LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

MEDICINOS AKADEMIJA

FARMACIJOS FAKULTETAS

FARMAKOGNOZIJOS KATEDRA

RŪTELĖ ŽEMAITYTĖ

PELKINIŲ VINGIORYKŠČIŲ (*FILIPENDULA ULMARIA* L.) AUGALINĖS ŽALIAVOS CHEMINĖS SUDĖTIES, ANTIRADIKALINIO IR ANTIMIKROBINIO POVEIKIŲ ĮVERTINIMAS

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas

Dr. Deividas Burdulis

KAUNAS, 2014

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

MEDICINOS AKADEMIJA

FARMACIJOS FAKULTETAS

FARMAKOGNOZIJOS KATEDRA

TVIRTINU:
Farmacijos fakulteto dekanas
Vardas, pavardė, parašas
Data (metai, mėnuo, diena)

RŪTELĖ ŽEMAITYTĖ

PELKINIŲ VINGIORYKŠČIŲ (*FILIPENDULA ULMARIA* L.) AUGALINĖS ŽALIAVOS CHEMINĖS SUDĖTIES, ANTIRADIKALINIO IR ANTIMIKROBINIO POVEIKIŲ ĮVERTINIMAS

Magistro baigiamasis darbas

Konsultantas
Vardas, pavardė, parašas
Data (metai, mėnuo, diena)

Recenzentas
Vardas, pavardė, parašas

Data (metai, mėnuo, diena)

Darbo vadovas
Vardas, pavardė, parašas
Data (metai, mėnuo, diena)

Darbą atliko
Magistrantas (-ė)
Vardas, pavardė, parašas
Data (metai, mėnuo,diena)

KAUNAS, 2014

TURINYS

SANTRAUKA 6
SUMMARY 7
1. SANTRUMPOS 9
ĮVADAS 10
TIKSLAS 11
UŽDAVINIAI 11
2. LITERATŪROS APŽVALGA 12
2.1 Pelkinių vingiorykščių apibūdinimas ir cheminė sudėtis 12
2.1.1 Augalo apibūdinimas 12
2.1.2 Augalo paplitimas ir dauginimasis 12
2.1.3 Augalo kultyvavimas 13
2.1.4 Vaistinė augalinė žaliava, jos ruošimas ir laikymas 13
2.1.5 Pelkinių vingiorykščių žolės cheminė sudėtis 14
2.2 Pelkinių vingiorykščių augalinės žaliavos medicininis pritaikymas 15
2.2.1 Vaistinio augalo istorinės farmacinės formos ir indikacijos 15
2.2.2 Medicininis pritaikymas 16
2.2.2.1 Paprastasis peršalimas ir kvėpavimo takų ligos 16
2.2.2.2 Skausmas ir uždegimas 16
2.2.2.3 Skrandžio opos, rėmuo ir virškinimo sutrikimai 18
2.2.2.4 Priešvėžinis poveikis 18
2.2.2.5 Antikoaguliacinis poveikis 19
2.2.2.6 Kitas medicininis pritaikymas 19
2.2.3 Augalinio vaisto formos ir dozavimas 20
2.2.4 Toksiškumas ir galima sąveika su vaistais 20
2.3 Svarbiausių biologiškai aktyvių junginių apžvalga 21

2.3.1 Flavonoidai 21
2.3.1.1 Flavonoidų klasifikacija 21
2.3.1.2 Flavonoidų poveikis žmogaus organizmui 23
2.3.2 Taninai (raugai) 24
2.3.2.1 Taninų klasifikacija 25
2.3.2.2 Taninų poveikis žmogaus organizmui 26
2.3.3 Askorbo rūgštis 26
2.3.3.1 Askorbo rūgšties poveikis žmogaus organizmui 27
2.4 Biologinis vingiorykščių vaistinių augalinių žaliavų poveikis 27
2.4.1 Laisvieji radikalai, antioksidantai ir antioksidantinis aktyvumas 27
2.4.2 Antimikrobinis aktyvumas 29
2.4.2.1 Tyrime naudotų mikroorganizmų šeimos 29
2.4.2.2 Žinomas pelkinių vingiorykščių antimikrobinis aktyvumas 30
3. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI 30
3.1 Tyrimo objektas 30
3.2 Tyrimo metodai 32
3.2.1 Naudoti reagentai, medžiagos ir mikroorganizmai 32
3.2.2 Naudota aparatūra ir priemonės 33
3.2.3 Nuodžiūvio nustatymas vaistinėje augalinėje žaliavoje 33
3.2.4 Ekstraktų ruošimo metodika 34
3.2.5 Suminio flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu .34
3.2.6 Askorbo rūgšties kiekio nustatymas titrimetriniu metodu 35
3.2.7 Suminio raugų kiekio nustatymas titrimetriniu metodu 36
3.2.8 Antimikrobinio poveikio nustatymas 37
3.2.9 Laisvųjų radikalų surišimo nustatymas ABTS metodu 38

3.2.10 Statistiniai analizės metodai, naudoti duomenų apdorojimui 39
4. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 39
4.1 Vaistinės augalinės žaliavos nuodžiūvis 39
4.2 Ekstrakcijos metodo optimizavimas 41
4.3 Flavonoidų kiekybinės sudėties kitimo dinamika 46
4.4 Askorbo rūgšties kiekybinės sudėties įvairavimas.....48
4.5 Raugų kiekybinės sudėties įvairavimas 50
4.6 Antimikrobinis pelkinių vingiorykščių ekstraktų aktyvumas 51
4.7 Laisvųjų radikalų surišimo įvertinimas 56
IŠVADOS.....60
LITERATŪRA.....61

SANTRAUKA

R. Žemaitytės magistro baigiamasis darbas. Pelkinių vingiorykščių (*Filipendula ulmaria* L.) augalinės žaliavos cheminės sudėties, antiradikalinio ir antimikrobinio poveikių įvertinimas/mokslinis vadovas dr. D. Burdulis; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Farmacijos fakulteto, Farmakognozijos katedra. – Kaunas. Tikslas: įvertinti pelkinių vingiorykščių (*Filipendula ulmaria* L.) cheminę sudėtį ir antimikrobinį poveikį. Uždaviniai: nustatyti tinkamiausią ekstrakcijos metodą ir optimalias ekstrakcijos sąlygas; įvertinti flavonoidų, askorbo rūgšties ir raugų kiekybinės sudėties kitimo dinamiką augalo vegetacijos metu; įvertinti vaistinės augalinės žaliavos antimikrobinį poveikį prieš devynias mikroorganizmų kultūras; nustatyti vaistinės augalinės žaliavos antiradikalinio aktyvumo priklausomybę nuo augalo vegetacijos tarpsnio ir nustatyti, ar yra priklausomybė tarp flavonoidų, raugų ir askorbo rūgšties kiekio vaistinėje augalinėje žaliavoje ir antiradikalinio jos poveikio. Ekstrakcijai pasirinkta maceracija ultragarsinėje vonelėje, kaip ekstrahentą naudojant 70 proc. V/V etanolį. Suminiam flavonoidų kiekiui nustatyti taikytas spektrofotometrinis suminio flavonoidų kiekio įvertinimo metodas. Suminiam raugų kiekiui ir askorbo rūgšties kiekiui nustatyti taikyti farmakopėjiniai titrimetrijos metodai. Antimikrobinis poveikis įvertintas liejant skirtingas tirštųjų ekstraktų koncentracijas į agarą ir stebint mikrooroganizmų augimą, o antiradikalinis aktyvumas nustatytas taikant ABTS radikalo surišimo metodą. Didžiausias suminis flavonoidų kiekis aptiktas augalo masinio žydėjimo metu. Pirmojoje fenologinio vystymosi pusėje askorbo rūgšties kiekis buvo didesnis už vidutinį per visą vaistinio augalo vegetacijos laikotarpį (>0,025 proc.). Suminio raugų kiekio maksimumas pasiektas prieš pelkinių vingiorykščių masinio žydėjimo tarpsnį (16,80 proc.). Etanoliu ekstrahuoti pelkinių vingiorykščių tirštieji ekstraktai pasižymėjo šiek tiek didesniu antimikrobiniu poveikiu nei vandeniu ekstrahuoti tirštieji ekstraktai, ypač prieš *E. faecalis* ir *B. subtilis*. Surištų laisvųjų radikalų kiekis nuo vegetacijos pradžios iki masinio žydėjimo tarpsnio nuolat didėjo ir masinio žydėjimu metu pasiekė maksimumą (95,33 ± 0,16 proc.). Nustatyta vidutinė koreliacija tarp suminio flavonoidų kiekio ir antiradikalinio aktyvumo.

SUMMARY

R. Žemaitytė master's thesis. Chemical composition, antiradical and antimicrobial effect assessment of Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* L.) herbal raw material/ supervised by Dr. D. Burdulis; Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy. - Kaunas. Objective: To assess chemical composition and biological effects of meadosweet (*Filipendula ulmaria* L.) Objectives: To determine the most suitable extraction method and the optimum extraction conditions; evaluation of quantitative composition dynamics of flavonoids, tannins and ascorbic acid during the growing season; antimicrobial effects evaluation of herbal ingredients against nine microbial cultures; evaluate dependence antiradical activity on the growing stage of the plant and to determine whether there is a relationship between quantity of flavonoids, tannins and ascorbic acid in the herbal raw material and its antiradical effect. The maceration by ultrasonic bath using 70 %. V / V ethanol was selected for extraction . For total flavonoids determination the spectrophotometric method was applied for total flavonoid content. For total tannin content and content of ascorbic the pharmacopoeial titration methods were applied. The antimicrobial effects were evaluated by infusing different concentrations of extractives to agar and observing microorganisms growth. The antiradical activity determined using the ABTS radical scavaning method. The highest total flavonoid content was found in massive flowering period. In the first half of the phenological development ascorbic acid content was higher than the average of the entire period of growing (> 0.025 %.). The peak of total tannin content was reached before massive flowering stage of meadowsweet (16.80 %). The ethanol extractives of meadowsweet were characterized by a slightly higher antimicrobial activity than the aqueous extractives, especially against *E. faecalis* and *B. subtilis*. The amount of quenched free radicals from the beginning of the growing to the massive flowering stage increased steadily and reached its peak at massive flowering of meadowsweet (95.33 ± 0.16 %.). The average correlation was found between total flavonoid content and the antiradical activity.

PADĖKA

Nuoširdžiausiai dėkoju už visokeriopą pagalbą ir padrąsinimus moksliniam darbo vadovui dr. D. Burduliui. Už patarimus atliekant antimikrobinio poveikio tyrimą dėkinga esu prof. A. Paviloniui. Už atsakymus į įvairiausius klausimus „AČIŪ“ tariu farmakognozijos katedros doktorantams K. Gaivelytei ir M. Liaudanskui. Už įvertinimą ypatingai dėkinga esu habil. dr. E. Šimkūnaitės labdaros ir paramos fondo valdybos pirmininkei B. Karnickienei ir kitiems garbingiems jo nariams.

1. SANTRUMPOS

AA – adjuvantinis artritas

ABTS - 2,2’-azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sulfono rūgšties diamino druska

ABTS•+ - ABTS katijoninis radikalas

BAM – biologiškai aktyvi (-ios) medžiaga (-os)

BP – Britų farmakopėja (angl. *British Pharmacopoeia*)

CD – cukrinis diabetas

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo hidratas

ESC – efektyvioji skysčių chromatografija

EP –Europos farmakopėja (angl. *European Pharmacopoeia*)

EMFB - Europos mokslinė fitoterapijos bendrija

ENG – eritrocitų nusėdimo greitis

EMA – Europos vaistų agentūra (angl. *European Medicines Agency*)

HD – histidino dekarboksilazė

IL – interleukinas

KE – kapiliarinė elektroforezė

KK – koreliacijos koeficientas

LR – laisvieji radikalai

MIC – minimali slopinanti koncentracija (angl. *minimum inhibitory concentration*)

NVNU – nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo

FP – Prancūzų farmakopėja (angl. *French Pharmacopoeia*)

ROS – reaktyviosios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*)

RNS – reaktyviosios azoto formos (angl. *reactive nitrogen species*)

TEAC - troloksui ekvivalentiška antioksidantinė galia (angl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*)

TNF – α - citokinų klasės alfa tumoro nekrozės faktorius

VSN – vidutinis standartinis nuokrypis

ĮVADAS

Fitoterapija (gr. *phyton* – augalas, gr. *therapeia* – gydymas) – tai medicinos šaka, kuri remiasi augalų panaudojimu gydymui. Fitoterapija istoriškai atsirado iš žolininkystės ir sparčiai plečiasi bei populiarėja ne tik praktiniu, bet ir moksliniu požiūriu. Paskutiniu metu mokslinių publikacijų apie stebinančius augalų tyrimų rezultatus ir sėkmingą gydymą vaistiniais augalais ir jų pagrindu pagamintais vaistiniais preparatais tik daugėja. Tai įrodo neišvengiamą fitoterapijos, kaip vieno iš gydymo būdų, svarbos augimą.

Fitoterapijai, kaip ir kiekvienai kitai mokslo sričiai, reikia plėstis ir tobulėti. Tam būtina ne tik gilinti žinias ir didinti mokslinių įrodymų skaičių apie jau labai plačiai ištirtas vaistines augalines žaliavas, bet ir ieškoti naujų biologiškai aktyvių medžiagų šaltinių. Būtent tokiems didelius kiekius naudingų medžiagų kaupiantiems vaistiniams augalams galima priskirti ir pelkines vingiorykštes.

Pelkinė vingiorykštė yra nuo seno žinomas daugiametis žolinis augalas, kuris plačiai paplitęs Lietuvos miškuose ir drėgnose pievose. Pelkinė vingiorykštė svarbi aspirino atsiradimui, nes XIX amžiuje iš šio vaistinio augalo buvo izoliuoti salicilatai. Viena garsiausių farmacinių kompanijų iš jų susintetino acetilsalicilo rūgštį, kurią, pelkinių vingiorykščių garbei, pavadino aspirinu (istorinis *Filipendula ulmaria* sinonimas – *Spirea ulmaria*).

Pelkinių vingiorykščių vaistinė augalinė žaliava vartojama nuo seniausių laikų. Kitose šalyse, pavyzdžiui, Vokietijoje, Prancūzijoje, JAV, ji itin populiari ir plačiai pritaikoma ne tik fitoterapijoje, bet ir homeopatijoje. Daug šio įvairių biologiškai aktyvių medžiagų kaupiančio augalo mokslinių tyrimų atliko rusų, turkų, amerikiečių mokslininkai. Kai kuriose šalyse, pavyzdžiui, Prancūzijoje ir JAV, yra gausus šio vaistinio augalo pagrindu pagamintų vaistinių preparatų ir maisto papildų pasirinkimas. Lietuvoje registruotas pelkinių vingiorykščių vaistinės augalinės žaliavos ekstrakto patentas.

Šis perspektyvus vaistinis augalas magistro baigiamojo darbo tyrimams pasirinktas neatsitiktinai. Pelkinių vingiorykščių vaistinė augalinė žaliava Lietuvoje tirta labai mažai, o didelis skaičius mokslinių publikacijų ir ilga vartojimo patirtis įrodo, kad šis vaistinis augalas gali tapti dar svarbesne ir reikšmingesne sėkmingos fitoterapijos praktikos dalimi. Lietuvoje surinktų pelkinių vingiorykščių esktraktų tyrimų rezultatatai, taikant pasirinktas metodikas, parodė, kad vaistinė augalinė žaliava turtinga biologiškai aktyviomis medžiagomis. Neatmetama galimybė, kad pelkinių vingiorykščių žolė ir žiedai gali tapti viena populiariausių žaliavų augaliniams vaistiniams preparatams ir maisto papildams, skirtiems virškinimo, kvėpavimo, širdies ir kraujagyslių bei kitoms žmogaus organizmo sistemoms.

