1099,41 µg/g *A. wilhelmsii* rūšies žaliavoje.
4. Lyginant AR kiekius lapuose ir žieduose, didesnės koncentracijos buvo aptiktos žieduose.

SUMMARY

Final Master's thesis by I. Baradinskaitė/ supervisor Prof. dr. A. Ževžikovas; Department of Analytical and Toxicological Chemistry at the Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences. – Kaunas

Title: Investigations of amino acids diversification in yarrow (*Achillea* L.) plant raw material using gas chromatography-mass spectrometry method.

The aim: Qualitatively and quantitatively evaluate the amino acids diversification in yarrow (*Achillea* L.) plant raw material using gas chromatography-mass spectrometry method.

The objectives: 1. To modify and apply methods for the extraction of amino acids from the raw material from yarrow plant, using scientific literature. 2. Qualitatively and quantitatively evaluate the amino acids, extracted from yarrow (*Achillea* L.) plant raw material, using gas chromatography-mass spectrometry method. 3. To compare the qualitative and quantitative composition of the identified amino acids between different species of yarrow (*Achillea* L.).

Methods used:

Due to the separation of amino acids from raw plant material, extraction methods were performed. The best conditions were reached using methanol as a solvent by subjecting the samples to ultrasound. After using derivatization reagent MTBSTFA, qualitative and quantitative evaluation was performed by gas chromatography-mass spectrometry method.

Results and conclusions:

1. The optimal conditions for amino acids extraction from yarrow plant raw material were reached in 1g. extraction of the raw material with methanol and by subjecting samples to ultrasound.
2. Using a mixture of 16 amino acid standards, 11 amino acids were identified by gas chromatography-mass spectrometry. When determining separate amino acids quantitatively, the results coincided with experiments of other scientists – proline had the highest concentrations in all species tested.
3. Leucine, isoleucine, serine, proline, and valine were detected in all species tested. During the quantitative evaluation, it was found that the highest total amount of amino acids was detected in the raw material of *Achillea arabica* species – the sum of amino acids in leaves and flowers was 4944,92 µg/g. The lowest total amount found was 1099,41 µg/g in *A. wilhelmsii* raw material.
4. By comparison between amino acid levels in leaves and flowers, it was found that there are higher concentration of amino acids in flowers.

PADĖKA

Už naudingus patarimus ir įžvalgas rašant magistro baigiamąjį darbą noriu padėkoti darbo vadovui Prof. dr. Andrejui Ževžikovui. Už pagalbą laboratorijoje atliekant praktinę darbo dalį ir konsultacijas aptariant gautus rezultatus dėkoju lekt. Mindaugui Marksai.

SANTRUMPOS

AAA – aminorūgščių analizavimas

AFSC – atvirkštinių fazių skysčių chromatografija

AR – aminorūgštys

DC-MS – dujų chromatografija-masių spektrometrija

ESC – efektyvioji skysčių chromatografija

HNE – žmogaus neutrofilų elastazė

KE – kapiliarinė elektroforezė

MMP – matricos metaloproteinazė

MTBSTFA – N-metil-N-(tert-butildimetilsilyl)trifluoroacetamidas

PTH – feniltiohidantoinas

SSC – superkritinių skysčių chromatografija

IVADAS

Paprastoji kraujažolė (*Achillea millefolium* L.) yra nuo seno žinomas ir plačiai paplitęs augalas, vertinamas dėl savo naudingųjų savybių žmogaus organizmui. Augalinė žaliava naudinga kosmetikos priemonių kūrimo, aromaterapijoje, taip pat dėl kartaus skonio naudojama kaip prieskonis. Tačiau svarbiausias – farmakologinis poveikis, kuris apima kraujavimo stabdymą, virškinimo gerinimą, antibakterinį, priešgrybelinį, analgetinį, priešūždegiminį aktyvumą ir kitas darbe aptariamas indikacijas [1,2,3]. Fitocheminė sudėtis įvairuoja dėl aplinkos sąlygų, o farmakologiškai svarbiausiais komponentais laikomi flavonoidai ir fenolinės rūgštys [4, 5].

Aminorūgštys (AR) yra ne tik baltymų statybiniai blokai, bet ir atlieka daug svarbių fiziologinių funkcijų augalų, gyvūnų ir žmonių organizmuose [6]. Jos yra būtinos visų tipų ląstelių veiklai – homeostazės palaikymui, signalizavimui, augimui, vystymuisi ir išlikimui. Žmonėms AR taip pat naudingos medžiagų apykaitos ir infekcinių ligų prevencijai, gydant tam tikrus virškinimo, neurologinius, reprodukcinės bei širdies ir kraujagyslių sistemos sutrikimus [7]. Atitinkamas baltymų kiekis maiste yra būtinas bendrai žmonių sveikatai. Ypatingas dėmesys dėl nepakankamo aminorūgščių balanso organizme turėtų būti skiriamas nėštumo, laktacijos metu, augantiems vaikams ir senyviems žmonėms. Tačiau per didelis AR kiekis gali būti žalingas [7, 8].

Šio darbo tikslas yra dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu nustatyti kraujažolės žaliavoje esančių aminorūgščių įvairavimą. Metodas ir žaliava pasirinkti dėl to, nes literatūroje mažai tyrimų analizuojant AR dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

Kokybiškai bei kiekybiškai įvertinti aminorūgščių, išskirtų iš kraujažolių (*Achillea L.*) augalinės žaliavos, įvairavimą dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu.

Darbo uždaviniai:

1. Remiantis surinkta moksline literatūra, modifikuoti ir pritaikyti literatūros šaltiniuose publikuojamas aminorūgščių išskyrimo iš kraujažolių žaliavos metodikas.
2. Kokybiškai ir kiekybiškai įvertinti aminorūgštis, išskirtas iš kraujažolių (*Achillea L.*) žaliavos, taikant dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodą.
3. Palyginti identifikuotų aminorūgščių kokybinę ir kiekybinę sudėtį tarp įvairių kraujažolių (*Achillea L.*) rūšių.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1. 1 Paprastoji kraujažolė (*Achillea millefolium* L.)

1. 1. 1 Bendroji augalo charakteristika

Tai daugiametis žolinis augalas, priklausantis *Asteraceae* (dar vadinamai *Compositae*) šeimai, kurio plaukuotas stiebas gali siekti 80 cm. Augalo išskirtinumą geriausiai atspindi baltos, geltonos, oranžinės ar rožinės spalvos gausūs žiedeliai [9, 10]. Labiausiai paplitę balti [2]. Jie smulkūs, skėtiški ir žydi birželio – rugsėjo mėnesiais. Stiebas stačias, šakotas ir plaukuotas. Lapai 3 kartus plunksniški, o jų forma lancetiška [9, 10]. Pauosčius lapus jaučiamas specifinis aromatas, taip pat jie yra apaugę plaukeliais [11]. (1 paveikslas)



1 pav. Paprastoji kraujažolė (Achillea millefolium L.) [12]

Kraujažolės žaliavos vertingumas ir žinomumas nuo senų laikų yra neginčytinas. Šis augalas yra vienas iš šešių, kurių žiedadulkių buvo rasta Homo Neanderthalensis kape Šanidare [1]. Gentis pavadinta senovės Graikų mitologijos Trojos kario Achilo garbei, kuris supratęs vertingąsias savybes naudojo šį augalą savo bendražygių žaizdų gydymui ir kraujavimo stabdymui [1, 9]. Augalas kilęs iš Europos, 110 – 140 rūšių randama Europoje ir Azijoje, kiek mažiau Šiaurės Amerikoje ir Šiaurės Afrikoje, o beveik 40 rūšių – Turkijoje [4, 13]. Augalas jau daugiau nei 3000 metų įtrauktas į dažniausiai liaudies ir tradicinėje medicinoje naudojamas augalų rūšis. Yra plačiai paplitęs ir prisitaikęs augti ne tik vidutinio klimato sausose vietose, bet ir dykumose bei jūros pakrantėse ar kalnuose [1, 9]. Idealiausios ekologinės sąlygos yra vėsesnė, sausesnė ir mažiau saulėta aplinka [2]. Lietuvoje savaime auga trys kraujažolių rūšys. Labiausiai paplitusi ir auganti pievose, ganyklose, pakelėse, pamiškėse ar šlaituose

yra paprastoji kraujažolė (*Achillea millefolium* L.). Kiek rečiau sutinkama ir auganti pievose prie upių ar krūmynuose yra krantinė kraujažolė (*Achillea salicina* L.). Pati rečiausia, randama paežerių ar paupių pievose – pievinė (čiaudulinė) kraujažolė (*Achillea ptarmica* L.) (2 paveikslas). Visos kitos rūšys yra atvežtinės, o Kauno botanikos sode auginama daugiau nei 20 kraujažolių rūšių [14].



2 pav. Čiaudulinė kraujažolė (*Achillea ptarmica* L.) [15]

Buvo palyginti Lietuvoje (LT), Irane (IRN), Slovėnijoje (SVN), Ispanijoje (ESP), Kanadoje (CAN), Jungtinėse Amerikos valstijose (USA), Japonijoje (JPN), Austrijoje (AUT) surinktų kraujažolių morfologiniai skirtumai. Žemiausios aptiktos USA (18,66 cm), o aukščiausios – LT (65,4 cm). Didžiausio diametro žiedynai – USA (12 cm), mažiausio – SVN (4,1 cm) [16].

1.1.2 Fitocheminė augalo sudėtis

Kraujažolių fitocheminė sudėtis gali įvairuoti dėl aplinkos sąlygų, fenotipo ir genotipo. Pavyzdžiui, baltosios kraujažolės kaupia daugiau eterinių aliejų, kvepia saldžiai kaip medus, tuo tarpu rožinėse – daugiau flavonoidų [2]. Flavonoidai (pvz.: luteolinas, apigeninas) ir fenolinės rūgštys (pvz.: chlorogeninė rūgštis) farmakologiniu požiūriu yra laikomi vertingiausiais komponentais [4, 5]. Atlikti moksliniai tyrimai patvirtina kitų kaupiamų bioaktyvių junginių gausą – galima rasti seskviterpenoidų (pvz.: seskviterpeno laktonų esterių, achilifolino ir kt.), eterinių aliejų, monoterpenų (pvz.: kamparo, borneolio), lignanų, proazulenų (pvz.: chamazuleno) [1, 17]. Be to, kraujažolėje yra organinių rūgščių (malono, oksalo), nesočiųjų riebalų rūgščių, aminorūgščių, tokoferolių, cukrų, vitaminų C ir K, alkaloidų ir kt. [2, 18]. Iš viso šiuo metu yra nustatyta daugiau kaip šimtas bioaktyvių junginių [4].

1.1.3 Panaudojimas pramonėje ir tradicinėje medicinoje

Kraujažolės žolė gali būti naudojama maisto ruošime kaip prieskonis, turintis kartų skonį arba ruošiant arbatas. Taip pat jų eterinis aliejus gali būti svarbus kosmetikos priemonių kūrimo arba aromaterapijoje. Svarbiausias yra panaudojimas medicininiais tikslais [2, 3]. Tradicinėje medicinoje kraujažolės nuovirais ar arbatomis žmonės buvo gydomi nuo anoreksijos, viduriavimo, gyvatės įkandimų, tuberkuliozės. Taip pat atitinkamai paruošta žaliava buvo naudojama galvos ir dantų skausmui mažinti, sedacijai sukelti, bet dažniausiai virškinimui ir kraujavimo stabdymui, žaizdų gydymui [1].

1.1.4 Farmakologinės savybės

Medicininiais tikslais naudojama ne tik antžeminė dalis, bet ir šaknys, tačiau farmakologiškai aktyviausia augalo dalis – žiedynai [19]. Dėl biologiškai aktyvių junginių įvairovės kraujažolė gali būti naudinga įvairiu poveikiu:

- Antinavikinis ir antioksidacinis veiksmingumas.

Buvo tirtas *Achillea millefolium* L. antinavikinis aktyvumas prieš plaučių, krūties, gimdos kaklelio ir kepenų karcinomos ląsteles. Analizuoti etanoliniai ekstraktai, nuovirai ir infuzijos. Rezultatai parodė, kad laukinės kraujažolės infuzija ir metanolinis ekstraktas aktyviausiai veikė prieš krūties ir kepenų vėžio ląsteles. Tuo tarpu komercinės kraujažolės nuovirai pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu, kurį lėmė poveikis prieš laisvuosius radikalus ir lipidų peroksidacijos slopinimas [18]. Teigiama, kad didžiausią antioksidantinį aktyvumą sukelia timolis ir karvakrolis. Eksperimentiniai tyrimai rodo, kad nuovirai 2 – 3 kartus aktyvesni nei kiti ekstraktai [1].

- Antihelminntinis poveikis.

Kraujažolė yra gera alternatyva prieš atrajojančių gyvūnų kirmėlines infekcijas. Buvo tirti vandeniniai ir etanoliniai ekstraktai *in vivo* – kiaušinėlių skaičiaus išmatose nustatymui, *in vitro* – judrumo slopinimui. Rezultatai *in vivo* parodė, kad praėjus 15 dienų po gydymo kiaušinėlių skaičius sumažėjo 88,4 %. Tyrimai *in vitro* parodė, jog 88,88 % parazitų numirė praėjus 8 valandoms po suvartojimo [1].

- Antihipertenzinis ir bronchodilatacinis poveikis.

Taip pat literatūroje buvo aptartas bei eksperimentiškai su anestezuotomis žiurkėmis įrodytas iš kraujažolės išskirto artemetino sukeliamas antihipertenzinis poveikis. Nustatyta, kad jis turi

angiotenziną konvertuojančio fermento aktyvumą [10]. Pagaminti preparatai iš kraujažolės žaliavos plečia ne tik kraujagysles, bet ir bronchus [1].