TIKSLAS

Ištirti pelkinių vingiorykščių (*Filipendula ulmaria* L.) augalinės žaliavos cheminę sudėtį, antiradikalinį ir antimikrobinį poveikius

UŽDAVINIAI

1. Parinkti tinkamiausią pelkinių vingiorykščių vaistinės augalinės žaliavos ekstrakcijos metodą ir optimalias ekstrakcijos sąlygas.
2. Ištirti flavonoidų, askorbo rūgšties ir raugų kiekybinės sudėties kitimo dinamiką pelkinių vingiorykščių vegetacijos metu.
3. Ištirti pelkinių vingiorykščių vaistinės augalinės žaliavos antimikrobinį poveikį.
4. Nustatyti vaistinės augalinės žaliavos antiradikalinį aktyvumą.
5. Nustatyti, ar yra priklausomybė tarp biologiškai aktyvių medžiagų (flavonoidų, raugų ir askorbo rūgšties) kiekio vaistinėje augalinėje žaliavoje ir antiradikalinio jos poveikio.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 Pelkinių vingiorykščių (*Filipendula ulmaria* L.) apibūdinimas ir cheminė sudėtis

2.1.1 Augalo apibūdinimas

Pavadinimas – pelkinė vingiorykštė (*Filipendula ulmaria* L.), šeima – *Rosaceae*. Sinonimai: ilgarykštė, ožkabarzdis, priepuolžolė, šundrynos, vingeryčia, vingiras. Lotyniškai: *filium* – siūlas, *pendere* – kaboti. [1]. Sinonimas - *Spiraeae ulmaria* (L.), dažniau vartotas anksčiau. Europos Sąjungos šalyse Filipendula ulmaria vadinama įvairiai, pvz., angliškai: *Meadowsweet, Bittersweet, Queen of the meadows; prancūziškai: Reine des prés, Barbe de bouc, Barbe de chèvre; vokiškai: Echtes Mädesüß, Bocksbart, Geißbart.* [2, 3]

Tai daugiametis 60-150 cm žolinis augalas, turintis šliaužiantį šakniastiebį ir plonas pridėtines šaknis. [4] Augalas gali užaugti net iki 2 m aukščio. [5] Stiebas stačias, paprastas arba šakotas, briaunotas, gausiai lapuotas, plikas. Viršutinė stiebo dalis – gausiai šakota. Lapai pertrauktai plunksniški, viršūniniai su 3-5 skiltimis; viršutinėje pusėje žali, apatinėje – balsvi, gausiai pūkuoti. [4] Stambieji lapeliai plačiai kiaušiniški arba kiaušiniškai lancetiški, smailiaviršūniai, įkarpytai pjūkliški, ištisiniai skiautėti; viršūninis lapelis stambesnis už kitus, plaštakiškai suskaldytas į 3 – 5 dalis; prielapiai plačiai širdiški. [1] Žiedynas - iki 20 cm ilgio tanki viršūninė šluotelė. Žiedų daug, jie maži (6 - 8 mm skersmens), balti arba neryškiai oranžiniai, kvapūs. [4] Kuokeliai gelsvi, ilgesni už vainiklapius. Visas augalas kvepia karčiaisiais migdolais. [6]

Augalas žydi birželį – liepą. Vaisius – sudėtinis lukštavaisis, sudarytas iš daugelio nesuaugusių, neatsidarančių vienasėklių riešutėlių. Riešutėliai susukti, suploti, šiurkštūs, gysloti, raukšlėti, matiniai, rečiau blizgantys, pilkai ar gelsvai rusvi, 1,5 – 2,1 mm ilgio, 0,9 – 1,2 mm pločio. Pelkinės vingiorykštės dauginasi šakniestiebiais ir sėklomis. Vienas augalas užaugina 300 – 500 sėklų, kurias platina vėjas ir vanduo. [1] Riešutėliai lengvi: 1000 jų sveria tik apie 0,4 – 0,6 gramo. [7]

2.1.2 Augalo paplitimas ir dauginimasis

Augalas paplitęs Europoje, Sibire, Mažojoje ir Vidurinėje Azijoje, Mongolijoje. Šiaurės Amerikoje jis – atneštinis augalas. Šis augalas yra Eurazinis floros elementas.

Lietuvoje natūraliose Filipendula Mill. genties augavietėse auga 2 rūšių augalai: pelkinė (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) ir paprastoji (*Filipendula vulgaris* Moench) vingiorykštės. [1] Jų cheminė sudėtis yra labai panaši ir jos gali būti naudojamos tais pačiais tikslais. [8]

F. ulmaria priskiriama Lietuvoje plačiai paplitusiems augalams. [9] Jis gausiai paplitęs drėgnose ir šlapiose pievose, pelkėse, vandens telkinių pakrantėse, drėgnuose miškuose, įvairiuose pagrioviuose. Mėgsta drėgnus ir daug maisto medžiagų turinčius dirvožemius. [4] Ištisus sąžalynus, kartais ir su dilgėle ar kitais augalais, sudaro pelkėtuose ir šlapiuose juodalksnynuose, baltalksnynuose, mišriuose uosio ir juodalksnio medynuose. [6]

Pelkinės vingiorykštės, labai anksti, dar nepažydusios, pradeda daugintis vegetatyviškai. Ryšiai tarp motininių ir dukterinių individų išlieka nuo kelių mėnesių iki kelerių metų. Vegetatyvinio dauginimosi intensyvumą lemia ten esančios aplinkos sąlygos. Jis labai padidėja laisvesnėse teritorijoje, kur VA gali plėstis. [10]

2.1.3 Augalo kultyvavimas

Vaistinis augalas mėgsta purias, humusingas, drėgnas priesmėlio arba lengvo priemolio daug maistinių medžiagų turinčias dirvas. [1] Nemėgsta sausų ir rūgščių dirvožemių. [11] Dauginasi savaimine sėja. Auginant lysvėse ar darželiuose pavasarį (tinkamiausia - balandį) reikia iškasti jaunus augalėlius ir sodinti juos į parinktą nuolatinę auginimo vietą kas 40 – 50 cm, 60 – 70 cm tarpueiliais. Taip pat galima rugpjūčio pabaigoje – rugsėjo pradžioje surinktas sėklas pasėti į 3 – 4 cm gylio vageles, o pavasarį perkelti daigelius į numatytą pastovią auginimo vietą. Pirmaisiais kultivavimo metais augalus būtina gerai prižiūrėti: ravėti piktžoles, purenti dirvą, stebėti aplinkos sąlygas. Vienoje vietoje vingiorykštes galima auginti 8 – 9 metus, kas antri metai tręšiant organinėmis trąšomis. [1] Augalą kultivuoti geriau šešėlyje, nes saulėkaitoje gali apnykti, paruduoti. [12] Reikėtų pabrėžti, kad neapsaugotoje nuo saulės vietoje pelkines vingiorykštes galima auginti tik tada, kai ištisus metus yra stebima ir užtikrinama pakankama dirvožemio drėgmė. [11] 2009 metais pasirodė mokslinis pranešimas apie sėkmingą *F. ulmaria* ūglių regeneraciją *in vitro* iš jų lapų ar šaknų, naudojant įvairius augimo stimuliatorių derinius. [114]

2.1.4 Vaistinė augalinė žaliava, jos ruošimas ir laikymas

Žaliava – pelkinių vingiorykščių žiedynai (*Filipendulae ulmariae flos*); pagal Prancūzų farmakopėją (FP) homeopatiniams preparatams naudojami švieži ir žydintys žiedai [13]. Kita žaliava – pelkinių vingiorykščių antžeminė dalis – žolė *(Filipendulae ulmariae herba*). Visos vingiorykščių dalys skleidžia intensyvų, į medaus kvapą panašų aromatą. [12] Kai kuriems žmonėms kvapas yra per daug saldus ir šleikštus. Žiedų kvapas yra kur kas intensyvesnis ir šiek tiek skiriasi nuo lapų ar kitų augalo dalių kvapo. [11]

Žaliavos ruošimo laikas – birželio ir liepos mėnesiai (VA žydėjimo metu). Žiedynai arba antžeminė dalis (priklauso nuo to, kuri augalo dalis renkama) pjaunama giedrą dieną, nukritus rasai. Surinkta vaistinė augalinė žaliava (VAŽ) paskleidžiama plonu sluoksniu sausoje, vėdinamoje patalpoje arba pastogėje, kasdien atsargiai ir kruopščiai pavartoma. VAŽ yra kvapni (primena medaus aromatą), rūgštoko, kiek sutraukiančio skonio. Ji pakuojama į sandarias medines dėžes ar stiklinius indus ir laikoma sausoje, tamsioje bei vėdinamoje patalpoje. VAŽ tinkama vartoti 1 metus. [1]

2.1.5 Pelkinių vingiorykščių žolės cheminė sudėtis

Pelkinės vingiorykštės yra augalinis taninų šaltinis (joje aptinkama netgi 10–20 procentų elagotaninų). [14] Raugų kiekis priklauso nuo VA dalies: pavyzdžiui, pelkinių vingiorykščių šaknyse ir šakniestiebiuose rauginių medžiagų kiekis svyruoja nuo 3,5 iki 21,8 proc., o stiebuose aptinkama apie 1,9 proc. rauginių medžiagų. Tuo tarpu lapuose esantis taninų kiekis yra labai įvairus – nuo 3,6 iki 16,8 proc. [15] Hidrolizuojamų raugų kiekis etanoliniuose ekstraktuose yra apie 1 proc., o vandeniniuose – per 12 proc. Pagrindinė taninų sudedamoji dalis yra dimerinis darinys rugozinas D. [2] Rugozino D daugiausiai randama *F. ulmaria* žieduose – vidutiniškai apie 3 proc. [16].

VA kaupia ir flavonolinius glikozidus, iš kurių daugiausia yra spireozido. Vidutinis jo kiekis yra 2,4 – 4proc. [16] *F. ulmaria* žolėje taip pat randama rutino, hiperozido, avikuliarino, flavonoidų aglikonų – kvercetino, kempferolio, liuteolino, apigenino, astragalino. [14, 17, 18] Būtent hiperozido ir avikuliarino glikozidų lapuose ir žiedynuose randama net iki 0,8 proc. [1] Flavonoidų kiekis priklauso nuo augalo dalies - žydinčiose augaluose aptinkama 1-3 proc. flavonoidų, o pačiuose žiedynuose virš 6 proc. [2, **Error! Reference source not found.**]

Pelkinių vingiorykščių žieduose taip pat gausu salicilo rūgšties ir jos darinių, protokatechino, galo, kavos bei kitų polifenolinių rūgščių. [14] Iš fenilkarboninių rūgščių vyrauja kavos ir elago rūgštys. Elago rūgšties kiekis labai svyruoja – jos aptinkama nuo 2,37 iki 8,88 mg/1 g SM, kavos rūgšties randama 6,5 mg/ 100 g SM,o ferulo rūgšties – 13,2 mg/ 100 g SM. [16, 20] Taip pat aptinkama riebalų rūgščių (linolio, stearino). Askorbo rūgšties (vitamino C) randama iki 300,0 mg proc., o tokoferolių – apie 500 μ/g SM. [1, **Error! Reference source not found.**]

Salicilatų kiekis priklauso nuo to, kokios augalo dalys sudaro VAŽ: salicilo alkoholio žolėje randama 0,98 - 1,94 mg/g SM, jo darinių –2,31 – 4,84 mg/g SM, žieduose jo kiekiai didesni – atitinkamai 3,34 mg/g SM ir 8,36 – 9,23 mg/g SM. Salicino *F. ulmaria* VAŽ palyginus mažai: žolėje jo aptinkama 0,06 mg g SM, žieduose – jo kiekis nereikšmingai mažas, o kai kuriuose šaltiniuose nurodoma, kad jo gali būti ir iš viso neaptinkama. Salicilo rūgšties žolėje randama 1,47 mg/g SM, jos darinių – net iki 3,66 mg/g SM, o žieduose aptinkamas panašus, bet šiek tiek mažesnis salicilo rūgšties ir jos darinių kiekis: atitinkamai 1,38 mg/g SM ir 3,49 mg/g SM. *F. ulmaria* VAŽ randama ir monotropitino – tai neseniai

izuoliuotas metilsalicilato glikozidas [21]. Monotropitino ir žieduose ir žolėje randama apie 1 mg/g SM. [22] Europos vaistų agentūra (EMA) nurodo, kad suminis salicilatų (daugiausiai glikozidų formoje) kiekis dažniausiai yra mažesnis nei 0,5 proc. (maždaug 0,3-0,5 proc.) [2, 23]

Žolėje yra apie 0,2 proc. eterinio aliejaus, kurio pagrindiniai komponentai yra salicilaldehidas (sudarantis 75 proc. visų eterinio aliejaus komponentų), taip pat feniletilo alkoholis, benzilo alkoholis, metilsalicilatas, spireinas, heliotropinas, fenilacetatas ir vanilinas. [3] Virškinamajame trakte salicilas ir salicilaldehidas yra biotransformuojami: jie oksiduojami į salicilo rūgštį, kuri gimininga acetilsalicilo rūgščiai (aspirinui). [14] Europos farmakopėjoje (EP) nurodoma, kad kokybiškoje vaistinėje žaliavoje turi būti bent 1 ml lakiųjų medžiagų (eterinių aliejų) 1 kg VAŽ (pelkinių vingiorykščių žolės). [2]

2.2 Pelkinių vingiorykščių augalinės žaliavos medicininis pritaikymas

2.2.1 Vaistinio augalo istorinės farmacinės formos ir indikacijos

Keltų dvasininkai (dar kitaip vadinami druidais) pelkinę vingiorykštę, kaip ir ažuolą ar amalą, dėl jiems jau žinomų gydomųjų savybių laikė šventu augalu. [8] Pelkinių vingiorykščių, kaip VA vartojimas, buvo aprašytas jau vėlyvame XVI ir ankstyvame XVII amžiuose. Tradiciškai jos buvo vartojamos uždegiminėms ligoms gydyti ir kaip diuretikas. [2]

Daugelyje literatūros šaltinių kaip VA farmacinė forma dažniausiai aprašyta arbata, tačiau BP 1974 metais aprašyta ir 45 % v/v tinktūros gamyba. 1988 metais Prancūzijoje buvo vartojamos kapsulės su žiedų milteliais. Jos buvo skiriamos simptominiam nedidelio sąnarių skausmo gydymui bei inkstų ir virškinimo sistemos funkcijų gerinimui. Taip pat XX a. pabaigoje į Prancūzijos vaistinių preparatų kainoraštį buvo įtraukti vandeniniai ir alkoholiniai sausieji ekstraktai. [2]

Vingiorykščių preparatai nuo seno naudojami šlapimo išsiskyrimui skatinti, sergant šlapimo pūslės, inkstų ir širdies ligomis, siekiant sumažinti įvairius skausmus. Jie taip pat istoriškai vartojami viduriuojant ir persišaldžius. [3, 24]

Liaudies medicinoje pritaikomos visos VA dalys, bet paprastai – žolė, kartais lapai arba tik žiedynai. [8] Dar iki šiol vaistinio augalo žiedų arbata gydomi skrandžio, žarnyno, plaučių negalavimai, bronchitai. Žolės nuoviru plaunamos žaizdos, votys, gydomos odos ligos. Smulkiais sutrintais žiedų milteliais barstomos kūdikių iššutusios odos vietos. [3, 12]

2.2.2 Medicininis pritaikymas

Augaliniai vaistai lengviau ir greičiau pasisavinami nei sintetiniai, yra švelnesni žmogaus, ypač vaiko organizmui, be to, jų paklausa rinkoje nuolat auga. [25], pvz., Estijoje: nuo 1991 metų, kai buvo atgauta nepriklausomybė, *F. ulmaria* augalinė žaliava vėl plačiai pradėta vartoti po daugelio metų. [26]

F. ulmaria plačiai naudojama ne tik kaip maisto priedas ir prieskonis, dažiklis, bet ir kaip VA. [27] Šis augalas nėra plačiai ištirtas klinikinėmis sąlygomis, todėl jos teigiamas poveikis daugiausiai grindžiamas tradiciniu vartojimu, *in vitro* testų bei bandymų su gyvūnais rezultatatais. [28] Vingiorykščių sudėtyje esančios biologiškai aktyvios medžiagos (BAM) apsaugo ir ramina virškinamojo trakto gleivinę, mažina padidėjusį skrandžio rūgštingumą ir nemalonius jo sukeliamus pojūčius bei stabdo pykinimą. Jos vartojamos gydyti hiperaktyvumą, viduriavimą (ypač vaikams), gastritą, pepsinę opą bei norint palengvinti reumatinius skausmus. [27]

Džiovinti žiedai ir žolė tradiciškai vartojami palaikomajam peršalimo gydymui, nes pasižymi diuretinu ir prakaitavimą skatinančiu poveikiu. [29] Taip pat VAŽ tinka ir nemaloniems podagros simptomams malšinti. Remiantis tyrimais, atliktais su gyvūnais, VA ekstraktų vartojimas gali skatinti šlapimo rūgšties išsiskyrimą [30]. Tyrimais jau įrodyta, kad ir vandeniniai, ir etanoliniai ekstraktai pasižymi priešuždegiminiu ir antimikrobiniu poveikiu. Fibrinolizinis poveikis įrodytas keletu *in vivo* eksperimentų. Flavonoidų kompleksas pasižymi priešvėžiniu poveikiu. [29]

2.2.2.1 Paprastasis peršalimas ir kvėpavimo takų ligos

Pelkinių vingiorykščių poveikis gyvūnų centrinei nervų sistemai plačiai ištirtas – vienas svarbiausių požymių yra kūno temperatūros sumažėjimas. Šis antipiretinis aktyvumas kartu su priešuždegiminiu/imunomoduliaciniu ir antibakteriniu efektais lemia šio VA preparatų tinkamumą paprastojo peršalimo ir kvėpavimo takų ligoms gydyti. [2, 3]

F. ulmaria VAŽ gali padėti persišaldžius: sergant įvairiomis infekcinėmis ir virusinėmis ligomis, pvz., sloga, angina, bronchitu, gripu. Pelkinių vingiorykščių žiedų arbata peršalimui gydyti gali būti ruošiama kartu su čiobreliais ir liepžiedžiais. [5] Europos mokslinė fitoterapijos bendrija (EMFB) nurodo, kad VA nuoviras, skystasis ekstraktas ir tinktūra labiausiai tinka palaikomajam gydymui nuo peršalimo. [3]

2.2.2.2 Skausmas ir uždegimas

Salicilo rūgštis, esanti augalo sudėtyje, pasižymi priešuždeginėmis savybėmis. [31] Salicilo aldehidas taip pat pasižymi NVNU būdingais požymiais, nes yra aspirino prekursorius, kuris didžiausiais

kiekiais išskiriamas iš žiedų pumpurų. [30] Įrodyta, kad *F. ulmaria* etanoliniai ekstraktai slopina uždegiminių procesų, tokių, kaip eksudacija, skausmas bei karščiavimas, pasireiškimą. [32]

Lietuvoje 2002 užregistruotas patentas, kuriame aprašomas pelkinių vingiorykščių preparato gamybos būdas. Poveikio buvimas įrodomas *in vivo* tyrimo rezultatais: bandymui parinktos 2 mg/kg^{-1}, 4 mg/kg^{-1} ir 8 mg/kg^{-1} preparato (40 proc. V/V etanolinės tinktūros) dozės ryškiai ir statistiškai reikšmingai mažino ENG (eritrocitų nusėdimo greitį), kuris, kaip nustatyta, buvo padidėjęs adjuvantinio artrito (AA) metu. Tyrimo metu AA sergančių žiurkių ENG skaitinė reikšmė sumažėjo iki sveikų žiurkių ENG skaitinės reikšmės. Duomenys buvo panašūs gydant laboratorinių gyvūnėlių AA acetilsalicilo rūgštimi (aspirinu). [33] Lietuvoje taip pat atliktas tyrimas, kurio tikslas buvo ištirti ir palyginti augalinių preparatų kaštonų žiedų (*Aesculus hippocastanum* L. ir vingiorykščių (*Filipendula ulmaria* (L.) tinktūrų įvairių dozių poveikį eksperimentinio žiurkių osteoartrito eigai. Gavus rezultatus, padaryta išvada, kad profilaktinis augalinių preparatų naudojimas mažina sąnarinius pokyčius eksperimentiškai sukelto osteoartrito metu. *F. ulmaria* vidutinių (8 mg/kg/d.) ir didelių (17 mg/kg/d.) dozių poveikis ryškesnis gerinant sąnarių būklę. Tik didelės (19 mg/kg/d.) *A. hippocastanum* dozės pasižymėjo statistiškai reikšmingu poveikiu. [34]

In vitro tyrimais įrodyta, kad pelkinių vingiorykščių ekstraktas pasižymi imunomoduliaciniu poveikiu. VAŽ ekstraktai reikšmingai slopino žmogaus leukocitų reaktyvosios deguonies gamybą. Buvo nustatyta, kad dietileterinis šaknų ekstraktas stipriausiai slopino limfocitų proliferaciją. [35]

Įrodyta, kad *F. ulmaria* sudėtinės medžiagos turi inhibuojantį poveikį prieš rekombinantinę histidino dekarboksilazę (HD, kuri dalyvauja biogeninio amino histamino sintezėje). Ryškiausią inhibiciją sukėlė etanolinis VAŽ ekstraktas. Iš jo buvo izoliuoti elagotaninai ir kai kurie flavonoidai. Padaryta išvada, kad elagotaninai ir kvercetinas turi slopinamąjį poveikį prieš HD, ir tai gali būti žingsnis link naujų vaistų sukūrimo, nes iki šiol tokiu mechanizmu į histamino apykaitą veikiančių vaistinių preparatų nėra. [27]

Autorių duomenimis, *F. ulmaria* VAŽ pasižymi inhibuojančiu aktyvumu prieš elastazę. Buvo tirtos net 42 *Rosaceae* šeimos augalų rūšys, tačiau tik *Rosoideae* pošeimis (kuriam ir priklauso *F. ulmaria*) pasižymi ypatingai dideliu taninų kiekiu bei elastazę inhibuojančiu aktyvumu. [36]

BP ir kitoje literatūroje nurodoma, kad užpilai, skystieji ekstraktai ir tinktūros tinka reumatiniams raumenų ir sąnarių skausmams malšinti, vartojant *per os* ir išoriškai. [37] Toks poveikis įrodytas ne vienu moksliniu tyrimu. Iš vandeninių VA ekstraktų buvo izoliuoti polifenoliniai junginiai (apigeninas ir kvercetinas), kurie buvo inkubuojami kartu su THP1 žmogaus ląstelių linijos makrofagais, interleukino (IL) - 1β, IL-6 ir citokinų klasės alfa tumoro nekrozės faktoriumi (TNF-α). 10 μM apigenino ir tokia pati koncentracija kvercetino reikšmingai slopino IL-6, o 10 μM apigenino ir 25 μM kvercetino koncentracijos statistiškai reikšmingai slopino TNF-α. [38] 10, 50, 150 ir 500 mg/kg *F. ulmaria*

etanolinių ekstraktų dozės, duotos pelėms, skatino jų humoralinio imuniteto atsaką bei padidino IL – 2 gamybą. [39]

2.2.2.3 Skrandžio opos, rėmuo ir virškinimo sutrikimai

Dar 1980 m. Barnaulov su bendraautoriais nustatė, kad pelkinių vingiorykščių nuoviras pasižymi priešopiniu poveikiu: atlikti eksperimentai su žiurkėmis, perrišant jų žarnų stormenį ir imobilizacijos metu pastebėjus tik mažus pažeidimus, kai buvo eksperimentiškai acetilsalicilo rūgštimi sukelta opaligė ir į pogelivį injekuojamas 70 proc. V/V etanolis.[14] Ir kiti, vėliau mokslininkų atlikti *in vivo* testai parodė neabejotiną apsauginį poveikį prieš skrandžio opas, sukeliamas acetilsalicilo rūgšties. Taip pat ji gali būti vartojama gastritui bei lėtinėms alkoholio indukuojamoms skrandžio opoms gydyti. [28] Įrodytas *F. ulmaria* etanolinio ekstrakto augimą inhibuojantis poveikis prieš *Helicobacter pylori* bakteriją, kuri įvardijama kaip dažna gastrito, opaligės, dispepsijos ar net vėžio priežastis. [40]

F. ulmaria, kaip minėta anksčiau, kaupia salicilatus, tačiau įprastomis sąlygomis salicilatai augale yra chemiškai sujungti ir randami glikozidų formoje. Taigi tikimybė jais sukelti skrandžio gleivinės kraujavimą yra daug mažesnė, nei aspirino, o poveikis – labai panašus. [3, 23, 41] Be to, pelkinės vingiorykštės nesukelia aspirinui būdingų nepageidaujamų poveikių, nes kiti VA esantys junginiai (pvz., flavonoidai, taninai) apsaugo jautrias skrandžio bei žarnų gleivines ir visiškai nesusilpnina priešuždegiminio salicilo rūgšties poveikio. [8, 23]

Literatūros šaltiniuose pateikiama, kad *F.ulmaria* tinktūros yra tinkamos norint pagerinti virškinimą skrandyje, padidinti skrandžio rūgšties išsiskyrimą bei pagreitinti skrandžio išsituštinimą. [42, 3] Remiantis Britų farmakopėja (BP), *Filipendulae ulmariae* žolė vartojama mišiniuose su *Althaea officinalis* ir *Melissa officinalis* skrandžio sutrikimams ir su *Ballota nigra* pykinimui šalinti, kitų autorų duomenimis veikia spazmolitiškai, tulžies išsiskyrimą skatinančiai. [2]

2.2.2.4 Priešvėžinis poveikis

Paskutiniu metu išsamios epidemiologinės studijos parodė, kad egzistuoja koreliacija tarp didesnio antioksidantų, tokių, kaip pelkinėse vingiorykštėse randamų flavonoidų ar taninų, suvartojimo bei rizikos susirgti tam tikrų formų vėžiu, kardiovaskulinėmis ligomis ir kitomis degeneracinėmis ligomis, kurias sukelia oksidacinis stresas, sumažėjimo. [16]

Paskutiniais metais priešvėžinis pelkinių vingiorykščių poveikis tiriamas labai plačiai. Autorių duomenimis, chloroforminiai ir heksaniniai VA ekstraktai turėjo antiproliferacinį poveikį prieš B16 melanomos ląsteles. [43] *F. ulmaria* ekstraktai (10 ir 50μg/mL koncentracijų) pasižymėjo žymiu

citotoksiškumu ir žmogaus limfoblastoidinių ląstelių augimo slopinimu *in vitro*. [44] Vietiškai panaudotas žiedų nuoviras (tepalo forma) lėmė suragėjusių karcinomos ląstelių kiekio sumažėjimą pelių organizmuose (eksperimentinis gimdos kaklelio vėžys sukeltas kancerogenu 7,12-dimetilbenantracenu). Ląstelių kiekis sumažėjo 39 proc. Teigiamas atsakas buvo nustatytas 32 tyrimo dalyvių organizmuose (67 proc. bendro skaičiaus). Atkrytis nepasireiškė ir visiškai per 12 mėnesių trukusį gydymo kursą buvo išgydyta 10 tyrimo dalyvių. [45]

2.2.2.5 Antikoaguliacinis poveikis

In vivo ir *in vitro* tyrimuose buvo nustatyta, kad pelkinių vingiorykščių VAŽ (žiedų ir sėklų) ištrauka pasižymi ryškiu antikoaguliaciniu aktyvumu, t.y. stabdo trombocitų agregaciją, o tuo pačiu sumažina ir širdies infarkto bei insulto riziką. [14] Ryškus antikoaguliacinis bei fibrinolizinis žiedų bei sėklų ekstraktų aktyvumas buvo įrodytas pavartojus ekstraktus *per os*. [46] Pelkinių vingiorykščių žiedų ištraukų stiprias fibrinolizines ir antikoaguliacines savybes nulemia į hepariną panašios BAM, kurios, susijungdamos su baltymais, sudaro tam tikrus kompleksus. [14] Šios medžiagos dėl tokio antikoagulacinio poveikio gali būti vadinamos augaliniu heparinu. [47] Augalinio, kaip ir gyvūninio heparino poveikį taip pat gali neutralizuoti heparino antagonistas protamino sulfatas – tai dar vienas panašumo į gyvūninį hepariną įrodymas. [48]

2.2.2.6 Kitas medicininis pritaikymas

Teigiama, kad kai kuriose šalyse pelkinės vingiorykštės buvo vartojamos kaip raminamąjį poveikį turintys VA. Pavyzdžiui, Bosnijoje ir Hercegovinoje *F. ulmaria* arbatos jau šimtmečius vartojamos kaip natūralūs raminamieji vaistai vienos arba kartu mišiniuose su tokiais augalais, kaip *Humulus lupulus* ar *Hypericum perforatum*. [49]

Pelkinės vingiorykštės tradiciškai vartojamos kaip gydomoji priemonė nuo viduriavimo (diarėjos) ir šlapimo sistemos infekcijų. Toks jos poveikis pripažįstamas dėl optimalios taninų kokybinės ir kiekybinės sudėties, ryškių sutraukiamųjų bei antibakterinių savybių. [3, 28]

Ne vieno autoriaus bei EMFB duomenimis, *F. ulmaria* užpilai ir tinktūros turi reikšmingą diuretinį poveikį, tinka esant albuminurijai ir oligurijai, sergant cistitu ir pielonefritu, skatina šlapalo ekskreciją. [2]

2.2.3 Augalinio vaisto formos ir dozavimas

Jokie klinikiniai tyrimai iki šiol optimalioms dozėms nustatyti neatlikti, pateikiamos VA farmacinės formos ir dozės yra bendųjų gairių pobūdžio. [3, 28]

- Švieži žiedai: 2,5 – 3,5 g/ per dieną.
- Šviežia žolė: 4 – 5 g/ per dieną. BP duomenimis – 12 – 18 g/ per dieną. [2, 3, 50]
- Užpilas: 2 – 3 g VAŽ į 150 ml verdančio vandens, palaikius 10 min gerti tiek, kiek toleruojama.
- Skystasis ekstraktas (1:1) (g/ml) – 2 – 3 ml / per dieną. BP duomenimis – 4,5 – 18 ml/ per dieną. [2,28]

EMA kaip įprastas vaistų formas papildomai nurodo dozuotus VAŽ miltelius, sausąjį ekstraktą, tinktūrą (45 proc. etanolio V/V), skirtus vartojimui *per os.* [2]

2.2.4 Toksiškumas, nepageidaujamos reakcijos ir galima sąveika su vaistais

Jokios patvirtintos informacijos apie toksiškumą iki šiol nepateikta, tačiau žinoma, kad salicilatai jiems alergiškiems žmonėms gali sukelti astmos paūmėjimą, o metilsalicilatas gali absorbuotis per odą ir sukelti gyvybei pavojingas būkles (ypač vaikams). [3, 28] Duomenų apie genotoksiškumą, mutageniškumą ir kancerogeniškumą nepakanka. Vingiorykščių preparatai gali sukelti kraujavimą iš virškinamojo trakto. Yra paskelbtas atvejis, kad 4 metų amžiaus berniukui, vartojusiam augalinį sirupą su *F. ulmaria* ir *S. alba* ekstraktais, pasireiškė hipovoleminis šokas dėl stipraus kraujavimo iš virškinamojo trakto. Šis sirupas, skirtas paprastojo peršalimo gydymui, buvo atšauktas iš Italijos rinkos. [3, 51]

Vartojimas kartu su antikoaguliantais gali sukelti sinergistinį poveikį – stipriai padidėja kraujavimo pavojus. Taigi trobolitinių ir trombocitų agregaciją veikiančių vaistinių preparatų vartojimas kartu su pelkinių vingiorykščiųpreparatais yra kontraindikuotinas. [3, 41, 52] Pavyzdžiui, varfariną vartojantiems pacientams patariama vengti *F. ulmaria* preparatų, nes antikoaguliantinis augalo aktyvumas *in vitro* jau įrodytas, nors klinikinė reikšmė nėra žinoma. [28]

Pelkinių vingiorykščių vartojimas kontraindikuotinas pacientams, kurie alergiški aspirinui ir sulfitams. Be to, koncentruotų ekstraktų vartojimą būtina nutraukti bent savaitę prieš planuojamą operaciją, jų vartoti negalima nėštumo ir žindymo laikotarpiu, nes *in vitro* tyrimais yra įrodytas galimas poveikis į gimdą. [3, 28]

Daugiau jokių duomenų apie absorbciją, pasiskirstymą, metabolizmą, eliminaciją ar farmakokinetinę sąveiką su kitais vaistiniais preparatais nėra. [2] Tačiau mokslinėje literatūroje yra duomenų, kad polifenoliniai junginiai, ypač flavonoidai, slopina kai kurias svarbias fermentines

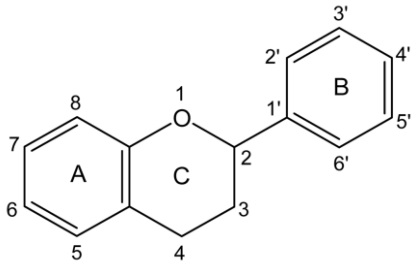
sistemas, pvz., citochromo oksidazę, o tai, kaip žinoma, gali daryti įtaką kitų vaistinių preparatų biotransformacijai. [53]