- Antibakterinis ir priešgrybelinis poveikis.

2015 metais Irane atlikto tyrimo metu buvo lyginamas trijų *Asteraceae* šeimos augalų – *Achillea millefolium*, *Anethum graveolens* ir *Carum copticum* antimikrobinis aktyvumas. Rezultatai parodė, kad kraujažolė turėjo stipriausią aktyvumą ir prieš bakterijas (MIC $2,5 \pm 0,02 - 5 \pm 0,72$ $\mu\text{g/ml}$), ir prieš grybus (MIC $1 \pm 0,11 - 2 \pm 0,19$ $\mu\text{g/ml}$). Be to, pasižymėjo stipresniu aktyvumu už testuotą antibiotiką ampiciliną ir priešgrybelinį preparatą flukonazolą. Tai patvirtina veiksmingą, nuo seniausių laikų pagrįstą kraujažolės naudojimą įvairių infekcijų gydyme tradiciniu būdu [20]. 2016 metais Irane atliktame tyrime buvo patvirtintas antimikrobinis poveikis prieš *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ir *Pseudomonas aeruginosa*. Buvo pateikta išvada, kad didžiausias jautrumas pasireiškė prieš *Staphylococcus aureus* [21].

- Priešuždegiminis poveikis.

Literatūroje dažniausiai minimas priešuždegiminis veikimas. Uždegiminiai procesai žmogaus organizme yra susiję su žmogaus neutrofilų elastaze (HNE) ir matricos metaloproteinaze (MMP). Remiantis atliktu tyrimu, *Achillea millefolium* esantys flavonoidai, kai IC₅₀ vertė yra 23 $\mu\text{g/ml}$, slopina šias proteazes ir tai gali būti naudojama pvz.: kovojant su krono liga, opiniu kolitu, psoriaze ar atopiniu dermatitu [22].

- Analgetinis poveikis.

Atlikto tyrimo metu buvo pasirinkta ištirti *A. millefolium* tepalo veiksmingumą žaizdų gydymui. Buvo stebima galimybė išvengti infekcijos, kuri sukeltų karščiavimą ir pūlius, bei pagreitinti gijimo procesą, sumažinti skausmą. Žaliavos ekstrakcijai naudotas 90% etanolis, o išdžiovinus sausas likutis sumaišytas su sterilia vazelino baze (5% tepalas). 32 tyrime dalyvavusios moterys buvo *Achillea* grupėje ir 34 – *placebo* grupėje. Rezultatai parodė, kad žaizdas tepantis tepalu, kuriame buvo kraujažolės, 2 kartus per dieną 10 dienų, paskutinėmis dienomis moterims sumažėjo skausmo intensyvumas ir buvo išvengta infekcijos. Taip pat autoriai teigia, jog geresniam efektui pasiekti galimai reikėtų didesnės dozės [21].

- Antimaliarinis poveikis.

Flavonoidai slopina intraeritrocitinių maliarijos parazitų dauginimąsi. Iš tirtų 11 flavonoidų, 8 veikė prieš 3D7 padermę, o visi 11 – prieš 7G8 padermę. Liuteolinas buvo veiksmingiausias siekiant užkirsti kelią parazitų augimui [10].

- Kitas poveikis.

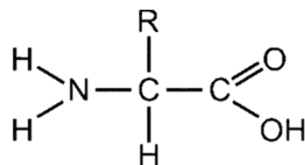
Taip pat *A. millefolium* padeda moterims, turinčioms menstruacinių problemų. Veiksmingas esant stipriam kraujavimui, arba gali stimuliuoti sustingimą gimdoje. Kraujažolė geba stabdyti kraujavimą iš žaizdų, tačiau taip pat gali suaktyvinti kraujotaką uždėjus ant mėlynių, skausmingų vietų, esant varikozėms [23]. Išoriškai naudojamas tepalų, alkoholinių arba vandeninių ekstraktų pavidalu [21]. Vartojant peroraliai, pasižymi skrandį apsaugančiomis ir virškinimą gerinančiomis savybėmis. Stimuliuoja tulžies išsiskyrimą [23]. Kraujažolės diuretinis poveikis svarbus padidinant išskiriamo šlapimo kiekį inkstų akmenligės gydymo metu [21].

Žinomos nepageidaujamos reakcijos, pasireiškusios žmonėms vartojusiems kraujažolės yra astma, kontaktinis dermatitas, rinitas [17, 24].

1. 2 Aminorūgštys

1. 2. 1 Bendroji charakteristika

Aminorūgštys yra laikomos vienais pirmųjų organinių junginių, atsiradusių žemėje su gyvybe [25]. Šie junginiai yra ilgos monomerų grandinės, susijungusios peptidiniais ryšiais ir sudarančios baltymus. Savo sudėtyje turi bent po vieną amino $-NH_2$ ir karboksi $-COOH$ funkcinę grupę, centrinį (chiralinį) anglies C atomą ir šoninę grandinę R (3 paveikslas). Pagal $-NH_2$ padėtį anglies grandinėje aminorūgštys gali būti α -, β -, γ - ir kt. Šoninės grandinės, kurios nulemia unikalias kiekvienos aminorūgšties savybes ir atitinkamai gali būti skirstomos į polines, nepolines, rūgštines ir bazines. O nuo jų pačių išsidėstymo priklauso baltymų savybės [26]. Taip pat priklausomai nuo pH, jos gali būti neigiamo arba teigiamo krūvio [27].

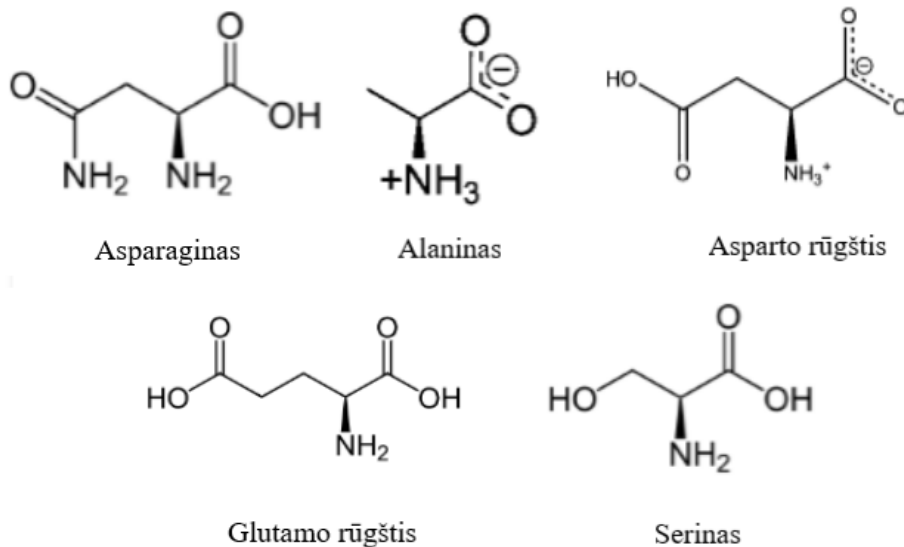


3 pav. Bendroji aminorūgščių struktūrinė formulė [28]

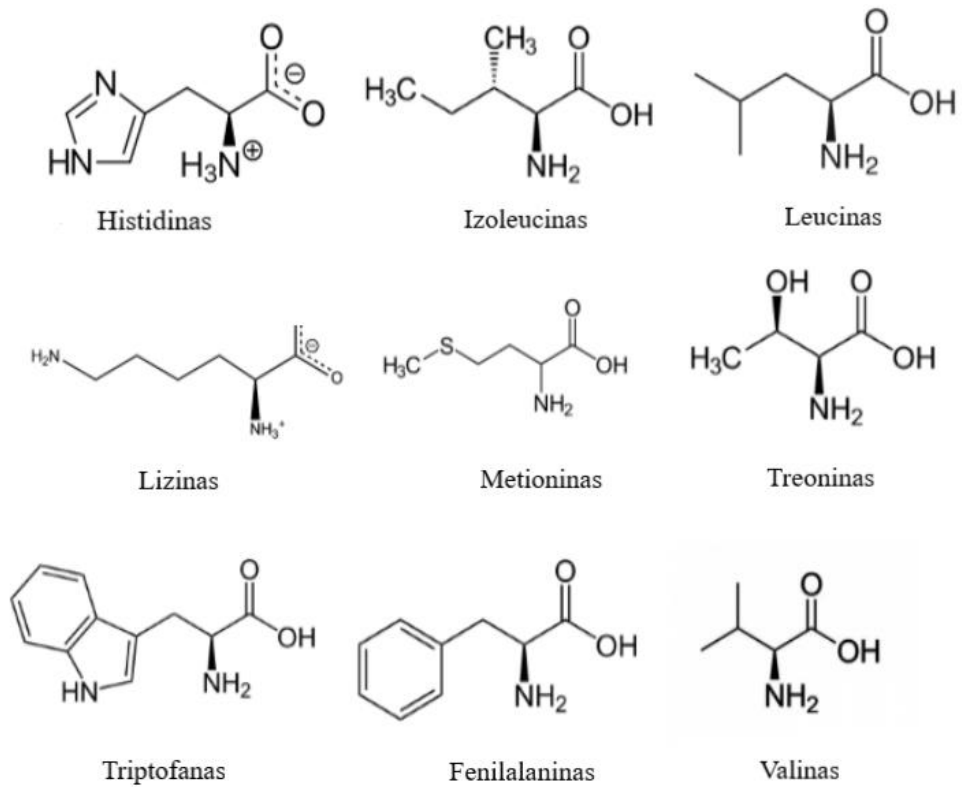
1. 2. 2 Klasifikacija

Gamtoje randama daugiau nei 700 aminorūgščių, tačiau visų biologinių organizmų, pradedant virusais, baigiant žmonėmis, baltymų prekursoriais yra 20 aminorūgščių [7]. Sąrašą papildė neseniai atrastos 21-oji ir 22-oji AR – selenocisteinas ir pirolizinas [26]. Selenocisteino yra žmogaus organizme. Pirolizinas nenaudojamas žmogaus baltymų sintezėje, bet naudojamas bakterijose. Kitos 20 AR vadinamos proteinogeninėmis, nes yra koduojamos genetiniu kodu ir dalyvauja baltymų virsme [25]. Visos jos, išskyrus gliciną, kuris neturi chiralinio centro, yra α -aminorūgštys. Taip pat visos yra L-izomerai su R-absoliučiąja konfigūracija, išskyrus gliciną, kurio S-absoliučioji konfigūracija [26].

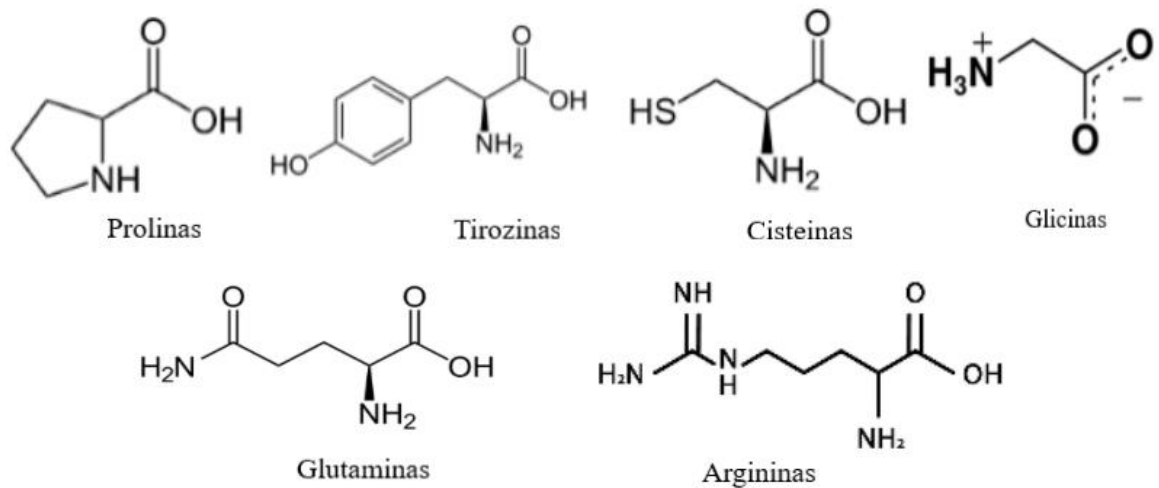
Pagal žmogaus organizmo galimybę sintezuoti aminorūgštis ir gaunamo bei pašalinamo azoto pusiausvyrą organizme šios yra skirstomos į tris grupes. Gali būti pakeičiamos (4 paveikslas) – alaninas, asparaginas, asparto rūgštis, glutamo rūgštis ir serinas. Šias sintetina ir augalai, ir žmogaus organizmas, naudodamas nepakeičiamąsias. Nepakeičiamos (5 paveikslas) – leucinas, izoleucinas, metioninas, fenilalaninas, histidinas, triptofanas, valinas, treoninas ir lizinas. Šias taip pat sintetina augalai, bet žmogaus organizmas to padaryti negali. Jomis organizmas turi būti aprūpinamas su mityba, kitaip azoto pusiausvyrą bus sutrikdyta. Ir sąlyginai pakeičiamos (6 paveikslas) – argininas, cisteinas, glutaminas, glicinas, prolinas ir tirozinas. Jas organizmas sintetinti gali, tačiau nepakankamai, kadangi dėl tam tikrų priežasčių šių AR panaudojimas organizme tampa greitesnis nei sintezė. Toks reiškinys atsiranda dėl įvairių būklių, pvz.: ligos, nėštumo, karščio ar šalčio streso, augimo, įvairaus pobūdžio sužalojimo ar potrauminio laikotarpio [25, 26, 29, 30].