2.3 Svarbiausių pelkinių vingiorykščių biologiškai aktyvių junginių apžvalga

2.3.1 Flavonoidai

Flavonoidai – biologiškai aktyvūs ir plačiai gamtoje paplitę organiniai junginiai (lot. *flavus* – geltonas), turintys heterociklinę struktūrą. Tai – viena didžiausių augalinių fenolinių junginių grupių. Flavonoidai yra kaupiami įvairiose augalo dalyse: žieduose, vaisiuose, lapuose, stiebuose. [54] Dauguma flavonoidų yra dažniausiai augaluose randami pigmentai po chlorofilo ir karotenoidų. [55] Iš flavonoidų labiausiai ištirti ir geriausiai žinomi yra rutinas (dar kitaip vadinamas vitaminu P1), hesperidinas (vitaminas P2), kvercetinas, antocianinai, proantocianidinai (gaunami iš spanguolių), flavanai (išskiriami iš arbatos). [56]

Flavonoidų struktūros pagrindą sudaro benzo – γ pirono žiedas (flavanas). Flavanoidų struktūrai būdinga C_6 –C_3 – C_6 molekulinė grupė. Šie BAM turi du benzolo žiedus, kurie atitinkamai žymimi A ir B. Juos jungia trys anglies atomai (1 pav. – 2, 3, 4), šioje vietoje dažniausiai sudaromas tam tikras heterociklas (C, pirano ar γ pirono darinys). [55, 57] Natūraliai flavonoidai egzistuoja kaip monoglikozidai (pvz., hiperozidas ir viteksinas), diglikozidai (geriausiai žinomas – rutinas) arba kaip aglikonai (pvz., liuteolinas ir kvercetinas). [58,59]



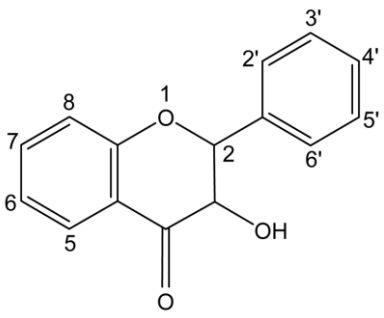
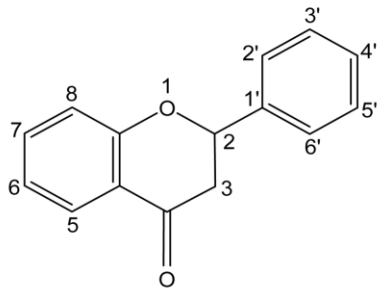
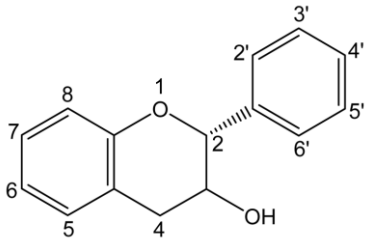
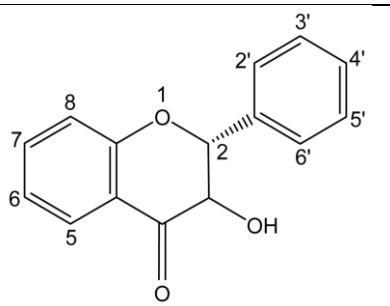
1 pav. Pagrindinė flavonoidų struktūra (A ir B – benzolo žiedai, C – pirano žiedas).

2.3.1.1 Flavonoidų klasifikacija

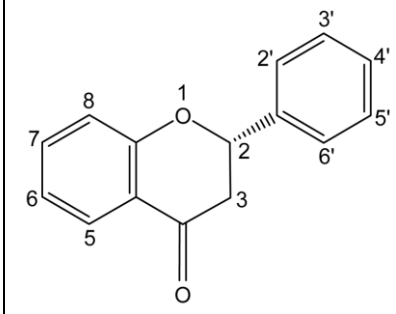
Žinoma ne viena flavonoidų klasifikacijos sistema. Flavonoidai gali būti klasifikuojami pagal cheminę struktūrą ar heterociklo dydį, pagal įvairių cukrų molekulių kiekį ar šoninių radikalų padėtį, pagal cheminę sandarą ar propano fragmento oksidacijos laipsnį [55]. 1 lentelėje pateikiamos

pagrindinės flavonoidų grupės. Be pateiktųjų, pagrindinių, dar yra išskiriamos dihidroflavonolių, leukoantocianidinų, chalkonų, dihidrochalkonų, biflavonoidų, azoto turinčių flavonoidų, auronų, auronolių ir neoflavonoidų bei kitos biologiškai aktyvių junginių grupės. [58, 60]

1 lentelė. Pagrindinių flavonoidų junginių grupių pavadinimai, bendra cheminė struktūra bei atstovų pavyzdžiai. [55]

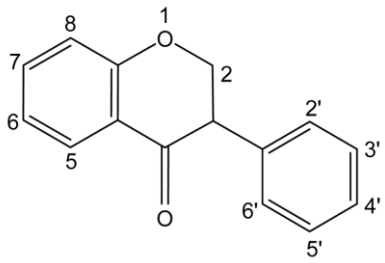
<table>
<tr><th>Klasės pavadinimas</th><th>Bendra grupei cheminė struktūra</th><th>Atstovų pavyzdžiai ir jų cheminė struktūra</th></tr>
<tr><td>Flavonoliai</td><td></td><td>
<table>
<tr><td>Pozicija</td><td>5</td><td>7</td><td>3’</td><td>4’</td><td>5’</td></tr>
<tr><td>Kvercetinas</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>-</td></tr>
<tr><td>Kemferolis</td><td>OH</td><td>OH</td><td>-</td><td>OH</td><td>-</td></tr>
<tr><td>Galanginas</td><td>OH</td><td>OH</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr>
<tr><td>Fisetinas</td><td>-</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>-</td></tr>
<tr><td>Miricetinas</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>Flavonai</td><td></td><td>
<table>
<tr><td>Pozicija</td><td>5</td><td>7</td><td>3’</td><td>4’</td></tr>
<tr><td>Apigeninas</td><td>OH</td><td>O</td><td>-</td><td>OH</td></tr>
<tr><td>Liuteolinas</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td></tr>
<tr><td>Chrisinas</td><td>OH</td><td>OH</td><td>-</td><td>-</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>Flavan – 3 – oliai</td><td></td><td>
<table>
<tr><td>Pozicija</td><td>3</td><td>5</td><td>7</td><td>3’</td><td>4’</td><td>5’</td></tr>
<tr><td>(+)-Katechinas</td><td>βOH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>-</td></tr>
<tr><td>(-)-Katechinas</td><td>αOH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>-</td></tr>
<tr><td>(-)-Epigalokatechinas</td><td>αOH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>Flavononoliai</td><td></td><td>
<table>
<tr><td>Pozicija</td><td>5</td><td>7</td><td>3’</td><td>4</td></tr>
<tr><td>Taksifolinas</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td></tr>
</table>
</td></tr>
</table>

Flavononai



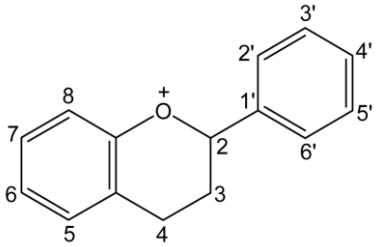
Pozicija	5	7	3’	4’
Naringeninas	OH	OH	-	OH
Naringinas	OH	O-Rha-Glu	-	OH
Hesperidinas	OH	O-Rha-Glu	OH	OCH_3

Izoflavonai



Pozicija	5	7	4’
Genisteinas	OH	OH	OH
Genistinas	OH	O-Glu	OH
Daidzeinas	-	OH	OH
Daidzinas	-	O-Glu	OH
Ononinas	OH	O-Glu	OCH_3

Antocianidinai



Pozicija	3	5	7	3’	4’	5’
Cianidinas	OH	OH	OH	OH	OH	-
Cianinas	O-Glu	OH	OH	OH	OH	-
Peonidinas	OH	OH	OH	OCH_3	OH	-
Delfinidinas	-	OH	OH	OH	-	OH
Pelargonidinas	OH	OH	OH	-	OH	-
Malvidinas	OH	OH	OH	OCH_3	OH	OCH_3

Glu: glikozidas, Rha-Glu: ramnoglikozidas.

2.3.1.2 Flavonoidų poveikis žmogaus organizmui

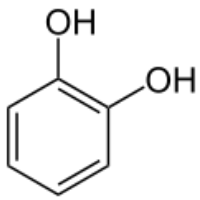
Flavonoidai, kaip tipiniai fenoliniai junginiai, turi antioksidantinį ir sunkiuosius metalus surišantįjį poveikį. [60] Antocianinai gali būti sėkmingai pritaikyti oksidacinio streso sukeltų ligų, tokių, kaip vėžys ar vainikinių širdies kraujagyslių sutrikimai, gydymui. [61] Taip pat jie veikia priešuždegimiškai, antialergiškai, hepatoprotekciškai. Jiems būdingas antitrombinis, antivirusinis, antibakterinis, priešvėžinis poveikiai. [60] Keletas šių BAM pasižymi smulkiąsias kraujagysles

atpalaiduojančiu, eritrocitų agregaciją slopinančiu poveikiu. Priklausomai nuo cheminės struktūros, kai kurie flavonoidai, pvz., rutinas ar kvercetinas, mažina kapiliarų trapumą, gali normalizuoti kraujagyslių pralaidumą. [59] Flavonoidams, pvz., apigeninui, būdingas spazmolitinis (spazmus atpalaiduojantis) poveikis. Šių BAM kompleksas, į kurį įeina įvairios cheminės sudėties flavonoidų, pasižymi raminamuoju ir atpalaiduojančiu poveikiu, stiprina širdies raumens veiklą ir mažina centrinės nervų sistemos dirglumą. [25, 62]

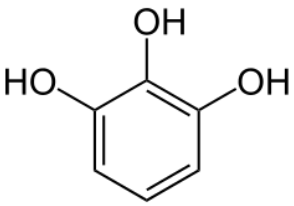
2.3.2 Taninai (raugai)

Taninai – tai augalinės kilmės rauginės medžiagos. [63] Priklausomai nuo raugų kilmės skiriasi jų cheminė struktūra. Taninai yra antriniai aukštesniųjų augalų metabolitai, kuriems būdinga polifenolinė struktūra. [64] Tai sudėtingi organiniai, azoto neturintys augaliniai junginiai, paprastai pasižymintys sutraukiančiomis savybėmis. Jie kaupiami įvairiose augalo dalyse: šaknų ir šakniastiebių bei medžių žievėje, žolinių augalų lapuose ir stiebuose, taip pat vaisiuose ir sėklų luobelėse. [65] Taninų (raugų) sąvoka apima didžiulę grupę organinių junginių, kuriems būdingos bendrosios fenolinės reakcijos. Išskirtinė daugumos taninų ypatybė yra sugebėjimas jungtis su proteinais ar kitokiais polimerais, pvz. pektinu. [66]

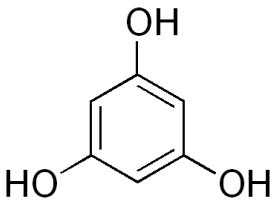
Taninų cheminė struktūra labai įvairi. Struktūros pagrindą sudaro daug atomų turintys įvairios cheminės sudėties fenoliai (nuo paprasčiausių polifenolių iki sudėtingų daugiamolekulinių darinių – dar kitaip vadinamų flobafenais. Dažniausiai raugų molekulėse yra šių fenolių:



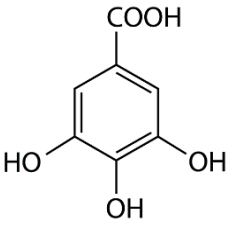
Pirokatecholis



Pirogalolis



Florogliucinolis



Galo rūgštis

Metilinimo ir karboksilinimo reakcijų metu susidaro tokie junginiai: galo rūgštis, įeinanti į daugelio gamtoje randamų raugų sudėtį, arba metilinti florogliucinolio dariniai, kuriems priklauso orsinas ir orselino rūgštis, įeinanti į kerpėse randamų raugų sudėtį. [67] Taninų molekulinė masė yra nuo 500 D ir siekia 30000 D. Rauginančios savybės priklauso nuo taninų molekulinės masės; tam dažniausiai naudojami vidutinės molekulinės masės raugai, t.y. nuo 1000 iki 20000 D. [64]

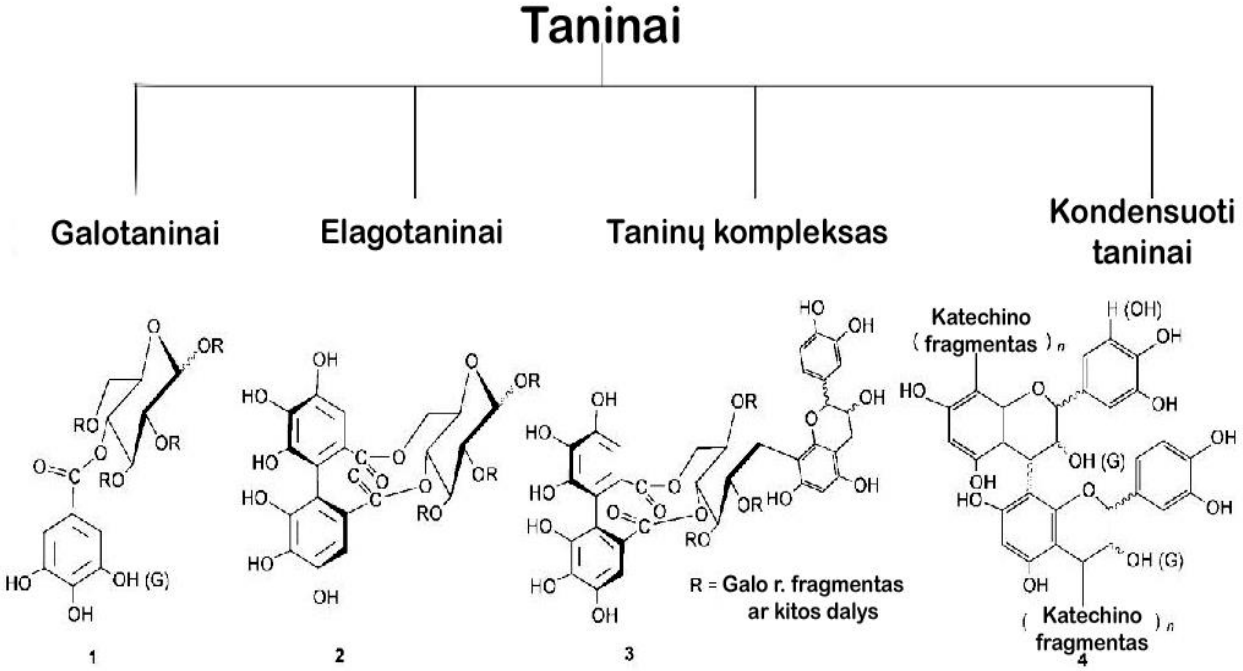
2.3.2.1 Taninų klasifikacija

Taninų nomenklatūra nėra visiškai tiksli ir vieninga. Ne visos rauginančios medžiagos gali būti vadinamos taninais, o daug taninų nepasižymi rauginančiomis savybėmis, tačiau turi taninams būdingas struktūrines savybes. [64]

Visi gamtoje natūraliai randami raugai, atsižvelgiant į hidrolizės produktus, skirstomi į dvi dideles grupes:

Hidrolizuojami raugai – galotaninai (esterių tipo pirogalolio dariniai). Tai tokios medžiagos, kurios, veikiamos praskiestų rūgščių arba fermentų, hidrolizuojasi, tai yra, suskyla į monosacharidą D – gliukozę ir tokius aciklinius junginius, kaip galo rūgštis arba elago rūgštis. Jie skirstomi į tris dideles raugų grupes: depsidus, galotaninus, elagotaninus.

Kondensuoti raugai – pirokatecholio dariniai, kuriuose aromatiniai ciklai yra susijungę anglies atomų jungtimis (C-C). Veikiami fermentais ar praskiestomis rūgštimis, jie nehidrolizuoja, o priešingai, tik dar labiau kondensuojasi. Kondensuoti raugai savo struktūroje neturi cukrų. Suskaidyti į paprastesnius junginius juos galima tik lydant su šarmais. Ši grupė daug didesnė, nei hidrolizuojamų raugų, tačiau, palyginus, mažai ištirta. Kondensuoti raugai skirtomi į dvi grupes – katecholių darinius ir leukoantocianidinų darinius. [67] Pasitaiko ir kitokių raugų klasifikacijų, pvz.,pagal taninų struktūrines savybes juos galima padalinti ir į keturias pagrindines grupes [64]:



(1) Galotaninai - tai tokie taninai, kurių galo rūgšties vienetai arba depsidai yra prisijungę iki 5 gliukozės molekulių ar kitokių struktūrinių vienetų.

(2) Elagotaninai – tokie taninai, kuriuose yra ne mažiau kaip dvi galo rūgšties molekulės, tarpusavyje sujungos C-C ryšiu ir nėra glikozidiškai susijusios su katechino vienetais.

(3) Taninų kompleksai – tai taninai, kuriuose katechino vienetas yra glikozidiniu ryšiu susijungęs su galotanino ar elagotanino vienetu.

(4) Kondensuoti taninai – tai iš oligomerinių ar polimerinių proantocianidinų ir katechino vienetų suformuoti junginiai. [64, 65]

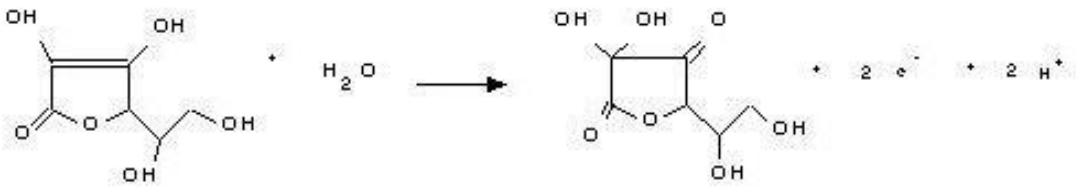
2.3.2.2 Taninų poveikis žmogaus organizmui

Biologiniam poveikiui svarbi taninų rūšis (struktūra ir tirpumas vandenyje) bei kiekis. [68] Daugeliu tyrimų įrodyta, kad taninai pasižymi priešvėžiniu efektyvumu, nes turi antioksidantinių savybių, gali apsaugoti ląstelių sieneles nuo neigiamų aplinkos sąlygų poveikio. Gerai aprašytas antimikrobinis aktyvumas: šie junginiai stabdo daugelio grybelių, mielių, bakterijų ir virusų augimą, turi sutraukiančių savybių. Taninai gali pagreitinti kraujo krešėjimą, mažinti kraujo spaudimą ir serumo lipidų kiekį, turėti teigiamą poveikį gydant CD. [68, 69] *In vitro* tyrimais įrodyta, kad taninai mažina dujų (metano) išsiskyrimą. [70, 71] Šiems fenoliniams junginiams būdingas ir kardioprotekcinis (širdies raumenį apsaugantis), priešuždegiminis bei imunomoduliacinis poveikiai; jie gali padėti formuotis nesfecifiniam imuniniam atsakui. [**Error! Reference source not found.**, 73]

2.3.3 Askorbo rūgštis

Vitaminas C – tai vandenyje tirpus vitaminas, kitaip dar vadinamas askorbo rūgštimi arba antiskorbutiniu vitaminu (kai jo trūksta, susergama skorbutu). Šis vitaminas reikalingas normaliam organizmo augimui ir labai svarbus jo vystymuisi. Žinoma, kad žmogaus organizmas nesugeba pats pasigaminti šio vitamino, todėl jo būtina gauti su maistu arba maisto papildais. [74, 75] Tai pagrindinis žmogaus organizmo vandeninėje terpėje veikiantis antioksidantas. Augalų ląstelėse askorbo rūgšties yra tiek pat kiek ir augalinio pigmento chlorofilo. [76]

Vitaminas C yra 2 – keto – L – gulono rūgšties laktonas, kuris gali būti L ir D formos. Tai yra alifatinės struktūros junginys. Biologiškai aktyvi yra L – askorbo rūgštis. Tai vienas nepatvariausių vandenyje tirpių vitaminų. Vitaminas C nepatvarus deguonies ir temperatūros poveikiui. Oro deguonis jį oksiduoja į dehidroaskorbo rūgštį. [67, 74] Augalų ląstelėse askorbo rūgštis sintetinama augalų citoplazmoje iš D – gliukozės. [76]



2 pav. Askorbo rūgšties oksidacija į dehidroaskorbo rūgštį.

In vitro tyrimais buvo nustatyta, kad flavonoidai pasižymi askorbo rūgštį apsaugančiu poveikiu, nes aktyviai ją redukuoja. Dėl flavonoidams būdingų redukcinių savybių VAŽ gali būti išsaugoma didžioji dalis neoksiduotos dehidroaskorbo rūgšties. [14]

2.3.3.1 Askorbo rūgšties poveikis žmogaus organizmui

Askorbo rūgštis dalyvauja oksidacijos – redukcijos reakcijose, tai – pagrindinis tarpląstelinis vandeninėje terpėje veikiantis antioksidantas. Kaip reduktorius ji gali redukuoti molekulinį deguonį, citochromus, nitratus, taip netiesiogiai apsaugodamas kai kurias biomolekules, pvz., askorbo rūgštis apsaugo vitaminus A ir E nuo oksidacijos. Ji dalyvauja kolageno, tulžies rūgščių, antinkščių žievės steroidinių hormonų, noradrenalino, karnitino, serotonino sintezėje. Askorbo rūgštis labai svarbi tirozino ir geležies apykaitoje. Ji skatina žaizdų gijimą ir audinių regeneraciją. Reguliarus šio vitamino vartojimas padeda sušvelninti paprastojo peršalimo simptomus ir (arba) sumažinti jo trukmę. [74, 75, 76, 77, 78]

2.4 Biologinis vingiorykščių vaistinių augalinių žaliavų poveikis

2.4.1 Laisvieji radikalai, antioksidantai ir antioksidantinis aktyvumas

Laisvieji radikalai (LR) – tai įvairios kilmės molekulės, turinčios neporinį elektroną. Žinoma, kad molekulė būna stabili tik tuomet, jeigu jos elektronų skaičius yra porinis. Taigi LR – tai nestabilios molekulės, galinčios pažeisti kitas molekules, prisijungdamos jų elektroną. LR pažeidžia ląstelės membranos struktūrinius junginius (lipidus ir baltymus), taip pat fermentus, ląstelės branduolį , ir netgi DNR. LR žmogaus organizme susidaro nuolat ir įvairiais kiekiais. [79] Reaktyviųjų deguonies formų (ROS) šaltinis augaluose yra chloroplastų fotosistemos. [76]

Antioksidantai veikia sujungdami LR ir taip apsaugodami organizmo ląsteles nuo oksidacinio streso. Antioksidantai yra medžiagos, kurios gali efektyviai redukuoti prooksidantą, susidarant netoksiškiems ar mažiau toksiškiems, nei pradiniai, junginiams. Jie yra skirstomi į dvi grupes:

tiesioginius ir netiesioginius antioksidantus. [53, 76] Gausiais moksliniais tyrimais, atliktais paskutiniais dešimtmečiais, buvo įrodyta, kad šviežiame ir natūraliame maiste esantys įvairūs antioksidantai gali sujungti LR ir kartu profilaktiškai apsaugoti nuo daugelio pavojingų ligų, pvz., onkologinių susirgimų, labai šiuo metu paplitusių CD ir aterosklerozės, reumatoidinio artrito, įvairių neurodegeneracinių sutrikimų. [80] Prie geriausiai žinomų antioksidantų priskiriami vitaminai E, C, karotenoidai. Taip pat priskiriami ir tam tikri fermentai: superoksido dismutazė, kofermentai: ubichinono dariniai (kofermentas Q10). Žinoma, kad gamtoje natūraliai randami flavonoidai taip pat turi reikšmingą antioksidantinį poveikį. Antioksidantai gali būti gaminami organizmo viduje ir gaunami iš išorės, pvz., su maistu ar maisto papildais. [58]

Antioksidantinis aktyvumas – tai BAM sugebėjimas sujungti LR, ir taip sustabdyti organizme esančių junginių oksidacinės degradacijos procesus. [58] Antioksidantinį aktyvumą gali apibūdinti suminis antioksidantinis aktyvumas. Suminis antioksidantinis aktyvumas yra sudėtinis rodiklis, kuris apima: 1) ROS/RNS generacijos slopinimą ir jų surišimo gebą; 2) redukcinę galią; 3) pereinamųjų metalų sujungimo gebą; 4) antioksidantinių fermentų aktyvinimą ir oksidacinių fermentų slopinimą. Šiuo metu atliekama daug mokslinių tyrimų antioksidantiniam poveikiui ištirti. Tam naudojamos įvairios antioksidantinių savybių turinčios medžiagos ir jų taikiniai bei modelinės *in vitro* sistemos, pritaikomi skirtingi reakcijų mechanizmai. [53]

F. ulmaria gali būti vartojama kaip maisto papildas dėl savo sudėties: ji turtinga vitaminais ir polifenoliniais junginiais. Šio augalo antioksidantinis ir priešuždegiminis poveikis ryškus ne tik dėl jo sudėtyje esančio vitamino C bei flavonoidų, kurie jau seniai žinomi kaip efektyvūs antioksidantai, bet ir dėl taninų bei kitų, kai kurių net iki šiol neidentifikuotų, junginių. [16]

Antioksidantinis aktyvumas įrodytas *in vitro* testais. [28] 2010 metais Portugalijoje buvo atliktas tyrimas, kuriuo buvo palyginamos *Cytisus multiflorus, Filipendula ulmaria ir Sambucus nigra* antioksidantinės savybės, įvertinant jas taikant cheminius, biocheminius ir elektrocheminius metodus *in vitro*. Nustatyta, kad būtent *F. ulmaria* turtingiausia antioksidantinių savybių turinčiomis medžiagomis: fenoliniais junginiais (228 mg galo rūgšties ekvivalentų/g sausos masės, flavonoidais (62 mg katechino ekvivalentų/g sausos masės), askorbo rūgštimi (2700 µg /g sausos masės) ir tokoferoliu (497 µg/g sausos masės). [**Error! Reference source not found.Error! Reference source not found.**] Koncentruoti liofilizuoti žolės ekstraktai (ekstrahuoti 80 proc. V/V metanolio vandeniniu tirpalu) parodė didelį antioksidantinį aktyvumą, (net 95 proc.), stabdant metilo linoleato autooksidacijos procesą [81]

Antioksidantinis pelkinių vingiorykščių ekstraktų aktyvumas taip pat buvo įvertintas ir chemiliuminescenciniu metodu. [82] Ekstraktai sėkmingai panaudoti kaip natūralūs margarino konservantai. [83] Viename antiradikalinio aktyvumo tyrime, kuriame buvo naudojama DPPH radikalų surišimo metodika, *F. ulmaria* ekstraktas savo antiradikaliniu aktyvumu pralenkė visus kitus tyrime naudotus 22 augalų (pvz., *A. absinthium, E.purpurea, U. dioica*) ekstraktus. [18]

2.4.2 Antimikrobinis aktyvumas

2.4.2.1 Tyrime naudotų mikroorganizmų šeimos

***Bacillaceae* šeima.** Šiai gramteigiamų streptobacilų šeimai priskiriama *Bacillus* gentis. Jai priklauso 48 bacilų rūšys. Tai sporas sudarančios, gamtoje plačiai paplitusios bakterijos. Pvz., *B.cereus* labai dažnai sukelia įvairias sveikatai pavojingas maisto intoksikacijas. Klinikiniai intoksikacijos simptomai panašūs į stafilokokinę infekciją. [84] *B. cereus* siejamos su dviem dėl maisto intoksikacijos kylančiais žarnyno sutrikimais – diarėjiniu (viduriavimą sukeliančiu) ir emetiniu (vėmimą sukeliančiu) apsinuodijimu. [85] Pacientams, turintiems silpnesnį imunitetą, šiai šeimai priskiriamos bakterijos gali sukelti sunkias oportunistines sistemines infekcijas (pvz., plaučių uždegimą, akies ir širdies raumens infekcijas). [84]

***Micrococcaceae* šeima.** Šiai šeimai priskiriama *Staphyloccocus* gentis, kuriai priklauso net 32 stafilokokų rūšys. Šių gramteigiamų bakterijų sukeliamos infekcijos:

1. Paviršinės odos ligos. Jos pasireiškia įvairiais nemaloniais simptomais: pūliavimu, vietine audinių nekroze, abscesais, pvz., folikulitu ir įvairiais odos pūliniais.
2. Įvairios giliosios ligos (pvz., plaučių uždegimas ar osteomielitas).
3. Ne pačių stafilokokų, o jų toksinų sukeliamos ligos (toksinio šoko sindromas, stafilokokų toksinų sukelta (stafilokokinė) maisto intoksikacija). [84]

***Enterobacteriaceae* šeima.** Gausiai *Enterobacteriaceae* šeimai priklauso gramteigiamos bakterijos. Dauguma iš jų priskiriamos normaliai žmogaus organizmo mikroflorai. Tačiau, susilpnėjus imunitetui, daugelis jų gali sukelti įvairias, net labai sunkias infekcines ligas: sepsį, žaizdų infekcijas, hospitalines infekcijas, įvairias šlapimo takų infekcijas. [84] Ypatingai atsparios antibiotikams yra *Klebsiella pneumoniae* ir *Serratia marcescens* bakterijų rūšys, lyginant su kitomis *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų rūšimis. [86]

***Streptococcaceae* šeima.** Šeimą sudaro 7 bakterijų gentys. Iš jų 6 genčių atstovai žmonėms yra potencialūs ligų sukėlėjai. Šiuo metu žinoma apie 12 enterokokų rūšių. Šiai grupei priklauso gramteigiami anaerobai. Pavyzdžiui, *Enterococcus faecalis* ne tik sukelia šlapimo takų ligas, bet ir itin sunkią infekcinę ligą – endokarditą. [84] Nors *E.faecalis* yra natūrali žarnyno mikrofloros dalis ir paprastai randama kiekvieno žmogaus žarnyne, tačiau pagal naujausias mokslinių tyrimų žinias, ši bakterija gali būti kenksminga. *E. faecelis* gali sukelti tokias uždegimines žarnyno ligas, kaip opinį kolitą ir Krono ligą. [87]

***Pseudomonaceae* šeima.** Visos pseudomonos priklauso *Pseudomonaceae* šeimai. Šiai šeimai priskiriama ir *Pseudomonas* gentis. *Pseudomonas aeruginosa* yra normalios žmogaus žarnyno

mikrofloros dalis (ji sudaro apie 10% visų mikrofloros bakterijų). Teigiama, kad būtent *P.aeruginosa* sukelia net apie 10 – 20 proc. visų hospitalinių infekcijų protrūkių. [84] *P. aeruginosa* sukelia įvairius susirgimus: dažniausiai šlapimo ir kvėpavimų sistemų, virškinimo trakto, kaulų ir sąnarių, minkštųjų audinių infekcijas. Kartais pasitaiko dermatito, bakteriemijos (bakterijų buvimo kraujyje), įvairių sisteminių infekcijų atvejų. *P. aeruginosa* hospitalines infekcijas ypač dažnai sukelia pacientams, sergantiems onkologinėmis ligomis, AIDS, cistine fibroze, taip pat patyrusiems sunkius nudegimus. [88]

Grybeliai. Grybeliai yra eukariotiniai, vienaląsčiai arba daugialąsčiai mikroorganizmai. Jie turi vieną ar keletą branduolių. Grybelių aplinkoje yra labai daug. Dauguma jų – laisvai gyvenantys saprofitai. Ne visi grybeliai yra ligų sukėlėjai: tik tam tikros jų rūšys yra patogeniškos arba iš dalies patogeniškos žmogaus organizmui (oportunistinės grybelių rūšys).