4 pav. Pakeičiamųjų aminorūgščių struktūrinės formulės [31]



5 pav. Nepakeičiamųjų aminorūgščių struktūrinės formulės [31]



6 pav. Sąlyginai pakeičiamųjų aminorūgščių struktūrinės formulės [31]

Augalų ląstelėse mažiau baltymų ir daugiau angliavandenių, palyginus su gyvūnų ar žmonių organizmais. Tačiau baltymai vis vien labai svarbūs struktūriniai ir metaboliniai elementai. Aminorūgštys augaluose yra ne tik proteinogeninės, bet ir neproteinogeninės. Jos dalyvauja reikšmingose antrinių metabolitų susidarymo reakcijose. Jų dėka augalas auga, vystosi, kontroliuoja

tarpląstelinį pH, redokso energiją [32]. Fotosintezės procesui vykti ypatingai svarbios aminorūgštys yra glicinas ir glutamo rūgštis. Šios reguliuoja žiotelių veiklą bei chlorofilo gamybą augale. Aminorūgštys dalyvauja karotenoidų sintezėje, kurie saugo chlorofilą nuo oksidacijos ir taip prisideda prie jo koncentracijos palaikymo augale [33]. Taip pat AR suteikia gynybą biotiniam ir abiotiniam stresui (pvz.: nikotinas, gliukozinolatai, pigmentai, hormonai) [32]. Augalų metabolizmo prisitaikymas prie streso sukkelto energijos trūkumo apima esminius amino rūgščių metabolizmo pokyčius. Sėkmingam augalo augimui ir išgyvenimui reikia stebėti apsirūpinimą maistingomis medžiagomis, bei integruoti su aplinkos stresoriais. Radus pusiausvyrą tarp augimo ir gynybos vyksta sėkmingas dauginimasis ir išlikimas [34].

Lygiai taip pat kaip ir augalų karalystėje, aminorūgštys svarbios žmonių ir gyvūnų išgyvenime. Jos dalyvauja vystymosi, mokymosi bei prisitaikymo procesuose ir atlieka svarbų vaidmenį veikiant jutimo organams. AR yra glaudžiai susijusios viena su kita. Pavyzdžiui, tirozinas sintezuojamas iš fenilalanino, todėl žmonėms sergantiems fenilketonurija, tirozino taip pat truks. Arginino mažiems vaikams reikia gauti su maistu, o suaugusieji geba jį sintezuoti iš ornitino. Svarbiausios yra šakotosios grandinės aminorūgštys – izoleucinas ir leucinas. Pirmasis yra svarbus hemoglobino formavimuisi, antrasis žaizdų gijimui, cukraus ir cholesterolio kiekiui kraujyje [35]. Aminorūgščių veiksmingumas gydant diabetą arba šios ligos prevencijai yra susijęs su gebėjimu stimuliuoti insulino sekreciją kasos β ląstelėse, taip pat padidinti gliukozės panaudojimą kraujyje. Didžiausias insulinotropinis poveikis būdingas argininui, leucinui, izoleucinui, alaninui ir fenilalaninui [33]. Žmogaus organizmui svarbūs odoje ir akyse esantys AR metabolitai serotoninas ir melatoninas. Šių aminorūgščių pirmtakas yra triptofanas. Melaninas ir dopaminas sintezuojami iš fenilalanino ir tirozino. Tinklainėje aptinkamas glutamato metabolitas γ -aminobutiratas, odoje – iš histidino susidarę histaminas ir urakano rūgštis, bei azoto oksidas ir poliaminai iš arginino. Nenormalus AR metabolizmas gali sukelti struktūrinę audinių deformaciją ir jų disfunkciją [30].

Nepakeičiamųjų aminorūgščių trūkumas organizme pasireiškia organinių ir neorganinių maistinių medžiagų įsisavinimo, transportavimo ir sandėliavimo sutrikimais, sumažėjusia neurotransmiterių sinteze ir deguonies pernešimu. Poveikis organizmui gali pasireikšti įvairiu emociniu dirglumu, nemiga, gali pasireikšti apetito sumažėjimas ar net pykinimas. Gali atsirasti endokrininės sistemos disbalansas – sumažėti insulino, augimo hormono, augimo faktoriaus I ir skydliaukės hormonų koncentracijos, sulėtėti vaikų augimas, raida. Taip pat galimas riebalinio audinio kaupimasis organizme, griaučių raumenų nykimas bei fizinis nuovargis ar silpnumas. AR kiekio deficitas taip pat gali daryti įtaką lytinio potraukio, spermatogenezės, laktacijos ir vaisingumo sumažėjimui. Pavyzdžiui, vyrams arginino trūkumas pasireiškia spermatozoidų skaičiaus ir gyvybingumo sumažėjimu, tuo tarpu moterims toks trūkumas gestaciniame laikotarpyje pablogina vaisiaus augimą ir sumažina jo tikimybę išgyventi. Antioksidacinio streso padidėjimas ir greitesnis senėjimas, galvos skausmai, imuninės sistemos

susilpnėjimas, kuris pasireiškia padidėjusiu sergamumu ir mirtingumu infekcinėmis ligomis, širdies ir kraujagyslių sistemos sutrikimai, skysčių susilaikymas organizme taip pat atsiranda esant nepakankamam aminorūgščių aprūpinimui su maistu. Galiausiai seka tokios problemos, kaip kalcio netekimas – dantų ir kaulų anomalijos, taip pat plaukų žilimas ir slinkimas, odos sausumas ir blyškumas [36]. Nepakeičiamųjų aminorūgščių stygius ypatingai reikšmingas vyresnio amžiaus žmonėms, kadangi senstant sumažėja skeleto raumenų masė, padaugėja riebalinio audinio bei organizme sumažėja glutationo, kuris pasižymi antioksidaciniu aktyvumu. Viename moksliniame straipsnyje trijų AR pakankamas suvartojimas – leucino, cisteino ir arginino, buvo siejamas su sveiku senėjimu. Leucinas žinomas dėl skatinamojo poveikio raumenų baltymų sintezei. Argininas svarbus ląstelių signalizavimui, insulino ir augimo hormono atpalaidavimui [8].

1. 2. 3 Taikomi analizės metodai

Remiantis literatūros šaltiniais, aminorūgštys gali būti nustatomos įvairiais metodais. Yra atliekama dujų chromatografija (DC), taikomas amino rūgščių analizavimo metodas (AAA), efektyvioji skysčių chromatografija (ESC), atvirkštinių fazių skysčių chromatografija (AFSC), kapiliarinė elektroforezė (KE) ir kt. Remiantis literatūra, inovatyviausias – superkritinė skysčių chromatografija (SSC). Masių spektrometrija naudojama deriniuose su chromatografiniais metodais [27].

2019 – 2020 m. buvo atliekama fitocheminė trijų *Asteraceae* šeimos augalų, surinktų žydėjimo metu, analizė. Tyrimo metu buvo siekta nustatyti AR koncentracijas, metu buvo analizuojami *Cichorium intybus*, *Chamomilla recutita* ir *Achillea millefolium* augalų žiedai. Buvo norima nustatyti visas 20 proteinogenines aminorūgštis. Pasitelkta rūgštinė hidrolizė, norint paversti AR laisvomis formomis ir gauti AR feniltiohidantoino (PTH) darinius. Buvo vykdoma kapiliarinė elektroforezė naudojant UV detektorius, kai bangos ilgis 254 nm., o analizės temperatūra – 30 °C. Rezultatai parodė, jog daugiausiai AR kaupė *Achillea milefolium* žiedai. Nustatyta 12 baltymus sudarančių aminorūgščių, o rezultatai išreikšti procentaliai – argininas $0,25 \pm 0,10$ %, lizinas $0,2 \pm 0,07$ %, tirozinas $0,13 \pm 0,04$ %, fenilalaninas $0,19 \pm 0,06$ %, histidinas $0,05 \pm 0,02$ %, leucinas ir izoleucinas $0,25 \pm 0,07$ %, metioninas $0,03 \pm 0,01$ %, valinas $0,23 \pm 0,09$ %, prolinas $0,61 \pm 0,16$ %, treoninas $0,19 \pm 0,08$ %, serinas $0,19 \pm 0,05$ %, alaninas $0,20 \pm 0,05$ %, glicinas $0,19 \pm 0,06$ % [37].

1.2.4 Dujų chromatografija

Dujų chromatografijos metodas yra pagrįstas dujų ar garų mišinio sudedamųjų dalių adsorbicija tam tikro adsorbento paviršiuje. Metodas yra šiuolaikinis ir efektyvus, analizės atlikimo laikas trumpas,

o jautrumas – didelis. Galima naudoti masių spektrometrijos detektorių. Didžiausias trūkumas – sudėtinga aptikti nelakius junginius, tačiau papildomas cheminis junginių apdorojimas leidžia išspręsti šią problemą. Aminorūgštys yra labai polinės ir nelakios molekulės, todėl tyrimo atlikimui DC-MS metodu būtina derivatizacija. Taikant derivatizaciją, jos paverčiamos lakiomis, todėl galimas jų išskyrimas eliuojant atitinkamoje temperatūroje be terminio skilimo. Taip pat reikalingas masių spektrometrijos detektorius. Kaip judri fazė dažniausiai naudojamos helio arba vandenilio dujos [38].

2. TYRIMO METODIKA

2.1 Tyrimo organizavimas

Surinkus pakankamai mokslinės literatūros, susijusios su magistro baigiamojo darbo tema įvairiose duomenų bazėse bei remiantis prieš tai atliktais tyrimais katedroje, buvo parinkta tyrimo metodika. Aminorūgščių įvairavimo analizė kraujažolės žaliavoje buvo atliekama dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu, taikant junginių derivatizaciją. Metodo validacija buvo atlikta 2018 metais Mato Gaivenio magistro baigiamajame darbe „Laisvų amino rūgščių nustatymas augalinėje žaliavoje dujų chromatografijos metodu“.

Magistro baigiamojo darbo tyrimas buvo atliktas 2021 – 2022 metais, Lietuvos sveikatos mokslų universitete, Farmacijos fakulteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedroje.

2.2 Tyrimo objektas

Tyrimo objektas – aminorūgštys, išskirtos iš kraujažolių. Buvo tiriami 5 kraujažolių rūšių žiedynai ir lapai, surinkti Turkijoje. Tiriamieji preparatai buvo laikomi sausoje, vėsioje, tamsioje vietoje. (1 lentelė)

1 lentelė. Tiriamosios žaliavos

Eil. Nr.	Rūšis	Žaliava	
		Lapai	Žiedynai
1.	<i>Achillea millefolium</i>	+	+
2.	<i>Achillea setacea</i>	+	+
3.	<i>Achillea wilhelmsii</i>	+	+
4.	<i>Achillea cappadocica</i>	+	+
5.	<i>Achillea arabica</i>	+	+

2.3 Tyrimo reagentai ir aparatūra

Tyrimui naudotos medžiagos:

- Metanolis ($\geq 99,8$ % Sigma-Aldrich, Izraelis);
- Išgrynintas vanduo;

- Acetonitrilas;
- N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)trifluoroacetamidas (MTBSTFA (> 97 %)) (Sigma-Aldrich, Vokietija);
- AR standartų mišinys (Sigma-Aldrich, Vokietija).

Tyrimui naudota aparatūra:

- Silver Crest smulkinimo aparatas žaliavai (Vokietija);
- Shimadzu AUW120D analitinės svarstyklės (Duisburgas, Vokietija);
- Centrifuginiai mėgintuvėliai BluCapp;
- Ultragarso bangų vonelė WiseClean (Pietų Korėja);
- Centrifuga Centurion Scientific C2 Series;
- Automatinės pipetės Eppendorf ResearchPlus (JAV);
- Dujų chromatografinė sistema Shimadzu GC-2010 plus (Shimadzu Corporation, Japonija), su masių spektrometrijos detektoriumi. 30 m. ilgio ir 0,25 mm. vidinio skersmens spausto silikagelio kolonėlė (Rxi[®]-5 ms). Nejudrios fazės sluoksnio storis 0,25 μm. Dujos-nešiklis helis.

2. 4 Dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodikos pritaikymas AR nustatymui

2. 4. 1 Tiriamųjų tirpalų paruošimas

Analitinėmis svarstyklėmis buvo pasveriami po 1 g. kiekvienos rūšies susmulkintos augalinės žaliavos (žiedų ir lapų). *A. arabica* lapų dėl žaliavos trūkumo buvo paimama 0,8 g. Tuomet žaliavos buvo suberiamos į atitinkamai paženklintus centrifugavimo mėgintuvėlius ir užpilamos 70 % metanoliu iki 9 ml. žymės. Mėginiai buvo supurtomi, kad sudrėktų visa žaliava ir dedami į ultragarso vonią 30 minučių. Išėmus buvo paliekami stovėti per naktį.

Sekančią dieną mėginiai buvo centrifuguojami. Naudojant Eppendorf švirkštą iš kiekvieno buvo paimama po 200 μl. skystos fazės ir pilama į rudo stiklo chromatografinius buteliukus. Kiekvienas mėginys buvo garinamas azoto srove iki sauso likučio. Derivatizacijai atlikti į išgarintus buteliukus buvo pilama 100 μl. acetonitrilo ir 100 μl. derivatizatoriaus MTBSTFA. Mėginiai buvo supurtomi ir 2,5 valandoms dedami į 100 °C glicerolio vonelę. Norint užtikrinti tikslesnę analizę, bandymai buvo atliekami tris kartus.