Candida albicans – gausiai aplinkoje paplitęs grybelis, dažnai sukeliantis įvairius susirgimus. Jis gali sukelti vietines infekcijas (pvz., stomatitą, kolitą, cistitą, proktitą) bei išplitusias infekcijas (pvz., sistemines kandidomikozes, inkstų, plaučių ir kepenų kandidozes). [84] Dažniausia *C. albicans* sukeliama odos ir nagų infekcija yra odos ir nagų kandidozė. [89]

2.4.2.2 Žinomas pelkinių vingiorykščių antimikrobinis aktyvumas

Bakteriostatinis aktyvumas *in vitro* testais įrodytas prieš *S. aureus, S. epidermidis, E. coli, P. vulgaris, P. aeruginosa, B.subtilis, K. pneumonia* ir kai kurias kitas bakterijų rūšis. [3, 28, 90]

2012 metais Portugalijoje buvo tirtas *F. ulmaria* priešgrybelinis poveikis prieš *Candida* rūšis (*C. albicans , C. glabrata, C. parapsilosis ir C. tropicalis* ir palygintas su *Castanea sativa* bei *Rosa micrantha* poveikiais. Padaryta išvada, kad daugiausiai fenolinių junginių kaupia *C. sativa*, tačiau *F. ulmaria* pirmauja fenolinių rūgščių bei flavonoidų kiekiu. Minimalios inhibuojančios koncentracijos (MIC) prieš *C. albicans, C. glabrata, C. paraphilosis* sutampa (atitinkamai 0.625, <0.05, <0.05 mg/ml), tačiau *F. ulmaria* pirmauja savo MIC prieš *C. tropicalis* – ji mažesnė net 4 kartais, nei *C. sativa* (atitinkamai 0,625 ir 0,155 mg/ml). [91]

3. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

3.1 Tyrimo objektas

Tyrimo objektas – natūraliai augančių pelkinių vingiorykščių (*Filipendula ulmaria* L.) žolė, surinkta 2012 metais. Vaistinio augalo žolė rinkta beveik pusę metų – nuo balandžio 29 dienos iki spalio 24 dienos. Cheminės sudėties dinamikos kitimo tyrimams naudoti pavyzdžiai, surinkti iš gamtinių

cenopopuliacijų, esančių Agurkiškių kaime (Kazlų Rūdos savivaldybė, Marijampolės apskritis). Surinkta vaistinė augalinė žaliava džiovinta gerai vėdinamoje patalpoje, sausoje ir nuo tiesioginių saulės spindulių apsaugotoje vietoje. Kiekvienas mėginys supakuotas į popierių ir laikytas sausai bei tamsiai. Vaistinės augalinės žaliavos mėginių duomenys (eilės numeris pagal surinkimo datą, augalo vegetacijos tarpsnis) pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. Vaistinės augalinės žaliavos rinkimo duomenys.

Eilės nr. ir surinkimo data	***Augalo vystymasis (vegetacijos tarpsnis)***
1. 2012.04.29	Vaistinis augalas vystosi
2. 2012.05.06	Vaistinis augalas vystosi
3. 2012.05.14	Vaistinis augalas mezga pumpurus
4. 2012.05.20	Vaistinis augalas mezga pumpurus
5. 2012.05.27	Vaistinis augalas žydi pavieniais žiedais
6. 2012.06.03	Vaistinis augalas žydi pavieniais žiedais
7. 2012.06.09	Vaistinis augalas žydi pavieniais žiedais
8. 2012.06.17	Vaistinis augalas žydi pavieniais žiedais
9. 2012.06.28	Vaistinis augalas žydi pavieniais žiedais
10. 2012.07.06	Vaistinio augalo masinis žydėjimas
11. 2012.07.14	Vaistinio augalo masinis žydėjimas
12. 2012.07.21	Yra pavienių žydinčių žiedų
13. 2012.07.28	Yra pavienių žydinčių žiedų
14. 2012.08.05	Yra pavienių žydinčių žiedų
15. 2012.08.12	Yra pavienių žydinčių žiedų
16. 2012.08.19	Yra pavienių žydinčių žiedų, besiformuojančių vaisių

17. 2012.08.26	Yra besiformuojančių ir susiformavusių vaisių
18. 2012.09.03	Dauguma vaistinio augalo vaisių susiformavę
19. 2012.09.11	Dauguma vaistinio augalo vaisių susiformavę
20. 2012.09.19	Vaistinis augalas pakeitęs spalvą
21. 2012.09.27	Vaistinis augalas pakeitęs spalvą
22. 2012.10.03	Vaistinis augalas pakeitęs spalvą, apnykęs
23. 2012.10.10	Vaistinis augalas apnykęs
24. 2012.10.17	Vaistinis augalas apnykęs
25. 2012.10.24	Vaistinis augalas apnykęs

3.2 Tyrimo metodai

3.2.1 Naudoti reagentai, medžiagos ir mikroorganizmai

1. Aliuminio chloridas („Mecobenzon“, Danija);
2. Heksametiltetraminas („Sigma-Aldrich”, Anglija)
3. 30 proc. acto rūgšties tirpalas(„Sigma-Aldrich”, Anglija);
4. Rektifikuotas etilo alkoholis, 96,3 proc. V/V („Stumbras“, Lietuva)
5. Rutinas („Carl Roth GmbH, 76185, Vokietija)
6. Indigosulfonrūgšties tirpalas („Fluka“, Šveicarija);
7. Kalio permanganato 0,02 M tirpalas; („Fluka“, Šveicarija);
8. Praskiesta vandenilio chlorido rūgštis („Sigma – Aldrich”, Kanada);
9. 2,6 – dichlorfenolindofenoliato 0,001 M tirpalas („SIAL“, Kanada);
10. Mueller – Hinton‘o II agaras („BBL”, JAV);
11. Mikrobiologinės kultūros (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Candida albicans*);
12. ABTS reagentas („Sigma – Aldrich”, Kanada);
13. Kalio persulfatas („SIAL“, Kanada).

3.2.2 Naudota aparatūra ir priemonės

1. Analitinės svarstyklės („Sartorius CP6M-0CE", Vokietija);
2. Mikropipetės („Eppendorf Research", JAV);
3. Popieriniai filtrai („ODR – 9303", Vokietija);
4. Ultragarsinė vonelė („ Bandelin electronic DK 255p", U=230V, V=50-60Hz, I=2A, Vokietija);
5. Vakuuminė pompa („Dry vacuum pump/compressor", Welch, 2511C – 02, 230V, 50Hz, 6A, , JAV);
6. Spektrofotometras („Beckman DU – 70", 4273041, „Beckman Instruments", JAV);
7. Mechaninė purtyklė („Laboratory shaker 358S", Lenkija);
8. Termostatinė vonelė(„Lauda", Vokietija);
9. Elektrinis malūnėlis (Coffee grinder, "First", Austrija);
10. Drumstumo nustatymo aparatas ir mėgintuvėlių purtyklė („Eppendeorf Reasearch AG", Vokietija).

3.2.3 Nuodžiūvio nustatymas vaistinėje augalinėje žaliavoje

Analizei skirtas vaistinės augalinės žaliavos mėginys susmulkinamas elektriniu malūnėliu. Džiovinimo spintoje iki pastovios masės išdžiovinami ir pasveriami biuksai. Juose sveriama po tris augalinės žaliavos svėrinius (2 ± 0,01 g). Tada vaistinė augalinė žaliava džiovinama 100 – 105 °C temperatūroje iki pastovios, t.y. daugiau nebekintančios, masės. Džiovinimo pradžia – tai laikas, kai temperatūra džiovinimo spintoje pasiekia 100 – 105 °C ir tampa pastovi. Pirmą kartą augalinės žaliavos mėginys sveriamas po 2 val džiovinimo. Tada, kai dviejų paskutinių svėrimų rezultatai, praėjus 30 min. po džiovinimo spintoje ir dar 30 min. po vėsinimo eksikatoriuje, tarpusavyje skiriasi ne daugiau kaip ± 0,001 g, nustatoma pastovioji masė.

Vaistinės augalinės žaliavos nuodžiūvis (proc.) apskaičiuojamas, remiantis formule:

$$\frac{m1 - m2}{m0} \times 100$$

čia: m_1 - žaliavos masė (g) prieš džiovinimą;

m_2 – žaliavos masė (g) po džiovinimo.

Galutinis rezultatas apskaičiuojamas surandant trijų svėrimų rezultatų aritmetinį vidurkį, kuris įvertinamas dešimtųjų procento dalių tikslumu. Nuokrypis tarp vienu metu atliekamų vaistinės augalinės žaliavos nuodžiūvio tyrimų negali būti didesnis kaip ± 0,5 proc. [92]

3.2.4 Ekstraktų ruošimo metodika

Gaminami etanoliniai ekstraktai iš kiekvieno vaistinės augalinės žaliavos mėginio santykiu 1:10. Atsveriama po 2 g (±0,01) kiekvienos iki gelsvai žalsvų miltelių elektriniu malūnėliu sumaltos vaistinės augalinės žaliavos, užpilama 20 ml (±0,01) 70 proc. V/V etanoliu. Atsargiai suplakama, kad ekstrahentas gerai pasiskirstytų tarp vaistinės augalinės žaliavos miltelių dalelių. Ekstrahuojama ultragarsu 10 min užkimštuose rudo stiklo buteliukuose. Temperatūra – kambario, ultragarsinės vonelės galia – 10 x 10 proc.

Gauti ekstraktai nufiltruojami per distiliuotu vandeniu sudrėkintą popierinį filtrą, naudojant vakuuminę pompą. Tada išpilstomi į švarius tamsaus stiklo buteliukus, sandariai užkemšami ir laikomi tamsioje vietoje kambario temperatūroje.

Iš kiekvieno vaistinės augalinės žaliavos mėginio pagaminama po tris etanolinius ekstraktus tokiomis pačiomis sąlygomis tuo tikslu, kad būtų atliekami trys pakartojimai ir tuo pačiu gaunamas didesnis patikimumas.

3.2.5 Suminio flavonoidų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

Suminis flavonoidų kiekis nustatomas ekstraktą veikiant aliuminio chlorido tirpalu parūgštintoje terpėje. Terpė rūgštinama acto rūgštimi. Suminis flavonoidų kiekis įvertinamas pagal rutiną, palyginus jo etanolinio tirpalo absorbcijos koeficientą su vaistinės augalinės žaliavos ekstraktų absorbcijos koeficientais.

Tiriamasis tirpalas ruošiamas taip: į 25 ml matavimo kolbutę, naudojant mikropipetes, įpilama 0,2 ml paruoštos vaistinės augalinės žaliavos ištraukos (pelkinių vingiorykščių etanolinio ekstrakto), 2 ml 96 proc. V/V etanolio, 0,1 ml 30 proc. acto rūgšties tirpalo, 0,3 ml 10 proc. aliuminio chlorido tirpalo, 0,4 ml 5 proc. heksametilentetramino tirpalo. Kolbutėje esantis mišinys skiedžiamas išgrynintu vandeniu iki žymės, tada turinys sumaišomas. Praėjus 30 min. matuojamas 10 mm tirpalo sluoksnio absorbcijos dydis ir lyginamas su palyginamuoju tirpalu esant bangos ilgiui 407 nm.

Palyginamasis tirpalas ruošiamas taip: į 25 ml matavimo kolbutę, naudojant mikropipetes, įpilama 0,2 ml paruoštos vaistinės augalinės žaliavos ištraukos (pelkinių vingiorykščių etanolinio

ekstrakto), 2 ml 96 proc. V/V etanolio, 0,1 ml 30 proc. acto rūgšties tirpalo. Kolbutėje esantis turinys praskiedžiamas išgrynintuoju vandeniu iki 25 ml nurodančios žymės.

Identiškomis sąlygomis paruošiami ir etaloninio rutino tirpalo tiriamasis ir palyginamasis tirpalai, tačiau vietoje 0,2 ml paruoštos vaistinės augalinės žaliavos ištraukos (pelkinių vingiorykščių etanolinio ekstrakto), pilama 0,2 ml etaloninio rutino tirpalo. Etaloninis rutino tirpalas ruošiamas taip: 0,0125 g rutino (tikslus svėrinys) tirpinama 70 proc. V/V etanolyje 25 ml talpos matavimo kolbutėje.

Suminis flavonoidų kiekis vaistinės augalinės žaliavos, perskaičiuotas rutinu ir išreikštas procentais (X), paskaičiuotas naudojantis formule:

$$\boldsymbol{X = \frac{m(r) \times V(va\check{z}) \times A\,(va\check{z}) \times 100}{m\,(va\check{z}) \times A(r) \times 25}}$$

čia: ***m(r)*** – rutino standarto masė gramais, sunaudota etaloniniam rutino tirpalui ruošti.

V(važ) – visas paruoštos vaistinės augalinės žaliavos tūris mililitrais (priklauso nuo ekstrakcijos sąlygų).

A(važ) – paruoštos vaistinės augalinės žaliavos tiriamojo tirpalo absorbcijos dydis.

m(važ) – vaistinės augalinės žaliavos masė gramais, sunaudota ištraukai ruoši.

A(r) – etaloninio rutino tirpalo absorbcijos dydis. [67]

3.2.6 Askorbo rūgšties kiekio nustatymas titrimetriniu metodu

Vaistinės augalinė žaliava susmulkinama elektriniu malūnėliu. 5 g tokios vaistinės augalinės žaliavos užpilama 50 ml distiliuoto vandens kūginėje kolboje. Gautas mišinys paliekamas stovėti 10 min. Vėliau jis sumaišomas ir filtruojamas. Į kitą 50 ml talpos kūginę kolbą mikropipetėmis įpilama 1 ml praskiestos vandenilio chlorido rūgšties, 1 ml šviežiai gautos ir nufiltruotos vaistinės augalinės žaliavos ištraukos ir 13 ml distiliuoto vandens. Gautas tirpalas titruojamas iš mikropipetės natrio 2,6 – dichlorfenolindofenoliato 0,001 M tirpalu iki blyškios rožinės spalvos, kuri turi neišnykti bent 10 sekundžių.

1 ml natrio 2,6 – dichlorfenolindofenoliato 0,001 M tirpalo atitinka 0,000088 g askorbo rūgšties.

Askorbo rūgšties kiekis procentais (X) absoliučiai sausai vaistinei augalinei žaliavai apskaičiuotas naudojantis formule:

$$X = \frac{V \times 0,000088 \times V1 \times 100 \times 100}{m \times V2 \times (100 - W)}$$

čia*:* ***V*** – titravimui sunaudotas natrio 2,6 – dichlorfenolindofenoliato 0,001 M tirpalo kiekis ml,

V1 – ištraukos tūris ml,

m – VAŽ masė g,

V2 – ištraukos, paimtos titravimui, tūris ml.

W – žaliavos drėgmės kiekis proc. [92]

3.2.7 Suminio raugų kiekio nustatymas titrimetriniu metodu

Suminiam raugų kiekiui nustatyti taikomas farmakopėjinis metodas.

Atsveriama 2 g susmulkintos vaistinės augalinės žaliavos ir 500 ml talpos kūginėje kolboje užpilama 250 ml distiliuoto verdančio vandens. Toks mišinys virinamas 30 min vandens vonelėje su grįžtamuoju kondensatoriumi, tam, kad nesumažėtų vandens kiekis ekstrakte. Virinant mišinys dažnai pamaišomas. Po 30 min. virinimo vandens vonelėje ekstraktas atvėsinamas iki kambario temperatūros. Apie 100 ml gautos vaistinės augalinės žaliavos ištraukos nukošiama per vatą į 200 ml talpos kūginę kolbą atidžiai saugant, kad į nukoštą ekstraktą nepatektų vaistinės augalinės žaliavos dalelių. Po to į 750 ml talpos kūginę kolbą įpilama 25 ml gautos vaistinės augalinės žaliavos ištraukos, 500 ml distiliuoto vandens ir 25 ml indigosulfonrūgšties tirpalo. Mišinys titruojamas šviežiai laboratorijoje pagamintu kalio permanganato 0,02 M tirpalu nuolat maišant iki tol, kol atsiranda geltona spalva. Ji palyginama su tuščiojo mėginio, atliekamo kartu, tirpalo spalva.

1 ml 0,02 M kalio permanganato tirpalo atitinka 0,004157 g raugų (perskaičiuotų į taniną).

Visiškai sausos vaistinės augalinės žaliavos raugų kiekis procentais apskaičiuojamas naudojant formulę:

$$X = \frac{(V - V1) \times 0,004157 \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 25\,(100 - W)} = \frac{(V - V1) \times 415,7}{m \times (100 - W)}$$

čia: ***V*** – tiriamosios žaliavos ištraukai titruoti sunaudotas kalio permanganato 0,02 M tirpalo tūris ml;

V1 – tuščiajam mėginiui titruoti sunaudotas kalio permanganato 0,02 M tirpalo tūris ml;

m – žaliavos masė g;

W – žaliavos drėgmė proc.

Reagentai: laboratorijoje prieš suminio raugų kiekio tyrimą pagaminamas indigosulfonrūgšties tirpalas. 1,0 g indigokarmino ištirpinama 25 ml sulfato rūgšties, ištirpinus įpilama dar 25 ml sulfato rūgšties ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 110 ml. [67]

3.2.8 Antimikrobinio poveikio nustatymas

Pirmiausiai paruošiami vandeninis ir etanolinis vaistinės augalinės žaliavos tirštieji ekstraktai Vandeninis tirštasis ekstraktas gaunamas panašiai, kaip raugų kiekybiniam nustatymui ruoštas ekstraktas, tačiau santykiu 1:10. 5 g (±0,01) vaistinės augalinės žaliavos kūginėje kolbutėje užpilama 50 ml karšto distiliuoto vandens. Kaitinanama vandens vonelėje kartu su grįžtamuoju šaldytuvu 30 min. Tada ekstraktas nufiltruojamas per stiklo filtrą, naudojant vakuuminę pompą, perkeliamas į švarią porcelianinę lėkštelę ir atsargiai garinamas virš vandens vonelės, kol gaunami tamsiai rudos spalvos tirštieji ekstraktai.

Etanolinis tirštasis ekstraktas gaunamas panašiai, kaip flavonoidų kiekybiniam nustatymui ruoštas ekstraktas. 5 g (±0,01) susmulkintos vaistinės augalinės žaliavos užpilama 50 ml 70 proc. etanolio V/V ir ekstrahuojama ultragarsinėje vonelėje 10 min. Tada ekstraktas filtruojamas pro stiklinį filtrą, naudojant vakuuminę pompą. Nufiltruotas ekstraktas perkeliamas į porceliano lėkštelę ir taip pat atsargiai garinamas virš vandens vonelės, kol išgaruoja etanolis ir gaunami tamsiai žalios spalvos tirštieji ekstraktai.

Paruošiamos 9 mikroorganizmų suspensijos. Į specialius mikromėgintuvėlius įpilama po 5 ml sterilaus fiziologinio tirpalo. Sterilia kilpele dedama mikroorganizmų, kurie 24 val. buvo kultivuoti triptozės sojos agare, palaikant 37 °C temperatūrą. Gautos 9 mikroorganizmų suspensijos kruopščiai suplakamos, panaudojant specialią mėgintuvėlių maišyklę. Reikia pagaminti tokias mikroorganizmų suspensijas, kurių drumstumo standartas pagal Makfarlandą (angl. *McFarland*) būtų ~0,5.

Petri lėkštelės ruošiamos taip: Miulerio – Hintono (angl. *Mueller – Hinton*) II agaras maždaug 30 min šildomas sandariai uždarytoje stiklinėje kolboje, pamerktoje vandens vonelėje. Atsargiai šildoma tol, kol agaras išsilydo iki vientisos skystos rusvos spalvos masės. Skystas agaras patalpinamas į termostatą tam, kad būtų išlaikoma taki konsistencija. Vandeninis ir etanolinis vaistinės augalinės žaliavos tirštieji ekstraktai disperguojami purtant steriliame vandenyje santykiu 1:10. Petri lėkštelės, skirtos antimikrobiniam poveikiui įvertinti, tolygiai išliejamos agaro ir tirštųjų ekstraktų mišiniais, taip, kad vandeninio arba etanolinio tirštojo ekstrakto koncentracija agare būtų 10 mg/ml, 8 mg/ml, 6 mg/ml, 4 mg/ml ir 2 mg/ml. Paruošiama ir kontrolinė Petri lėkštelė vien tik su agaru, t.y. be vandeninių ir etanolinių tirštųjų ekstraktų. Petri lėkštelės palaikomos kambario temperatūroje, kol jose esantis agaro sluoksnis sustingsta, o tada perkeliamos į termokamerą ir laikomos, kol apdžiūsta agaro paviršius tam,

kad jis taptų tvirtesnis. Paruoštos mikroorganizmų kultūrų suspensijos sėjamos sterilia kilpele į visas Petri lėkšteles (po devynias mikroorganizmų kultūras į kiekvieną Petri lėkštelę su skirtinga etanolinių arba vandeninių tirštųjų ekstraktų koncentracija). Tuomet pasėliai 20 val. inkubuojami termokameroje, kurioje palaikoma nuolatinė 37 °C temperatūra ir lyginami su kontroline Petri lėkštele, inkubuota tokiomis pačiomis sąlygomis.

Vandeninių ir etanolinių tirštųjų ekstraktų poveikis vertinamas +/- sistema:

- **„+++"** – mikroorganizmų kultūrų kolonijų augimas toks pats, kaip ir kontrolinėje Petri lėkštelėje;
- **„++"** – mikroorganizmų kultūrų kolonijų augimas maždaug dvigubai mažesnis, nei kontrolinėje Petri lėkštelėje;
- **„+"** - matomos tik pavienės mikroorganizmų kultūrų kolonijos;
- **„-"** - mikroorganizmų kultūrų kolonijos neauga.

3.2.9 Laisvųjų radikalų surišimo nustatymas ABTS metodu

Antiradikaliniam aktyvumo įvertinimui taikomas 2,2'-azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sulfono rūgšties radikalo (ABTS) sujungimo metodas. ABTS radikalas – tai katijonas (ABTS•+). Jis yra stabilus radikalas. Šis spalvotas, ilgai gyvuojantis katijonas regimosios šviesos spektre turi net keturis absorbcijos maksimumus (ties 415, 650, 734 ir 815 nm bangos ilgiais). ABTS•+ susidaro kalio persulfatu oksiduojant ABTS reagentą ir pats veikia kaip antioksidantas (vandenilio radikalo donoras). [93, 94]

Antiradikalinio poveikio įvertinimui taikoma spektrofotometrinio tyrimo metodika. Pirmiausiai pagaminamas 2nM motininis ABTS tirpalas: atsveriama 0,0548 g (tikslus kiekis). ABTS reagentas ištirpinamas 50 ml distiliuoto vandens tamsaus stiklo buteliuke (kad mišinys būtų apsaugotas nuo šviesos poveikio). Kai ABTS reagentas ištirpsta, į tirpalą įdedama 0,0095 g (tikslus kiekis) kalio persulfato. Gautas mišinys kruopščiai sumaišomas ir paliekamas tamsioje sausoje vietoje 16 val. Būtent taip pasigamina ABTS•+, su kuriais reaguoja pagamintuose vaistinės augalinės žaliavos ekstraktuose esančios įvairios BAM, pasižyminčios antiradikaliniu aktyvumu.

Gautas radikalinis ABTS tirpalas atsargiai skiedžiamas distiliuotu vandeniu tol, kol gaunama reikalinga tirpalo absorbcija (0,8±0,03), esant 734 nm bangos ilgiui. Matuojamas mėginių antiradikalinis aktyvumas: į 3,0 ml ABTS•+ tirpalo įpilama 30 µl tiriamojo mėginio tirpalo (iš pelkinių vingiorykščių skirtingu metu surinktos vaistinės augalinės žaliavos pagaminto etanolinio ekstrakto). Nustatomas mišinio absorbcijos kitimas „Beckman DU – 70" spektrofotometru (kai bangos ilgis yra 734 nm). Laukiama, kol visiškai pasiekiama reakcijos pusiausvyra (absorbsijos skaitinė reikšmė nebekinta).

Laisvųjų radikalų surišimo geba (antiradikalinis ekstraktų aktyvumas) įvertinama ABTS inaktyvinimo procentais ir apskaičiuojama naudojant formulę:

$$ABTS_{inakt} = \frac{A_b - A_a}{A_b} \cdot 100,$$

čia: A_b – tuščiojo mėginio absorbcija (reakcijos t=0 min);

A_a – bandinio su tiriamuoju mėginiu (etanoliniu vaistinės augalinės žaliavos ekstraktu) absorbcija (reakcijos t=15 min) [93].

3.2.10 Statistiniai analizės metodai, naudoti duomenų apdorojimui

Statistinių duomenų apdorojimui yra naudojami specialūs kompiuteriniai taikomųjų programų paketai.

Šių tyrimų rezultatatams apdoroti naudota Excel (versija 12) programa, įtraukta į Office 2007. Microsoft Office Excel (dažnai vadinama tiesiog Microsoft Excel) – Microsoft Office programų paketo specializuota elektroninė skaičiuoklė, kuriama ir platinama „Microsoft“ (JAV) kompanijos. Jos pagalba susisteminti duomenys, apskaičiuoti vidurkiai, standartiniai nuokrypiai, paklaidos bei nubraižyti grafikai, įvertintas statistinis duomenų reikšmingumas.

4. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1 Vaistinės augalinės žaliavos nuodžiūvis

Vaistinės augalinės žaliavos nuodžiūvis nustatytas naudojant 2.2.3 skyriuje aprašytą metodiką. Vaistinės augalinės žaliavos rinkimo data ir vidutinė nuodžiūvo reikšmė nurodyta 3 lentelėje.

3 lentelė. Pelkinių vingiorykščių žolės nuodžiūvo įvairavimas tirtuose mėginiuose ($p < 0,05$)

Eilės nr.	Surinkimo data	Nuodžiūvis (proc.) su VSN
1	2012.04.29	**5,7 ± 0,3**
2	2012.05.06	**6,0 ± 0,2**
3	2012.05.14	**5,7 ± 0,4**

4	2012.05.20	**5,7 ± 0,5**
5	2012.05.27	**5,9 ± 0,3**
6	2012.06.03	**5,2 ± 0,0**
7	2012.06.09	**6,1 ± 0,2**
8	2012.06.17	**6,3 ± 0,2**
9	2012.06.28	**5,9 ± 0,1**
10	2012.07.06	**6,2 ± 0,1**
11	2012.07.14	**6,3 ± 0,2**
12	2012.07.21	**6,0 ± 0,0**
13	2012.07.28	**6,4 ± 0,3**
14	2012.08.05	**6,1 ± 0,2**
15	2012.08.12	**5,9 ± 0,1**
16	2012.08.19	**5,8 ± 0,2**
17	2012.08.26	**6,1 ± 0,0**
18	2012.09.03	**6,3 ± 0,1**
19	2012.09.11	**5,2 ± 0,3**
20	2012.09.19	**6,5 ± 0,4**
21	2012.09.27	**5,0 ± 0,0**
22	2012.10.03	**6,4 ± 0,4**
23	2012.10.10	**6,2 ± 0,1**
24	2012.10.17	**6,6 ± 0,4**
25	2012.10.24	**6,7 ± 0,4**

Lentelėje pateikti rezultatai rodo, kad *F. ulmaria* žolės nuodžiūvis svyruoja tarp 5,0 ir 7,1 proc. Pagal EP reikalavimus, taikant *Ph. Eur*. 2.2.23 nuodžiūvio testą, vaistinės augalinės žaliavos nuodžiūvis negali būti didesnis nei 12,0 proc. Vadinasi, tyrimui surinkta vaistinė augalinė žaliavA atitinka nuodžiūviui taikomus reikalavimus, keliamus EP. Be to, nei vieno vaistinės augalinės žaliavos mėginio nuodžiūvo skaitinės reikšmės nesvyravo daugiau nei 0,5 proc. (VSN $\leq$ 0,4 proc.)

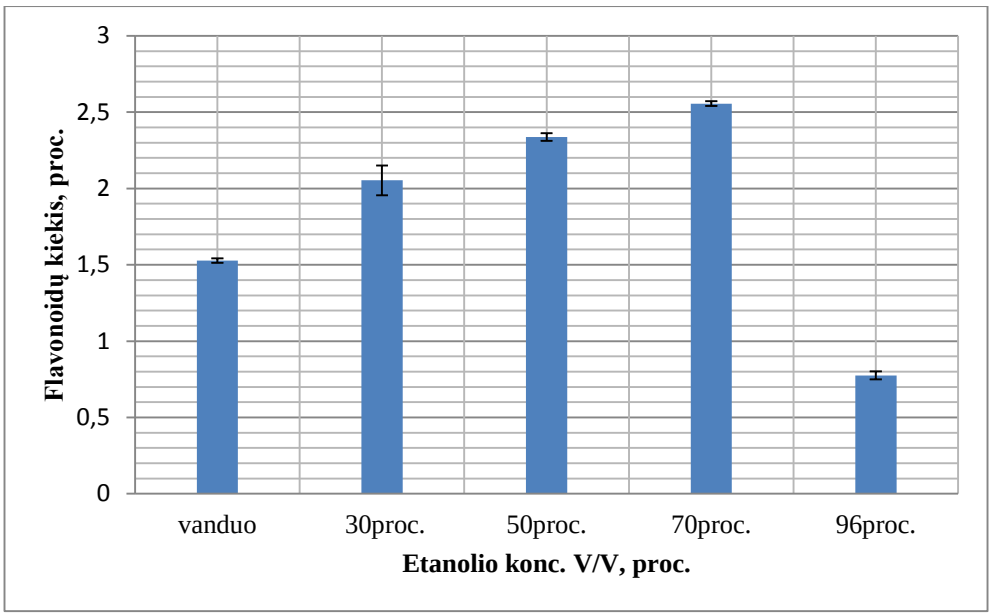
4.2 Ekstrakcijos metodo optimizavimas

Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas yra svarbus tyrimo žingsnis siekiant gauti optimalią vaistinės augalinės žaliavos veikliųjų junginių išeigą.

Vaistinė augalinė žaliava, sudaryta iš visų surinktų mėginių, elektriniu malūnėliu susmulkinama iki birių, kvapnių, gelsvai žalsvų miltelių.

Pirmiausiai atliekamas optimalaus poliškumo tirpiklio parinkimas. Flavonoidų ekstrakcijai dažniausiai naudojama skysčių ekstrakcija metanoliu ar etanoliu: flavonoidų glikozidai ir poliški aglikonai ekstrahuojami alkoholiais bei alkoholių ir vandens mišiniais. [95] Taigi, gaminant vaistinio augalo preparatus, flavonoidai dažniausiai ekstrahuojami įvairių koncentracijų vandens ir etanolio mišiniais, todėl reikalingo tirpiklio poliškumo nustatymui pasirenkami tokie tirpikliai: distiliuotas vanduo, 30 proc., 50 proc., 70 proc. ir 96 proc. V/V etanolio ir vandens mišiniai.

Ekstraktų gamyba: atsveriama po 2 g (±0,01) iš skirtingu metu rinktų mėginių mišinio sudarytos susmulkintos vaistinės augalinės žaliavos užpilama 20 ml vandens arba vandeniniais etanolio tirpalais (30 proc., 50proc., 70 proc., 96 proc.) kūginėse kolbutėse, kurios užkemšamos. Šios kolbutės kratomos specialioje laboratorinėje purtyklėje 1 valandą kambario temperatūroje. Ekstrakcijos būdo efektyvumas vertinamas pagal suminį flavonoidų kiekį, nustatytą kiekviename ekstrakte spektrofometriniu metodu (metodika aprašyta 3.2.5 skyriuje). Rezultatai, gauti atlikus tris pakartojimus, pateikiami 3 paveiksle.