2. 4. 2 Tyrimo sąlygos, atliekant dujų chromatografijos-masių spektrometrijos analizę

- Kolonėlė Rxi[®]-5ms. Jos ilgis 30 m., skersmuo – 0,25 mm. su 0,25 μm. nejudrios fazės sluoksnio storium.
- Helio tekėjimo greitis – 1,5 ml/min., bendras tekėjimo greitis: 34,4 ml/min.
- Tyrimo atlikimo laikas – 41 min.
- Kolonėlėje temperatūrinis režimas programuojamas taip, kad pradinė kolonėlės temperatūra būtų 75 °C. Pastovi temperatūra išlaikoma 5 min., tada didinama 10 °C/min ir keliamą iki 290 °C, laikoma pastovi 5 min, toliau temperatūra keliamą kas 20 °C/min iki 320 °C ir laikoma pastovi 5 min.
- Mėginių injekavimas vykdomas taikant srauto dalinimą santykiu 1:10.
- Injekcijos tūris – 1 μl.
- Injekavimo temperatūra 260 °C.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

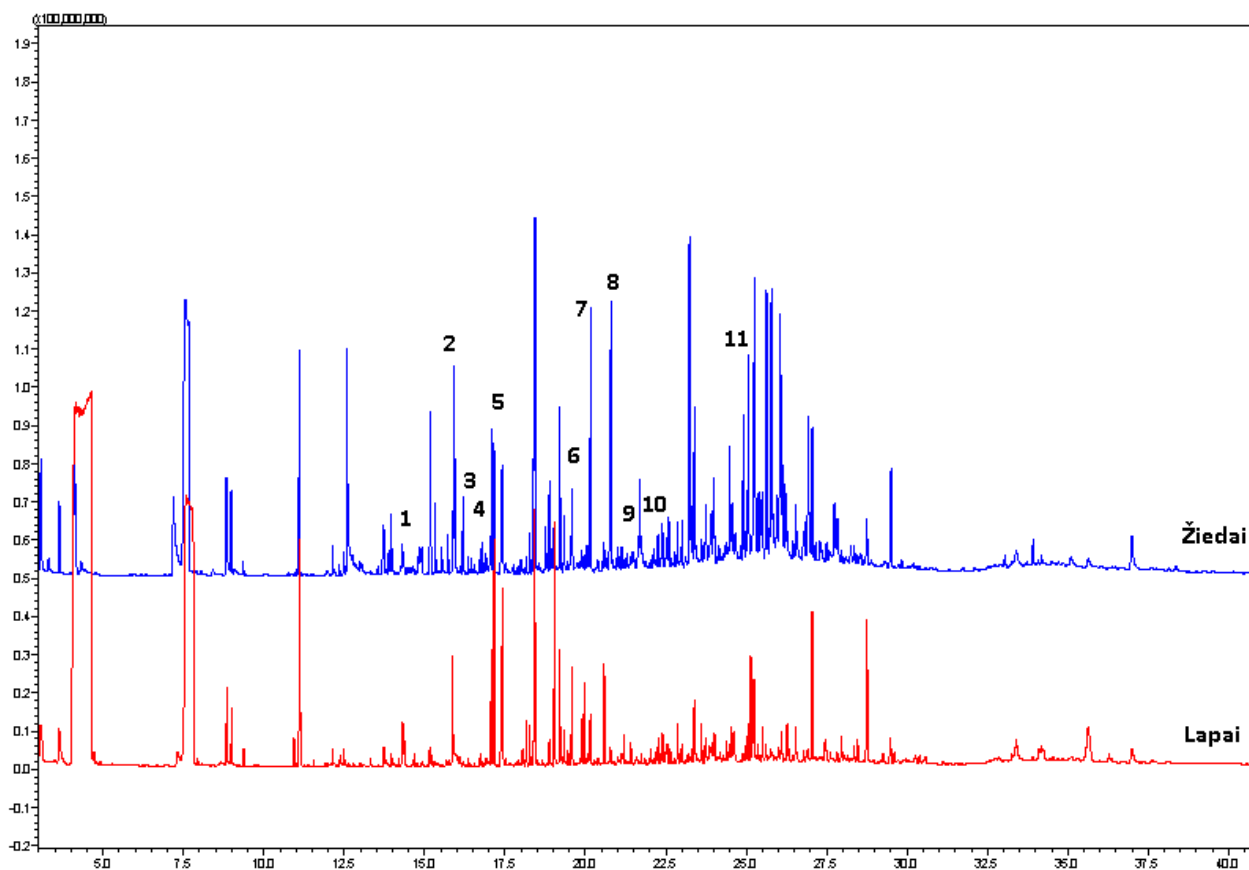
3.1 Aminorūgščių kokybinis nustatymas

Naudojant aminorūgščių standartų mišinį, buvo tikimasi nustatyti 16 aminorūgščių tiriant skirtingų rūšių kraujažolių lapų ir žiedų ėminius. 2 lentelėje pateikti ieškotų AR pavadinimai ir kokiame ėminių skaičiuje jos buvo nustatytos.

2 lentelė. Nustatytos aminorūgštys ir ėminių skaičius, kuriuose buvo aptikta

Aminorūgšties pavadinimas	Ėminių skaičius, kuriuose buvo aptikta
L-Alaninas	9
Glicinas	–
L-Valinas	10
L-Leucinas	10
Izoleucinas	10
L-Prolinas	10
L-Metioninas	–
L-Serinas	10
L-Treoninas	7
L-Fenilalaninas	4
L-Asparto rūgštis	9
L-Glutamo rūgštis	5
L-Lizinas	–
L-Histidinas	–
L-Tirozinas	6
L-Cistinas	–

Visuose tirtuose mėginiuose buvo identifikuotos 5 aminorūgštys – valinas, leucinas, izoleucinas, prolinas ir serinas. Sunkiausia buvo nustatyti fenilalaniną – aptiktas tik 4 mėginiuose, bei glutamo rūgštį, kuri buvo aptikta 5 ėminiuose. Nei vienos rūšies kraujažolės lapų ar žiedų ėminiuose nepavyko identifikuoti glicino, metionino, lizino, histidino ir cistino. Iš 16 aminorūgščių, kurias buvo tikimasi identifikuoti, buvo identifikuotos 11.



7 pav. *Achillea millefolium* rūšies lapų ir žiedų mėginio aminorūgščių chromatograma

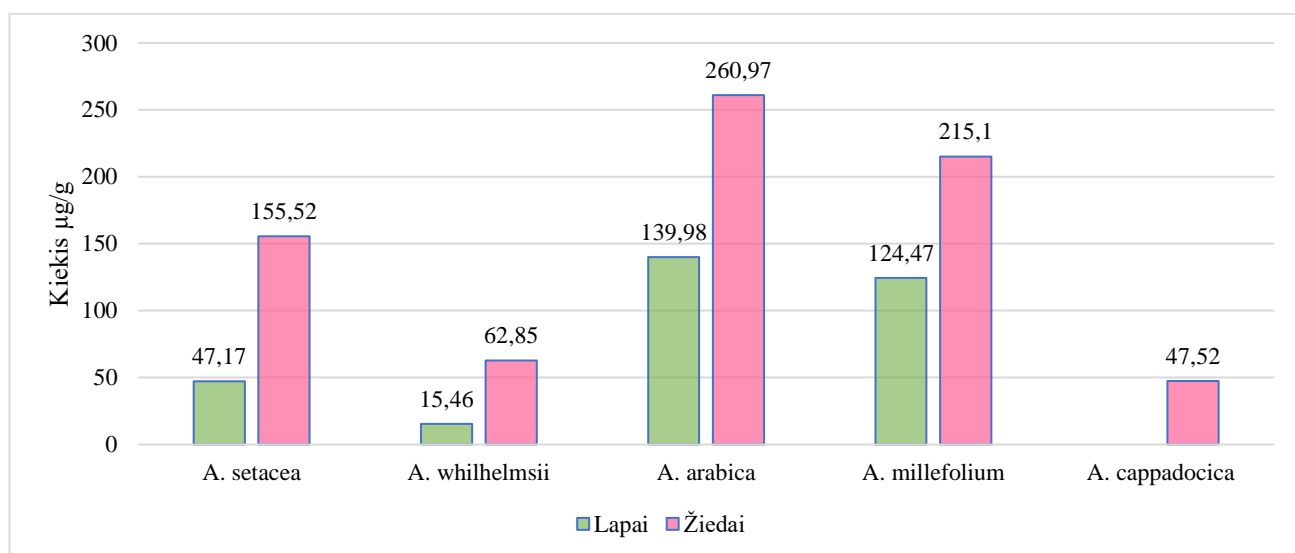
Atlikus DC-MS analizę, kraujažolės žaliavos lapų ir žiedų ėminiuose buvo nustatyta 11 AR. 7 paveiksle yra pavaizduota chromatograma, kurioje: 1 – alaninas, 2 – valinas, 3 – leucinas, 4 – izoleucinas, 5 – prolinas, 6 – serinas, 7 – treoninas, 8 – fenilalaninas, 9 – asparto rūgštis, 10 – glutamo rūgštis, 11 – tirozinas. Šios aminorūgštys identifikuotos pagal sulaikymo laikus remiantis standartinių tirpalų masių spektro duomenų baze. Alanino sulaikymo laikas – 14,620 min., valino – 16,236 min., leucino – 16,579 min., izoleucino – 16,756 min., prolino – 17,277 min., serino – 19,615 min., treonino – 20,029 min., fenilalanino – 20,909 min., asparto rūgšties – 21,455 min., glutamo rūgšties – 22,210 min., tirozino – 25,985 min.

3. 2 Aminorūgščių kiekybinis nustatymas

Dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodika buvo pritaikyta ne tik kokybinei, bet ir kiekybinei aminorūgščių analizei.

3.2.1 Alanino kiekybinis nustatymas skirtingų rūšių kraujažolės žaliavose

Atlikus alanino kiekybinį nustatymą dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu, buvo paskaičiuotas jo kiekis preparatuose ir išreikštas $\mu\text{g/g}$. 8 paveiksle vaizduojamas skirtingų kraujažolės rūšių žaliavose nustatyto alanino kiekis lapuose ir žieduose

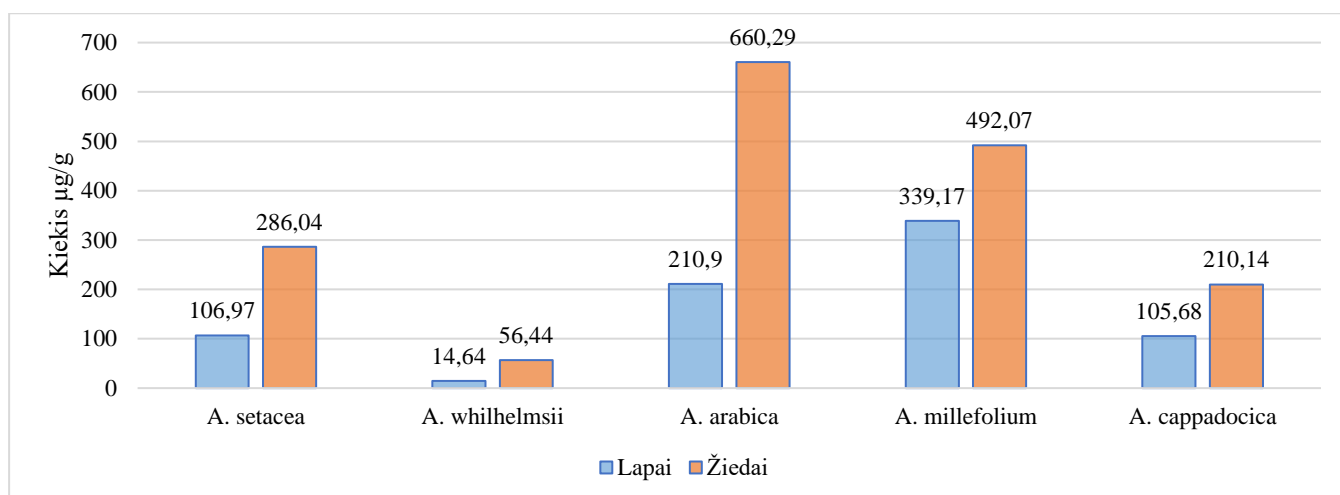


8 pav. Alanino kiekis $\mu\text{g/g}$ kraujažolės žaliavose

Skirtingų rūšių kraujažolių žiedų ėminių ištraukose alanino kiekis varijuoja nuo $47,52 \pm 0,04$ $\mu\text{g/g}$ iki $260,97 \pm 0,1$ $\mu\text{g/g}$. Tuo tarpu lapuose nuo $15,46 \pm 0,15$ $\mu\text{g/g}$ iki $139,98 \pm 0,11$ $\mu\text{g/g}$. Didžiausias alanino kiekis buvo nustatytas *Achillea arabica* lapų ($139,98 \pm 0,11$ $\mu\text{g/g}$) ir žiedų ($260,97 \pm 0,1$ $\mu\text{g/g}$) ėminiuose, o mažiausias – *Achillea whilhelmsii* lapuose ($15,46 \pm 0,15$ $\mu\text{g/g}$) ir *Achillea capadocica* žieduose ($47,52 \pm 0,04$ $\mu\text{g/g}$). *A. cappadocica* lapuose aminorūgštis alanino nebuvo nustatyta.

3.2.2 Valino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje

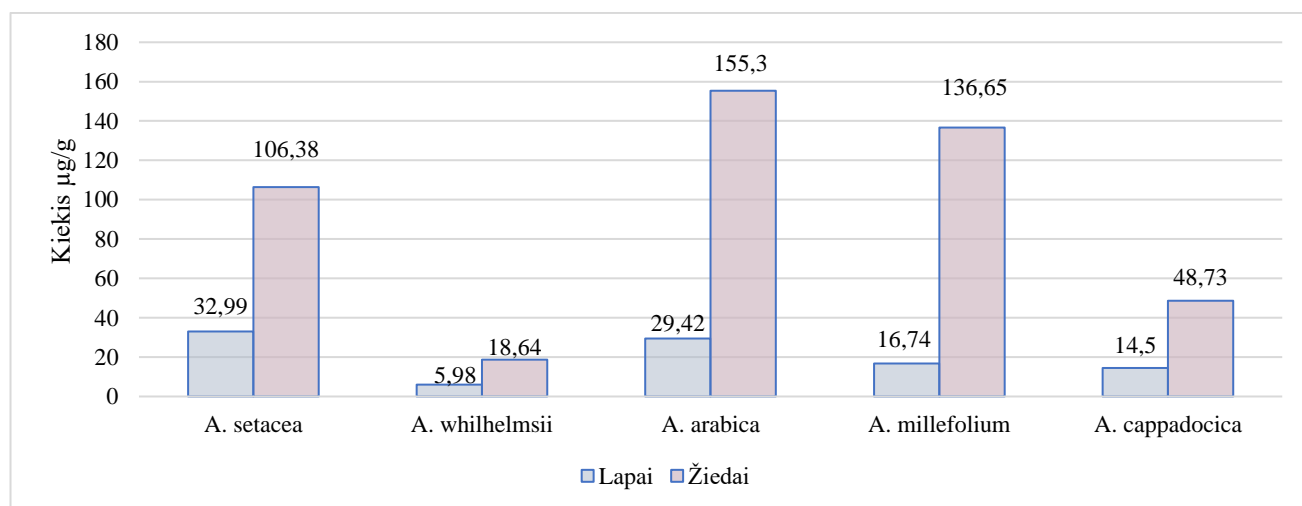
Analogiškai kaip ir alanino atveju, buvo tiriamas valino kiekis augalinės žaliavos mėginiuose. Ši aminorūgštis buvo nustatyta visuose tiriamuosiuose mėginiuose, o rezultatai pateikti 9 paveiksle.



9 pav. Valino kiekis µg/g kraujažolės žaliavose

Didžiausias valino kiekis žieduose buvo nustatytas *Achillea arabica* rūšies žaliavoje ($660,29 \pm 0,14$ µg/g), o lapuose – *Achillea millefolium* rūšies žaliavoje ($339,17 \pm 0,12$ µg/g). *Achillea wilhelmsii* rūšies mėginiuose buvo aptikti mažiausi kiekiai šios aminorūgšties ir tai yra $14,64 \pm 0,05$ µg/g lapuose, bei $56,44 \pm 0,09$ µg/g žieduose. *A. setacea* ir *A. cappadocica* mėginiuose aptikti valino kiekiai yra labai panašūs, atitinkamai $106,97 \pm 0,11$ µg/g lapuose, $286,04 \pm 0,13$ µg/g žieduose ir $105,68 \pm 0,1$ µg/g lapuose, $210,14 \pm 0,12$ µg/g žieduose.

3. 2. 3 Leucino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje

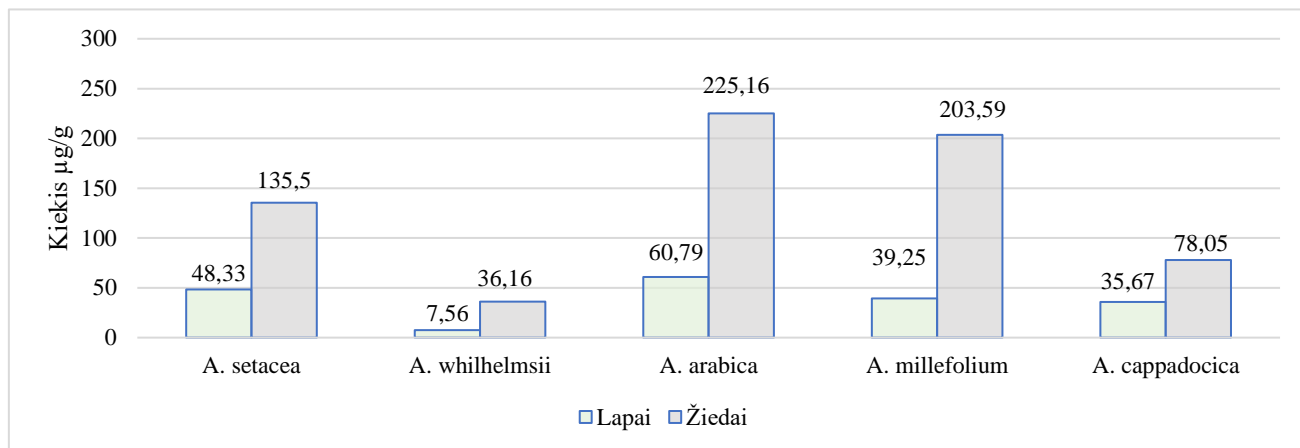


10 pav. Leucino kiekis µg/g kraujažolės žaliavose

Remiantis prieš tai aptartų aminorūgščių alanino, valino rezultatais ir stebint leucino kiekį 10 paveiksle, pastebima, kad yra tendencija aptikti didesnius aminorūgščių kiekius žieduose nei lapuose.

Leucino kiekiai lapuose įvairuoja nuo $5,98 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$ (*A. wilhelmsii*) iki $32,99 \pm 0,14 \mu\text{g/g}$ (*A. setacea*). Didžiausi kiekiai buvo nustatyti *A. arabica* ($155,3 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$) ir *A. millefolium* ($136,65 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$) žiedų mėginiuose.

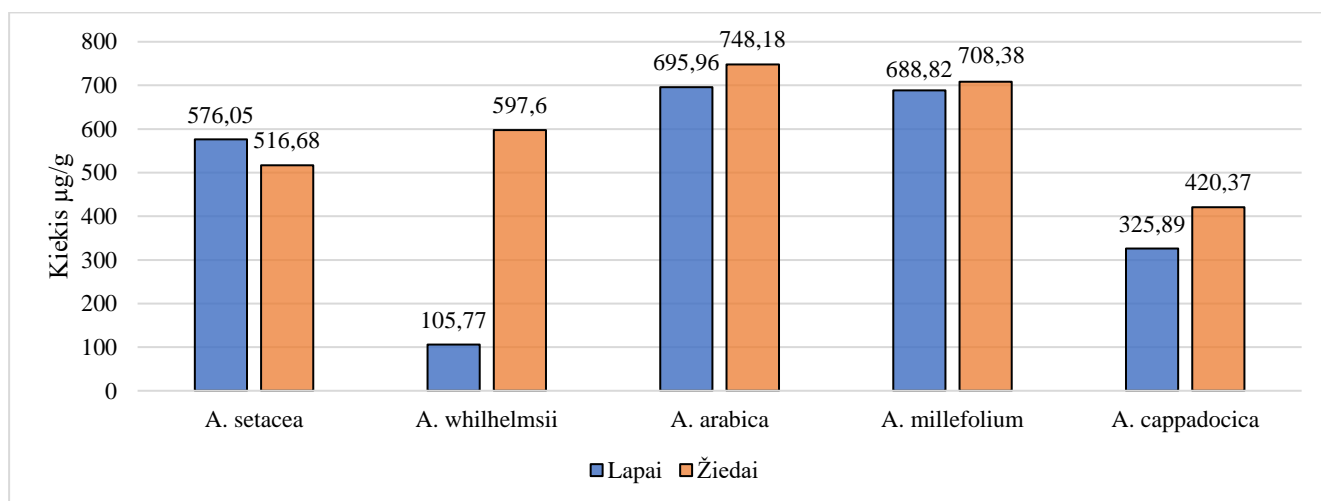
3.2.4 Izoleucino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje



11 pav. Izoleucino kiekis $\mu\text{g/g}$ kraujažolės žaliavose

11 paveiksle vaizduojamas izoleucino kiekis $\mu\text{g/g}$ skirtingų rūšių kraujažolės žaliavose. Didžiausi šios AR kiekiai buvo nustatyti *Achillea arabica* mėginiuose. Lapuose buvo aptikta $60,79 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$, o žieduose $225,16 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$. *A. wilhelmsii* lapuose aptikta vos $7,56 \pm 0,14 \mu\text{g/g}$ tirtos aminorūgšties.

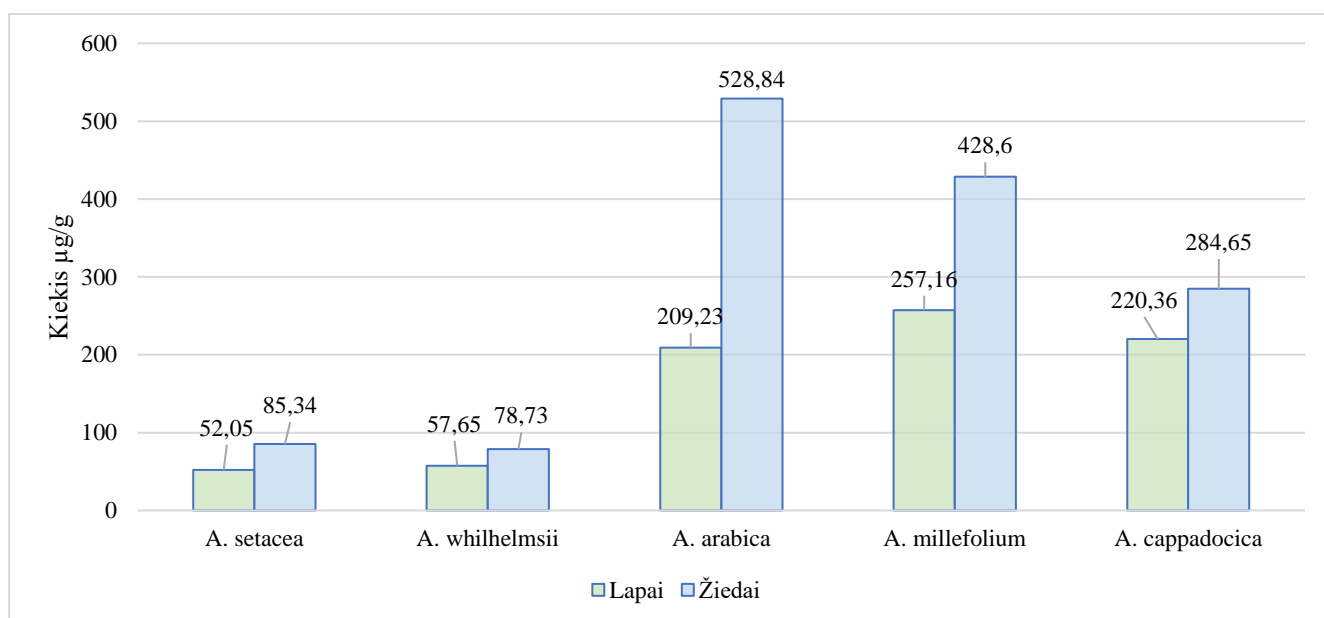
3.2.5 Prolino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje



12 pav. Prolino kiekis $\mu\text{g/g}$ kraujažolės žaliavose

Prolino kiekybinio nustatymo rezultatai yra matomi 12 paveiksle. Visuose tirtuose mėginiuose buvo aptiktos pakankamai didelės koncentracijos. Didžiausias kiekis aminorūgštis prolino buvo nustatytas *A. arabica* rūšies žaliavose – $695,96 \pm 0,2$ $\mu\text{g/g}$ lapuose ir $748,18 \pm 0,16$ $\mu\text{g/g}$ žieduose. Nedaug skyrėsi *A. millefolium* rūšies kraujažolėje nustatyti kiekiai – $688,82 \pm 0,15$ $\mu\text{g/g}$ lapuose ir $708,38 \pm 0,25$ $\mu\text{g/g}$ žieduose. Mažiausi kiekiai buvo nustatyti *A. wilhelmsii* lapuose ir *A. cappadocica* žieduose, atitinkamai $105,77 \pm 0,14$ $\mu\text{g/g}$ ir $420,37 \pm 0,16$ $\mu\text{g/g}$.

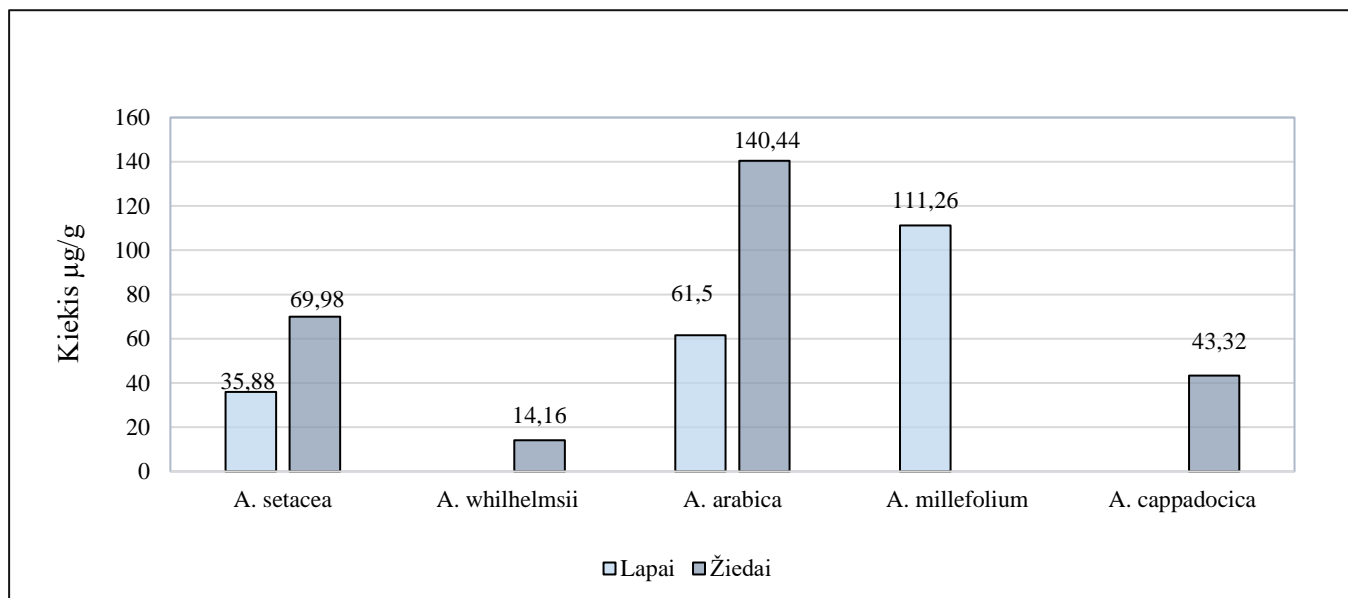
3. 2. 6 Serino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje



13 pav. Serino kiekis $\mu\text{g/g}$ kraujažolės žaliavoje

Serino kiekis taip pat buvo nustatomas. Remiantis gautais duomenimis, pavaizduotais 13 paveiksle, didžiausias kiekis buvo aptiktas *A. arabica* žiedų ėminiuose – $528,84$ $\mu\text{g/g} \pm 0,23$. Mažiausios koncentracijos – *A. setacea* ir *A. wilhelmsii* rūšių žaliavų ėminiuose. Lapuose atitinkamai $52,05 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$ ir $57,65 \pm 0,4$ $\mu\text{g/g}$, o žieduose $85,34 \pm 0,16$ $\mu\text{g/g}$ ir $78,73 \pm 0,25$ $\mu\text{g/g}$.

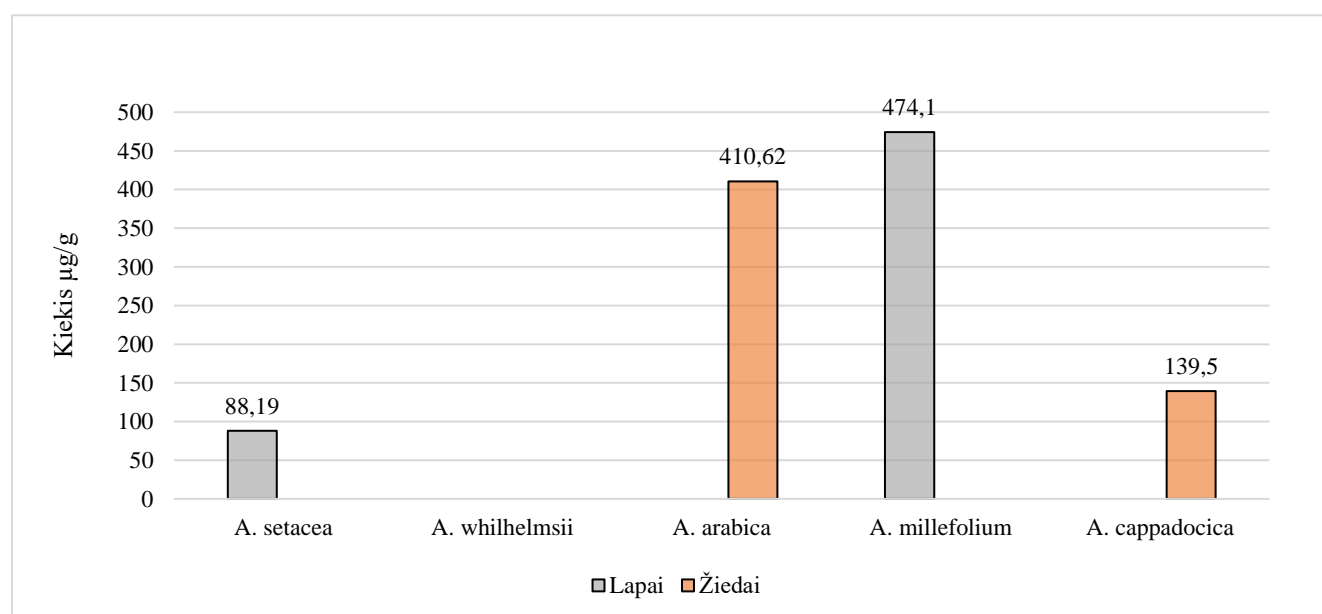
3. 2. 7 Treonino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje



14 pav. Treonino kiekis µg/g kraujažolės žaliavoje

Treonino kiekybinio nustatymo rezultatai 14 paveiksle rodo, kad trijuose mėginiuose *A. wilhelmsii* ir *A. cappadocica* lapuose, bei *A. millefolium* žieduose šios aminorūgštis nepavyko nustatyti. Didžiausi kiekiai buvo aptikti *A. arabica* žiedų ($140,44 \pm 0,36$ µg/g) ir *A. millefolium* ($111,26 \pm 0,33$ µg/g) lapų ėminiuose.

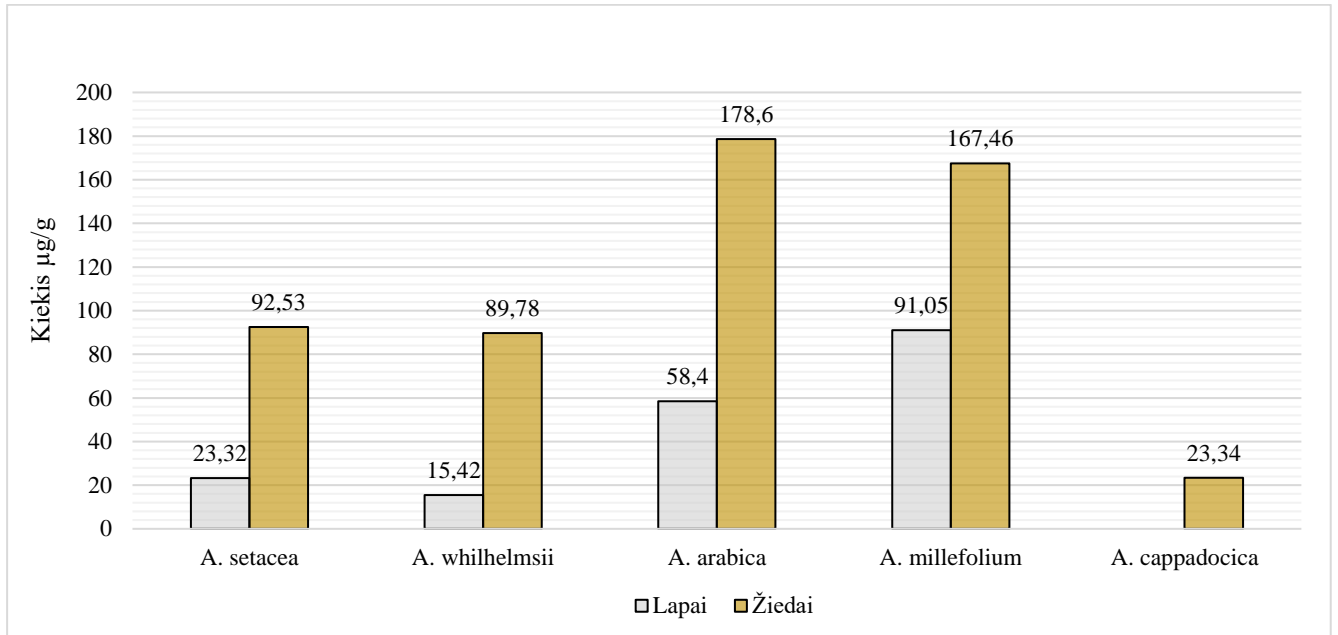
3.2.8 Fenilalanino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje



15 pav. Fenilalanino kiekis µg/g kraujažolės žaliavoje

Remiantis 15 paveiksle pavaizduotais rezultatais, šios aminorūgšties buvo nustatyta tik keturiuose. *A. setacea* lapuose $88,19 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$, *A. arabica* žieduose $410,62 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$, *A. millefolium* lapuose $474,1 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ ir *A. cappadocica* $139,5 \pm 0,29 \mu\text{g/g}$. *A. wilhelmsii* tirtos AR nebuvo nustatyta.

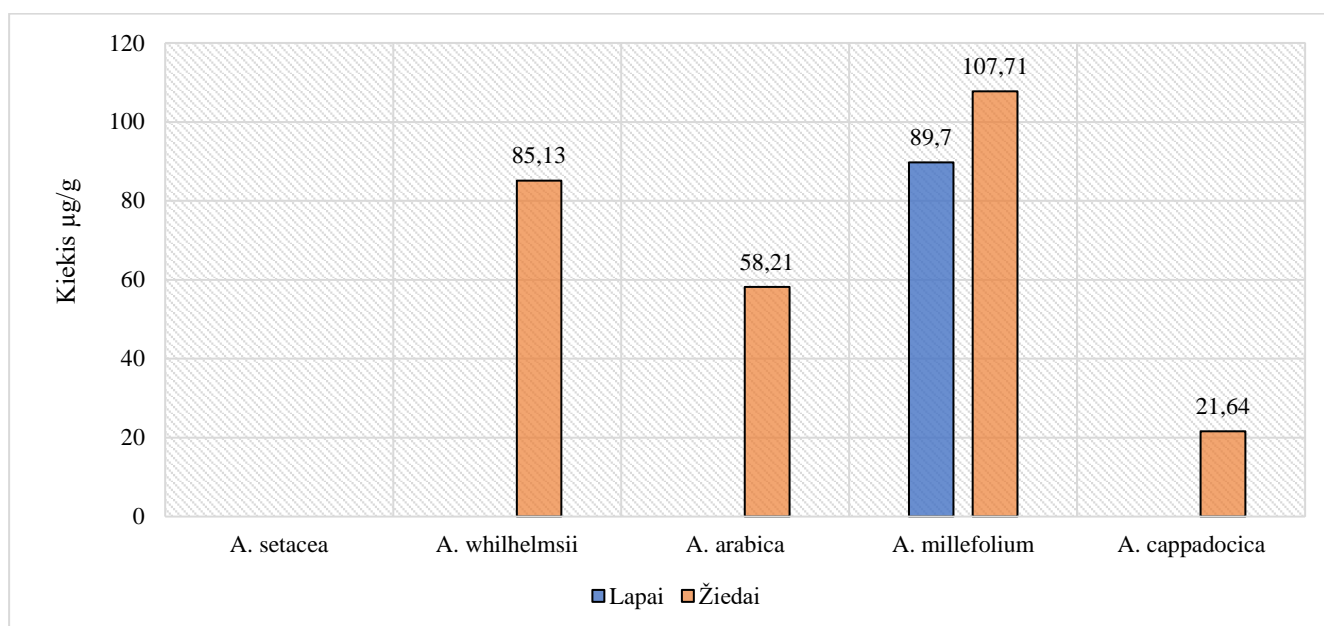
3.2.9 Asparto rūgštis kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje



16 pav. Asparto rūgštis kiekis $\mu\text{g/g}$ kraujažolės žaliavose

16 paveiksle esančioje diagramoje pateikti asparto rūgštis kiekybinio nustatymo rezultatai. Labiausiai išsiskiria *A. arabica* ir *A. millefolium* žaliavų ėminių rezultatai, rodantys didžiausias koncentracijas ($178,6 \pm 0,31 \mu\text{g/g}$ ir $167,46 \pm 0,22 \mu\text{g/g}$ žieduose, bei $58,4 \pm 0,6 \mu\text{g/g}$ ir $91,05 \pm 0,34 \mu\text{g/g}$ lapuose). Mažiausias asparto rūgštis kiekis buvo nustatytas *A. wilhelmsii* lapuose ($15,42 \pm 0,28 \mu\text{g/g}$).

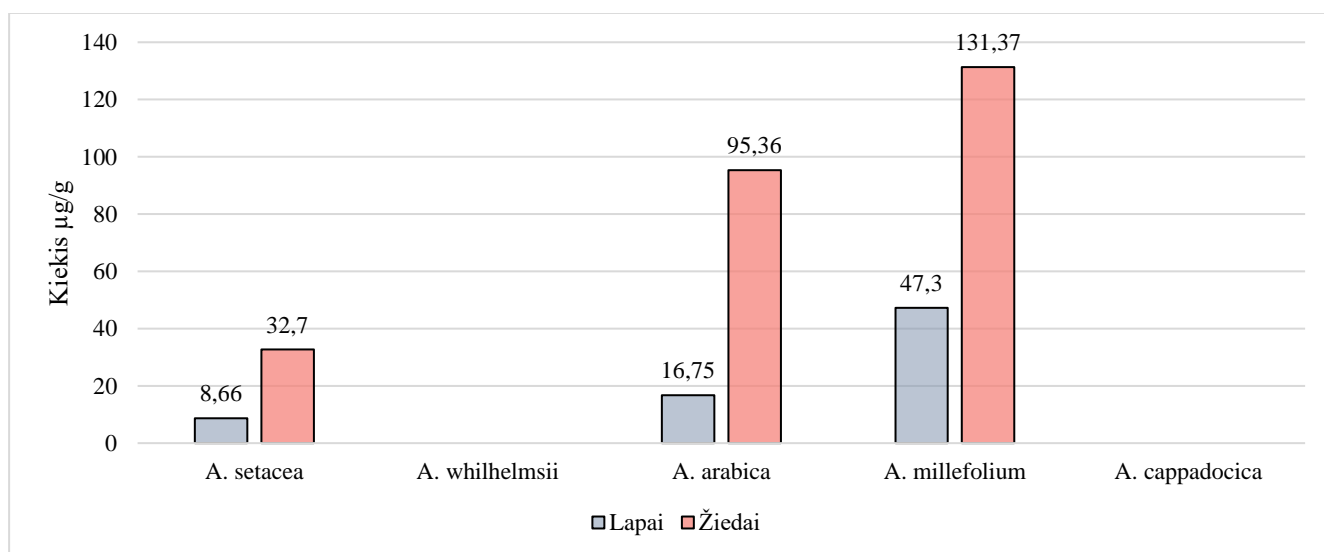
3. 2. 10 Glutamo rūgšties kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje



17 pav. Glutamo rūgšties kiekis µg/g kraujažolės žaliavoje

17 paveiksle matoma, kad glutamo rūgšties kiekis buvo nustatytas tik *A. millefolium* rūšies žaliavų ėminiuose – $107,71 \pm 0,19$ µg/g žieduose ir $89,7 \pm 0,22$ µg/g lapuose. *A. wilhelmsii*, *A. Arabica*, *A. cappadocica* rūšyse buvo nustatyta tik žieduose, atitinkamai $85,13 \pm 0,39$ µg/g, $58,21 \pm 0,09$ µg/g ir $21,64 \pm 0,4$ µg/g. *A. setacea* šios AR nustatyti nepavyko.

3. 2. 11 Tirozino kiekybinis nustatymas kraujažolės žaliavoje



18 pav. Tirozino kiekis µg/g kraujažolės žaliavoje

Tirozino kiekybinio nustatymo rezultatai pateikti 18 paveiksle. Daugiausiai tiriamosios AR buvo aptikta *A. millefolium* žieduose ($131,37 \pm 0,54$ $\mu\text{g/g}$), o mažiausiai *A. setacea* lapuose (vos $8,66 \pm 0,36$ $\mu\text{g/g}$). *A. wilhelmsii* ir *A. cappadocica* rūšių žaliavų ėminiuose tirozino nebuvo nustatyta.

Atlikus tyrimo duomenų sisteminimą, buvo vertinamas bendras AR kiekis skirtingų rūšių žaliavose (3 lentelė).

3 lentelė. Bendras aminorūgščių kiekis skirtingų rūšių kraujažolių žaliavoje

Rūšis	Kiekis lapuose $\mu\text{g/g}$	Kiekis žieduose $\mu\text{g/g}$	Bendras kiekis $\mu\text{g/g}$
<i>Achillea millefolium</i>	2279,01	2590,93	4869,94
<i>Achillea setacea</i>	1019,61	1395,32	2414,93
<i>Achillea wilhelmsii</i>	59,91	1039,49	1099,41
<i>Achillea cappadocica</i>	702,10	1317,25	1317,25
<i>Achillea arabica</i>	1482,94	3461,99	4944,92

Kraujažolių lapų ėminiuose daugiausiai aminorūgščių buvo nustatyta *Achillea millefolium* rūšies žaliavoje ($2279,01$ $\mu\text{g/g}$), tuo tarpu žiedų ėminiuose plačiausia AR sudėtimi pasižymėjo *Achillea arabica* ($3461,99$ $\mu\text{g/g}$). Skirtumas tarp didžiausių AR kiekių lapuose ir žieduose yra $1182,98$ $\mu\text{g/g}$. Vertinant susistemintus duomenis pastebima, kad visų tirtų kraujažolių rūšių nustatyti aminorūgščių kiekiai žieduose yra didesni nei lapuose. Mažiausiai aminorūgščių lyginant lapų ir žiedų ėminiuose aptiktus kiekius buvo nustatyta *Achillea wilhelmsii* lapuose – $59,91$ $\mu\text{g/g}$. Didžiausias bendras aminorūgščių kiekis nustatytas *A. arabica* rūšies žaliavoje – $4944,92$ $\mu\text{g/g}$, o skirtumas tarp *A. arabica* ir *A. millefolium* rūšių kiekių yra vos $74,98$ $\mu\text{g/g}$. Mažiausias aptiktas bendras aminorūgščių kiekis yra $1099,41$ $\mu\text{g/g}$ *A. wilhelmsii* rūšies žaliavoje. Jis yra 4,5 karto mažesnis už didžiausią nustatytą bendrą kiekį. Bendrų nustatytų AR kiekių skirtingose rūšyse lapuose ir žieduose vidurkis $2929,29$ $\mu\text{g/g}$. Remiantis atliktu tyrimu ir literatūroje pateiktų mokslinių darbų analize, pastebima, kad aminorūgščių kiekiai žieduose yra didesni.

Taip pat buvo sugrupuoti ir pateikti kiekvienos atskirai pakeičiamųjų, nepakeičiamųjų ir sąlyginai pakeičiamųjų aminorūgščių kiekiai (4 lentelė).

4 lentelė. Pakeičiamųjų, nepakeičiamųjų ir sąlyginai pakeičiamųjų aminorūgščių kiekis ($\mu\text{g/g}$) skirtingų rūšių kraujažolių žaliavoje

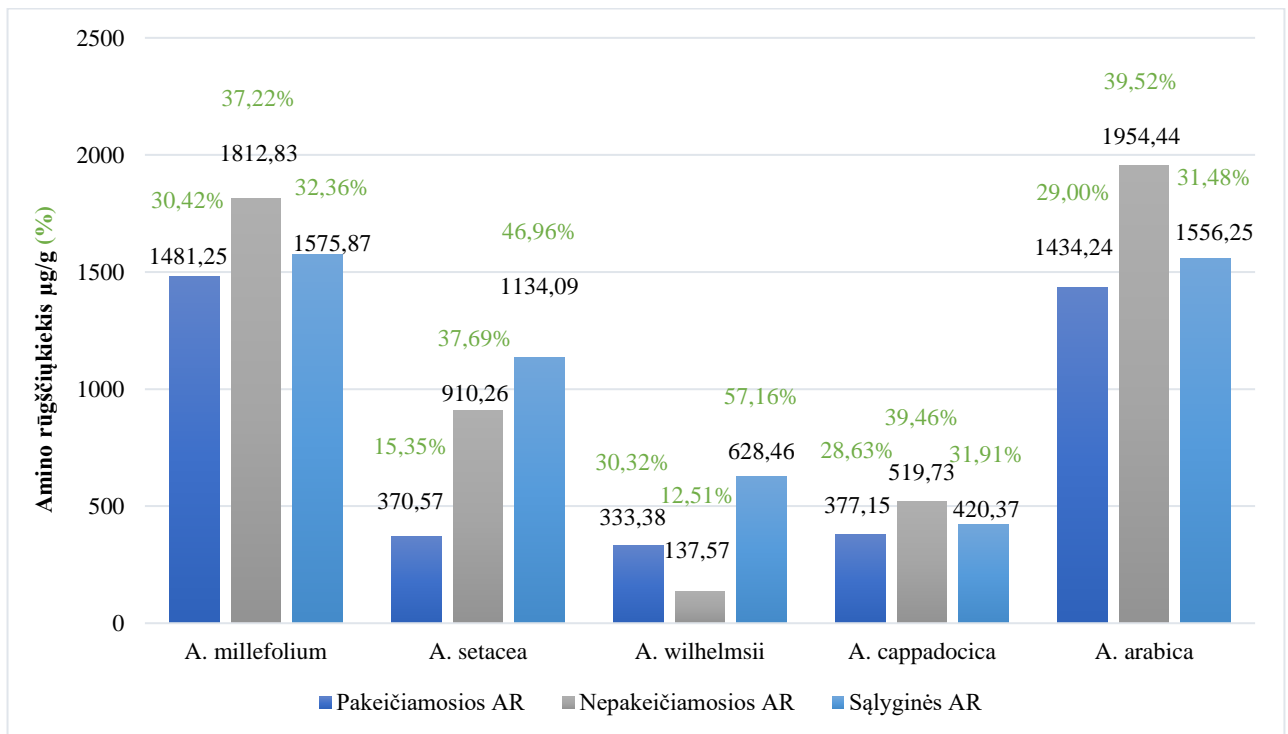
Aminorūgštys	<i>Achillea millefolium</i>	<i>Achillea setacea</i>	<i>Achillea wilhelmsii</i>	<i>Achillea cappadocica</i>	<i>Achillea arabica</i>
<i>Pakeičiamosios</i>					
Alaninas	339,58	202,68	64,31	47,52	400,95
Serinas	685,76	52,05	78,73	284,65	738,08
Asparto rūgštis	258,5	115,84	105,21	23,34	237,01
Glutamo rūgštis	197,41	-	85,13	21,64	58,21
<i>Nepakeičiamosios</i>					
Valinas	831,25	393,02	62,08	210,14	871,19
Leucinas	153,39	139,37	21,62	48,73	184,73
Izoleucinas	242,84	183,82	39,72	78,05	285,96
Treoninas	111,26	105,86	14,16	43,32	61,5
Fenilalaninas	474,1	88,19	-	139,5	410,62
<i>Sąlyginai pakeičiamosios</i>					
Tirozinas	178,67	41,36	-	-	112,11
Prolinas	1397,2	1092,73	628,46	420,37	1444,14

A. cappadocica lapuose buvo nustatyta mažiausia įvairovė aminorūgščių – iš 11 tirtų nustatyta tik 5 (valinas, leucinas, izoleucinas, prolinas ir serinas). *A. wilhelmsii* rūšies augalinėje žaliavoje nebuvo nustatyta 2 aminorūgščių – fenilalanino ir tirozino. Dviejose rūšyse nebuvo aptikta po vieną aminorūgštį – *A. setacea* nei lapuose, nei žieduose nebuvo glutamo rūgšties, o *A. cappadocica* rūšyje nebuvo tirozino. Sąlyginai pakeičiamoji aminorūgštis prolinas išsiskyrė didžiausiais nustatytais kiekiais visų tirtų rūšių kraujažolėse.

Kiekybinių aminorūgščių tyrimų kraujažolės žaliavoje literatūroje mažai. Palyginti turimus rezultatus būtų galima su anksčiau darbe aptarto Kazachstane atlikto tyrimo rezultatais. Analizė buvo vykdoma kapiliarine elektroforeze taikant hidrolizę ir naudojant UV spektrą. *Achillea millefolium* rūšies kraujažolėje daugiausiai buvo nustatyta prolino – 0,61 % [37]. Mano atlikto tyrimo metu prolino kiekis taip pat buvo didžiausias ne tik *A. millefolium* atveju, bet ir visose kitose tirtose rūšyse.

Taip pat gautus rezultatus galima būtų palyginti su Ukrainoje atlikto aminorūgščių nustatymo tyrimu GC-MS metodu su junginių derivatizacija. Buvo tiriama ne kraujažolė, o augalinės mikstūros, kurių veikimas pagrįstas antidiabetiniu aktyvumu (jų sudėtyje vyravo *Cichorium intybus* šaknys, *Elymus repens* šakniastiebiai, *Helichrysum arenarium* žiedai, *Urtica dioica* lapai, *Taraxacum officinale* šaknys, *Vaccinium myrtillus* lapai ir kt.). Ekstrakcijos tirpikliu buvo pasirinktas vandeninis HCl tirpalas, o mėginiai buvo veikiami ultragarsu. Analizuojant tyrimo rezultatus, didžiausiu kiekiu kaip ir mano atveju pasižymėjo aminorūgštis prolinas. Jos nustatytas kiekis buvo 24,679 µg/g. Kita išsiskyrusi savo kiekiu aminorūgštis buvo izoleucinas, kurios koncentracija buvo 9,746 µg/g [33].

Aminorūgštis prolinas ne tik kraujažolėje, bet ir kituose augaluose aptinkami kiekiai yra didžiausi. Įvairūs autoriai aiškina, kad koncentracijos augaluose yra didesnės, nes prolinas kaupimasis yra dažnas fiziologinis atsakas į druskingumą ir osmosinį stresą daugelyje augalų rūšių. Ši aminorūgštis prisideda prie membranų ir baltymų stabilizavimo, laisvųjų radikalų pašalinimo ir ląstelių redokso reakcijų esant stresinėms sąlygoms. Ji taip pat gali palengvinti citoplazminę acidozę ir palaikyti atitinkamą NADP⁺/NADPH santykį, susijusį su metabolizmu [39, 40, 41, 42].



19 pav. Bendras pakeičiamųjų, nepakeičiamųjų ir sąlyginai pakeičiamųjų aminorūgščių kiekis skirtingų rūšių kraujažolių žaliavoje

Bendro pakeičiamųjų, nepakeičiamųjų ir sąlyginai pakeičiamųjų aminorūgščių kiekių diagrama 19 paveiksle rodo, kad pakeičiamųjų koncentracijos įvairuoja nuo 333,38 µg/g iki 1481,25 µg/g, nepakeičiamųjų nuo 137,57 µg/g iki 1954,44 µg/g. Tuo tarpu sąlyginai pakeičiamųjų nuo 420,37 µg/g

iki 1575,87 $\mu\text{g/g}$. Kad būtų galima dar objektyviau palyginti reikšmes atsižvelgiant į kiekvienos rūšies bendras AR koncentracijas, buvo paskaičiuotas procentinis kiekis. Procentine reikšme, didžiausias kiekis pakeičiamųjų AR buvo nustatytas *A. millefolium* rūšies ėminiuose (30,42 % visų nustatytų aminorūgščių). Nepakeičiamųjų didžiausias procentas nustatytas *A. arabica* rūšies ėminiuose – 39,52 % visų nustatytų AR. Sąlyginai pakeičiamųjų AR daugiausia buvo nustatyta *A. wilhelmsii* rūšies ėminiuose – 57,16 % visų AR. Pakeičiamųjų aminorūgščių, tokių kaip alaninas, serinas, asparto ir glutamo rūgštys, mažiausią procentą kaupė *A. setacea* rūšies kraujažolė (15,35 %). *A. wilhelmsii* rūšis kaupia mažiausią procentą nepakeičiamųjų AR – valino, leucino, izoleucino, treonino ir fenilalanino (12,51 %). Sąlyginai pakeičiamųjų aminorūgščių tirozino ir prolino mažiausias procentinis kiekis buvo nustatytas *Achillea arabica* rūšies žaliavose (31,48 %).

4. IŠVADOS

1. Atlikus mokslinės literatūros analizę ir remiantis prieš tai atliktų tyrimų duomenimis, efektyviausia aminorūgščių ekstrakcija iš kraujažolių lapų ir žiedų buvo pasiekta tirpikliu pasirenkant metanolį ir mėginį veikiant ultragarsu.
2. Naudojant 16 aminorūgščių standartų mišinį, dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu buvo identifikuota 11 AR. Vertinant atskiras aminorūgštis, rezultatai sutapo su kitų mokslininkų atliktais tyrimais – prolinas pasižymėjo didžiausiomis koncentracijomis visose tirtose rūšyse.
3. Leucinas, izoleucinas, serinas, prolinas ir valinas buvo aptikti visuose tirtuose mėginiuose. Kiekybinio įvertinimo metu buvo nustatyta, kad didžiausiu bendru AR kiekiu pasižymėjo *Achillea arabica* rūšies žaliava – lapuose ir žieduose esančių aminorūgščių suma buvo 4944,92 µg/g. Mažiausias nustatytas bendras kiekis buvo 1099,41 µg/g *A. wilhelmsii* rūšies žaliavoje.
4. Lyginant AR kiekius lapuose ir žieduose, didesnės koncentracijos buvo aptiktos žieduose. Skirtingų rūšių kraujažolių aminorūgščių kiekiai įvairavo, o tam įtakos galėjo turėti dirvožemio cheminė sudėtis, klimato sąlygos, vegetacijos tarpsnis ir kiti veiksniai.

5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Aminorūgščių įvairavimo tyrimams dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu pasirinkti Lietuvoje augančias rūšis.
2. Dėl aktualumo žmogaus organizmui, labiau skirti dėmesį žaliavai, kaupiančiai didesnes koncentracijas nepakeičiamųjų aminorūgščių.

6. LITERATŪROS SARAŠAS

1. Ali SI, Gopalakrishnan B, Venkatesalu V. Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Achillea millefolium* L. *Phytother Res* 2017;31(8):1140-1161.
2. Ijaz F, Nawaz H, Hanif MA, Ferreira PMP. Yarrow. *Medicinal Plants of South Asia* 2020;685–697.
3. Farhadi N, Babaei K, Farsaraei S, Moghaddam M, Ghasemi Pirbalouti A. Changes in essential oil compositions, total phenol, flavonoids and antioxidant capacity of *Achillea millefolium* at different growth stages. *Industrial Crops and Products* 2020;152:112570.
4. Yurt Kilcar A, Cekic B, Biber Muftuler FZ, Unak P, Medine EI. In vitro evaluation of radiolabeled (125I) methanol extracts of yarrow in cell lines of MCF-7, PC-3, A-549 and Caco-2. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2012;295(1):593–599.
5. Villanueva-Bermejo D, Zahran F, Troconis D, Villalva M, Reglero G, Fornari T. Selective precipitation of phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. extracts by supercritical anti-solvent technique. *The Journal of Supercritical Fluids* 2017;120:52–58.
6. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009;20;37(1):1–17.
7. Wu G. Amino acids in nutrition, health, and disease. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 2021;26(12):1386–1392.
8. Riddle E. S., Stipanuk M. H., Thalacker-Mercer A. E. Amino acids in healthy aging skeletal muscle. *Cornell University* 2016;8(11):1563–1579.
9. Barda C, Grafakou M-E, Tomou E-M, Skaltsa H. Phytochemistry and Evidence-Based Traditional Uses of the Genus *Achillea* L.: An Update (2011–2021). *Scientia Pharmaceutica* 2021;89(4):50.
10. Akram M. Minireview on *Achillea millefolium* Linn. *The Journal of Membrane Biology* 2013;246(9):661–663.
11. Saeidnia S, Gohari AR, Mokhber-Dezfuli N, Kiuchi F. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. *Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*; 2011 [žiūrėta 2022-01-07]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3232110/>.
12. *Achillea Millefolium*. Florida Native Plant Society (FNPS). [Žiūrėta 2021-12-03]. Prieiga per internetą: <https://www.fnps.org/plant/achillea-millefolium>.
13. Apel L, Lorenz P, Urban S, Sauer S, Spring O, Stintzing FC, et al. Phytochemical characterization of different yarrow species (*Achillea* sp.) and investigations into their antimicrobial activity. *Z Naturforsch C J Biosci* 2020;76(1-2):55-65.

14. Gėlynuose iš naujo atrandamos kraujažolės. VDU Botanikos sodas. [žiūrėta 2022-03-25]. Internetinė prieiga per: <https://botanika.vdu.lt/aktualijos/gelynuose-is-naujo-atrandamos-kraujazoles>.
15. Kraujažolė čiudulinė (lot. *Achillea ptarmica*) The Pearl. Augalų ūkis Tinginio sodas. [žiūrėta 2022-03-25]. Internetinė prieiga per: <https://tinginiosodas.lt/kraujazole-ciauduline-lot-achillea-ptarmica-the-pearl>.
16. Benedek B, Kopp B, Melzig M. 3 rd National Congress on Medicinal Plants 14. J Ethnopharmacol 2014;29:312–317.
17. Düsman E, Almeida IV de, Coelho AC, Balbi TJ, Düsman Tonin LT, Vicentini VEP. Antimutagenic Effect of Medicinal Plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata* In Vivo. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013;2013:1–6.
18. Dias MI, Barros L, Dueñas M, Pereira E, Carvalho AM, Alves RC, et al. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. Food Chemistry 2013;141(4):4152–4160.
19. Khanday S, Kalam MohdA, Ahmad A, Yousuf A, Salim S, Dar Y. EVALUATION OF IN-VITRO ACTIVITY OF AERIAL PART OF BARANJASIF (*Achillea millefolium* Linn.) EXTRACTS. Indian Journal of Unani Medicine 2021;14(1):46-55.
20. Kazemi M. Chemical composition and antimicrobial, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of *Achillea millefolium* L., *Anethum graveolens* L., and *Carum copticum* L. essential oils. Journal of Herbal Medicine 2015;5(4):217–222.
21. Hajhashemi M, Ghanbari Z, Movahedi M, Rafieian M, Keivani A, Haghollahi F. The effect of *Achillea millefolium* and *Hypericum perforatum* ointments on episiotomy wound healing in primiparous women. Matern Fetal Neonatal Med 2017;31(1):63-69.
22. Benedek B, Kopp B, Melzig MF. *Achillea millefolium* L. s.l. – Is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? Journal of Ethnopharmacology 2007;113(2):312–317.
23. James L. Yarrow *Achillea millefolium* [online] 2017.
24. Applequist WL, Moerman DE. Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research1. Economic Botany 2011; 65(2):209–225.
25. Bojarska J. Amino Acids: Molecules of Life. International Journal of Nutritional Sciences. 2019.
26. Lopez MJ, Mohiuddin SS. Biochemistry, Essential Amino Acids. PubMed. Treasure Island (FL): StatPearls; 2020. [Žiūrėta 2021-12-04]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/?report=classic>.
27. Ferré S, González-Ruiz V, Guillarme D, Rudaz S. Analytical strategies for the determination of amino acids: Past, present and future trends. Journal of Chromatography B 2019;1132:121819.

28. Generalized Structure Of An Amino Acid. ClipartMax.com. [Žiūrėta 2022-01-30]. Prieiga per internetą: https://www.clipartmax.com/middle/m2H7i8i8N4K9K9m2_amino-clipart-generalized-structure-of-an-amino-acid/.
29. Kumar V, Sharma A, Kaur R, Thukral AK, Bhardwaj R, Ahmad P. Differential distribution of amino acids in plants. *Amino Acids* 2017;49(5):821–869.
30. Wu, G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids* 45, 407–411, 2013.
31. Geesha. Difference Between Essential and Nonessential Amino Acids. Pediaa.com. [Žiūrėta 2022-01-30]. Prieiga per internetą: <https://pediaa.com/difference-between-essential-and-nonessential-amino-acids/>.
32. Hildebrandt Tatjana M, Nunes Nesi A, Araújo Wagner L, Braun H-P. Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant* 2015;8(11):1563–1579.
33. Savych A, Marchyshyn S, Harnyk M, Kudria V, Ocheretniuk A. Determination of amino acids content in two samples of the plant mixtures by GC-MS. *Pharmacia* 2021;68(1):283–289.
34. Heinemann B, Hildebrandt TM. The role of amino acid metabolism in signaling and metabolic adaptation to stress-induced energy deficiency in plants. Dietz K-J, editor. *Journal of Experimental Botany* 2021;16;72(13):4634–4645.
35. Nollet, M.L., Toldra, F. *Handbook of Analysis of Active compounds in Functional Food* 2012.
36. Hou, Y., Wu, G. *Nutritionally Essential Amino Acids* 2018.
37. Ashirova ZB, Kuzhantaeva ZZ, Abdrassulova ZT, Shaimerdenova GZ, Atanbaeva GK. Studying Phytochemical Features of Three Asteraceae Herbs Growing Wild in Kazakhstan. *Floresta e Ambiente*. 2021. 28(4).
38. Moldoveanu SC, Zhu J, Qian N. Free amino acids analysis by liquid chromatography with tandem mass spectrometry in several botanicals with antioxidant character. *J Sep Sci* 2015;38(13):2208–2222.
39. Slobodianiuk L, Budniak L, Marchyshyn S, Kostyshyn L, Ezhned M. Determination of amino acids content of the *Tagetes lucida* Cav. by GC/MS. *Pharmacia* 2021;68(4):859–867.
40. Shafie F, Bayat H, Aminifard MH, Daghighi S. Biostimulant Effects of Seaweed Extract and Amino Acids On Growth, Antioxidants, and Nutrient Content of Yarrow (*Achillea millefolium* L.) In the Field and Greenhouse Conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 2021;52(9):964–975.
41. Dar MI, Naikoo MI, Rehman F, Naushin F, Khan FA. Proline Accumulation in Plants: Roles in Stress Tolerance and Plant Development. *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies* 2016;155–166.
42. Ábrahám E, Hourton-Cabassa C, Erdei L, Szabados L. Methods for Determination of Proline in Plants. *Methods in Molecular Biology* 2010;317–331.

43. Borghi M, Fernie AR. Floral Metabolism of Sugars and Amino Acids: Implications for Pollinators' Preferences and Seed and Fruit Set. *Plant Physiology* 2017;175(4):1510–1524.

7. PRIEDAI

1 priedas

DARBO RĖMIMO, AUTORIAUS INDĖLIO IR GALIMO INTERESŲ KONFLIKTO DEKLARACIJA

Baigiamojo darbo autorė Ina Baradinskaitė

„Aminorūgščių įvairavimo tyrimai kraujažolių (*Achillea L.*) augalinėje žaliavoje taikant dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodą“.

„Investigations of amino acids diversification in yarrow (*Achillea L.*) plant raw material using gas chromatography-mass spectrometry method“.

Darbas remiamas Farmacijos fakulteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedros lėšomis.

Patvirtinu, kad baigiamasis darbas atliktas ir parašytas savarankiškai, nepažeidžiant kitiems asmenims priklausančių autorinių teisių.

Magistrantė Ina Baradinskaitė

**LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS****BIOETIKOS CENTRAS**

Kodas 302536989, Tilžės g. 18, LT- 47181, Kaunas, tel.: (8 37) 327233, www.lsmuni.lt, el.p.: bioetika@lsmuni.lt

Medicinos akademijos (MA) 2021. 10. 27 Nr. BEC-FF-17
Vientisųjų studijų programa – Farmacija
V k. studentei Inai Baradinskaitei
Darbo vadovas prof. Andrejus Ževžikovas
LSMU Analizinės ir toksikologinės chemijos
katedra

DĖL PRITARIMO TYRIMUI

LSMU Bioetikos centras, įvertinęs Inos Baradinskaitės pateiktus dokumentus, studentės tiriamajam darbui tema „Aminorūgščių įvairavimo tyrimai kraujažolių (*Achillea L.*) augalinėje žaliavoje taikant dujų chromatografijos masių spektrometrijos metodą“ pritaria*.

dr. Eimantas Peičius

* Pastaba: šis pritarimas neatleidžia tiriamąjį mokslinį darbą vykdančių asmenų nuo prievolės laikytis Bendrojo duomenų apsaugos reglamento nuostatų ir nuo atsakomybės gauti nacionalinio arba regioninio bioetikos komiteto leidimą, jei toks leidimas būtinas pagal LR Biomedicininų tyrimų etikos įstatyme numatytus reikalavimus.