3 pav. Flavonoidų ekstrakcijos išeigos priklausomybė nuo etanolio koncentracijos ($p < 0,05$)

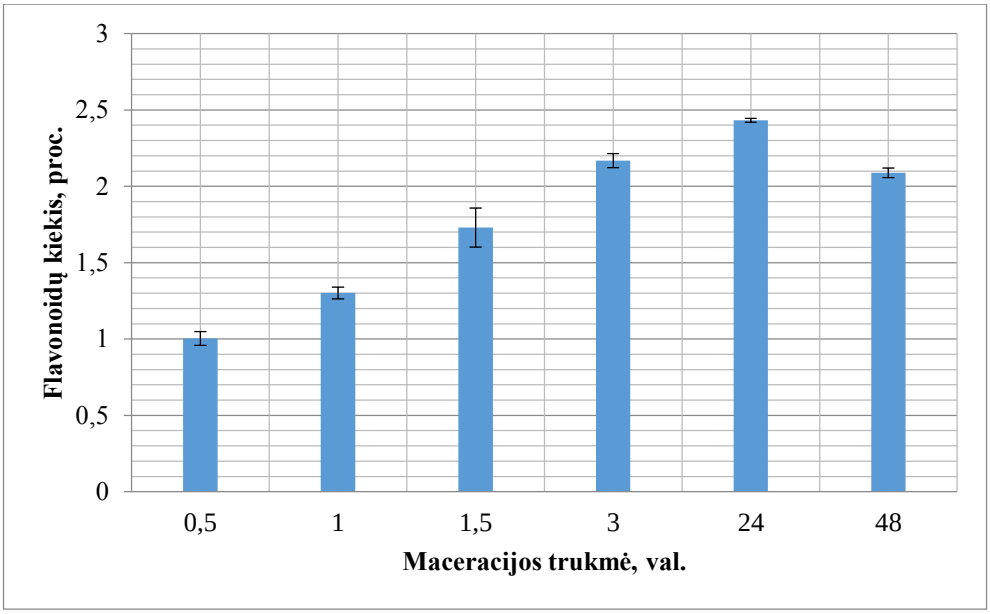
Tyrimų rezultatai atskleidė, kad 70 proc. etanoliu buvo ekstrahuota daugiau nei 2,5 proc. flavonoidų, tuo tarpu grynu distiliuotu vandeniu ekstahuotos vaistinės augalinės žaliavos išeiga siekė tik 1,5 proc. flavonoidų. 96 proc. etanolis, kaip ekstrahentas, pats neefektyviausias – naudojant jį buvo nustatytas tik 0,7 proc. siekiantis suminis flavonoidų kiekis. Statistinis skirtumas tarp vandeniu ir 70 proc etanoliu ekstrahuoto suminio flavonoidų kiekio yra pats reikšmingiausias ($p < 0,05$). Vadinasi, BAM ekstrahavimui tinkamiausi yra vandens ir etanolio mišiniai, bet ne grynas vanduo ir 96 proc. etanolis. 70 proc. etanolio, kaip ekstrahento, tinkamumą nurodo ir kai kurie autoriai, pvz., 70 proc. etanolinis pelkinių vingiorykščių ekstraktas reikšminai slopino toksinį anglies tetrachlorido poveikį, pagal tam tikrus požymius pranokdamas vaistinį preparatą „Carsil“. [14] Toks pelkinių vingiorykščių antžeminių dalių ekstraktas padėjo normalizuoti kepenų fermentų aktyvumą ir lipidų peroksidacijos procesus. Tai rodo, kad naudojant būtent tokią etanolio koncentraciją buvo išekstrahuota daugiausiai antioksidantinių savybių turinčių medžiagų iš antžeminių vaistinio augalo dalių, kurios ir sukėlė tokį reikšmingą antioksidantinį poveikį. Įrodyta, kad būtent 70 proc. etanoliniai *F. ulmaria* ekstraktai savo sudėtyje turi daugiausiai biologiškai aktyvių sudedamųjų dalių, atsakingų už biologinį poveikį: kvercetinas ir jo glikozidai, dihidrokvercetinas, apigeninas, rododendrolis, eskuletinas bei salicilo, chlorogeno, galo, kavos rūgštys. [96] Būtent 70 proc. etanoliu išskirtų medžiagų (kvercetino, izokvercetino, spireozido ir rutino) ir galo rūgšties butanolinė frakcija pasižymėjo labai ryškiomis nootropinėmis, antiamnestinėmis, antioksidantinėmis ir adaptogeninėmis savybėmis [97]. Be to, FP nurodoma, kad motininei *F. ulmaria* žiedų tinktūrai gaminti tinkamiausias panašios koncentracijos etanolis (65 proc. V/V), o pagamintoje motininėje tinktūroje etanolio kiekis turi būti nuo 60 iki 70 proc. V/V. [13] Todėl, remiantis optimalaus tirpiklio poliškumo statistiniu reikšmingumu ir literatūros duomenimis, vaistinės augalinės žaliavos ekstraktų gamybai pasirenkamas 70 proc. V/V etanolis.

Nustačius, kad tinkamiausias ekstrahentas yra 70 proc. etanolis, toliau ieškoma tinkamiausio ekstrakcijos metodo.

Ruošiant vaistinės augalinės žaliavos mėginius fitocheminei analizei gali būti taikomi įvairūs ekstrakcijos metodai. Ekstrakcijai iš kietų mėginių plačiai taikoma daug skirtingų būdų. Mechaninė ekstrakcija tirpikliais (pvz., maceracija purtyklėje), Soksleto ekstrakcija, ekstrakcija ultragarsu (ultragarsinėje vonelėje) yra laikomi klasikiniais ekstrakcijos metodais, skirtais kietiems mėginiams (šiuo atveju pelkinių vingiorykščių vaistinei augalinei žaliavai) ekstrahuoti. Šiems metodams nereikia sudėtingos ir brangios aparatūros, jie gana paprastai ir greitai atliekami. Išimtis yra Soksleto ekstrakcija, kuri gali trukti daug ilgiau, nei, pavyzdžiui, ekstrakcija ultragarso vonelėje – net iki 48 valandų. Patiems paprasčiausiems ekstrakcijoms metodams priskiriamas mechaninis mėginio ir tirpiklio mišinio purtymas (maceracija purtyklėje). Ypatingai svarbu, kad analitė (ekstrahuojamoji medžiaga) labai gerai tirptų tirpiklyje (ekstrahente), o tirpiklį būtų nesudėtinga atskirti nuo kietosios matricos, naudojant filtravimą ar centrifugavimą. Pagrindinis privalumas yra atlikimo paprastumas, pagrindinis trūkumas – mechaninis purtymas yra mažiausiai efektyvus metodas, palyginus jį su kitais ekstrakcijos iš kietųjų matricų metodais. Daug didesniu efektyvumu pasižymi ekstrakcija ultragarsu. Dėl ultragarso poveikio tirpalas silpnai įšyla, todėl ekstrakcija greitėja. Už maceraciją purtyklėje ir ekstrakciją ultragarsu dar efektyvesnė yra Soksleto ekstrakcija. [98] Tačiau, kaip minėta anksčiau, ekstrakcija Soksleto aparatu yra labai ilgai trunkantis procesas ir tai apsunkina jo pritaikymą rutininei fitocheminei analizei.

Todėl pasirinkti du veikliųjų medžiagų ekstrakcijos metodai – maceracija purtyklėje ir maceracija ultragarso voneleje. Siekta palyginti, kuris iš jų yra tinkamesnis: ekstrakcijos efektyvumas įvertinamas pagal suminį flavonoidų kiekį, nustatytą spektrofotometriniu suminio flavonoidų kiekio įvertinimo metodu (metodika aprašyta 3.2.5 skyriuje).

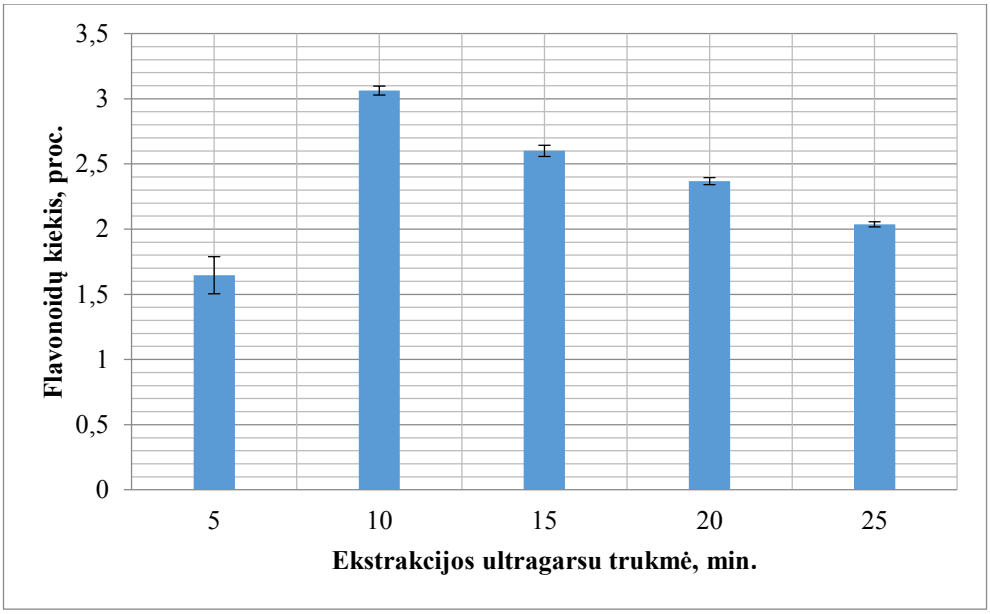
Maceracijai purtyklėje atsveriama po 2 g (±0,01) susmulkintos žaliavos ir užpilama 20 ml 70 proc. V/V etanoliu. Iš viso paruošiami šeši ekstraktai: pirmasis purtyklėje kratomas 30 min, antrasis – 60 min, trečiasis – 90 min, ketvirtasis – 3 val, o penktasis bei šeštasis – po 3 val, bet dar paliekami laboratorijoje atitinkamai 24 val. ir 48 val. kambario temperatūroje, nuo tiesioginių saulės spindulių apsaugotoje vietoje, sandariai užkimštuose induose. Rezultatai, gauti atlikus tris pakartojimus, pateikiami 4 paveiksle.



4 pav. Suminio flavonoidų kiekio priklausomybė nuo maceracijos purtyklėje trukmės ($p < 0,05$)

Nesunku įžvelgti suminio flavonoidų kiekio priklausomybę nuo dinaminės maceracijos trukmės. Suminis flavonoidų kiekis tiesiogiai didėja priklausomai nuo maceracijos laiko, tačiau po tam tikro laiko pradeda mažėti. Didžiausia flavonoidų koncentracija nustatyta po parą trukusios maceracijos (2,4 proc.), tačiau palaikius ekstraktą dar parą, jame galėjo vykti veikliųjų medžiagų kokybiniai ir kiekybiniai pokyčiai. Suminis flavonoidų kiekis šiek tiek sumažėjo, nors maceracija truko dvigubai ilgiau (suminis flavonoidų kiekis sumažėjo iki 2,1 proc). Maceracija efektyviausia yra tada, kai trunka parą, tačiau tai nėra statistiškai patikimas rodiklis ($p < 0,05$). Statistiniu patikimumu pasižymi maceracija, trunkanti tris valandas ($p < 0,05$), tačiau metodas yra pakankamai ilgas ir ne toks populiarus dėl mažesnio išekstrahuoto veikliųjų medžiagų kiekio, palyginus su šiuolaikiniais efektyvesniais ekstrakcijos metodais, pvz., ultragarsu pagreitinta ekstrakcija.

Ekstrakcijai ultragarsinėje vonelėje atsveriama po 2 g (±0,01) susmulkintos vaistinės augalinės žaliavos, užpilama 20 ml 70 proc. V/V etanoliu sandariai uždaromame inde ir ekstrahuojama ultragarsinėje vonelėje. Ekstrahuojama kambario temperatūroje, 10x10 proc. galia. Pirmasis mišinys ultragarsu veikiamas 5 min, antrasis – 10 min, trečiasis – 15 min, ketvirtasis – 20 min, o penktasis – 25 min. Po ekstrakcijos suminis flavonoidų kiekis nustatomas spektrofotometriniu metodu (metodika aprašyta 3.2.5 skyriuje). Rezultatai, gauti atlikus tris pakartojimus, pateikiami 5 paveiksle.



5 pav. Suminio flavonoidų kiekio priklausomybė nuo ekstrakcijos ultragarsu trukmės ($p < 0,05$)

Didžiausias ekstrakcijos efektyvumas pasiekiamas po 10 min augalinės žaliavos ir ekstrahento sąlyčio ultragarso bangų aplinkoje (suminis flavonoidų kiekis – 3,1 proc.)). Po 15 min ir ilgiau nustatomas mažesnis suminis flavonoidų kiekis dėl galimo BAM (šiuo atveju flavonoidų) skilimo (2,6 proc). Kadangi žaliava yra stipriai susmulkinta, veikliosios medžiagos, veikiant ultragarsui, į ekstrahentą pereina gana greitai. Ilgesnė nei 10 min ekstrakcija ultragarsu jau nebe tokia efektyvi ir suminis flavonoidų kiekis pradeda mažėti. Esktrakcijos, trunkančios 10 min, rezultatai yra statistiškai patikimi, lyginant su 5, 15, 20 ir 25 min trunkančia ekstrakcija. Be to, statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) pastebimas tarp 10 ir 25 min trukmės ekstrakcijos ultragarsu. Vadinasi, ilgiau trunkančios ekstrakcijos metu suminis flavonoidų kiekis reikšmingai sumažėja. Flavonoidų stabilumas priklauso nuo jų struktūros ir ekstrakcijos sąlygų. Pavyzdžiui, po ilgai trunkančios ekstrakcijos ultragarsu, greičiau skyla tokie flavonoidai, kurie turi daugiau fenolinių grupių, o stabilūs išlieka tokie, kurie turi cukrų fragmentų ir metoksilo funkcinių grupių. [99]

Palyginus maceracijos purtyklėje ir ekstrakcijos ultragarso vonelėje rezultatus, galima daryti išvadą, kad tinkamiausios ekstrakcijos sąlygos yra 10 minučių trukmės ekstrakcija ultragarsu, kaip ekstrahentą naudojant 70 proc. V/V etanolį. Ruošiant ekstraktą dinaminės maceracijos metodu didžiausias nustatytas suminis flavonoidų kiekis yra 2,4 proc, o atliekant ekstrakciją ultragarsinėje vonelėje – net 3,1 proc. Be to, ekstrakcija ultragarsu yra daug greitesnis (bent trisdešimčia kartų) ekstrakcijos metodas, nei maceracija purtyklėje.

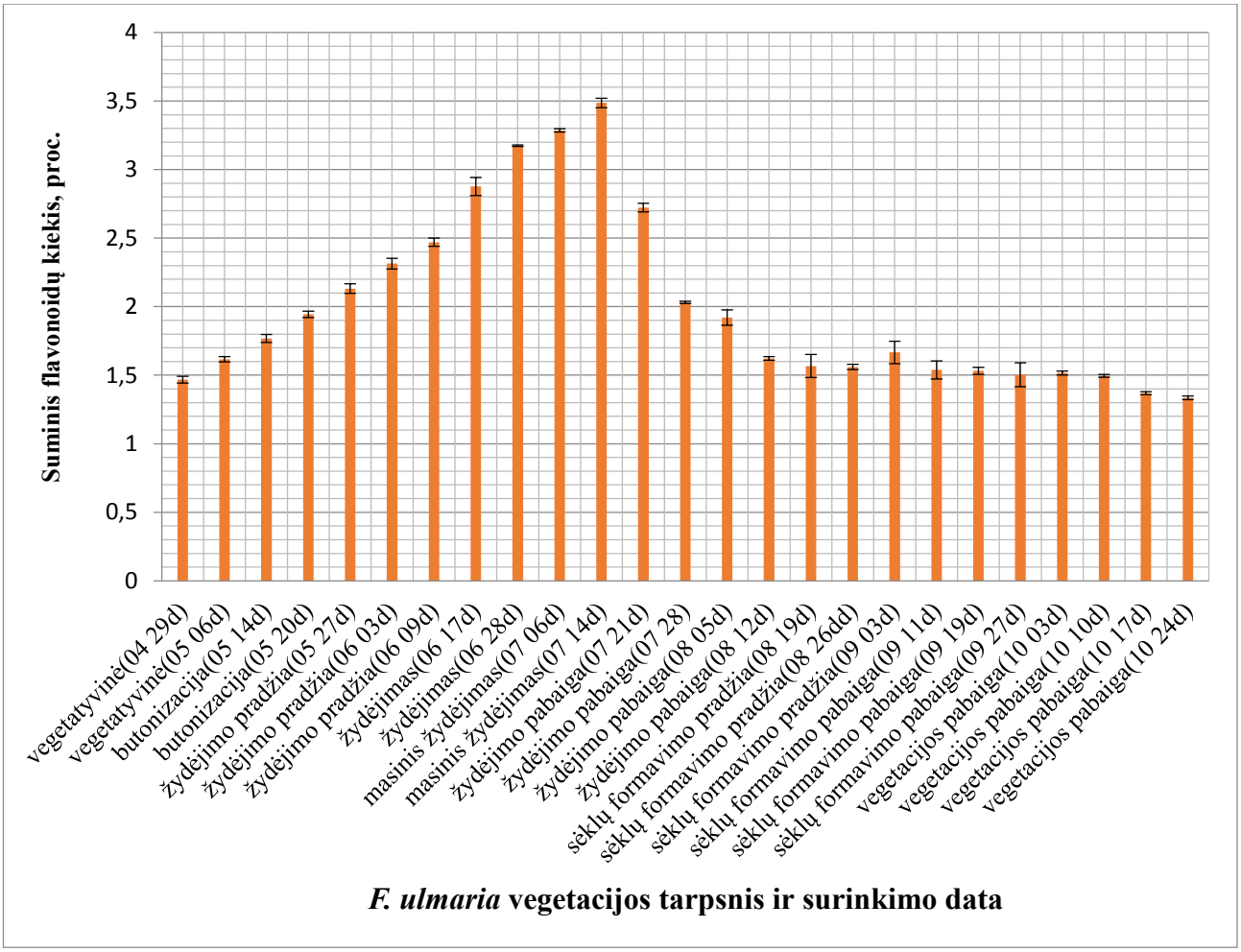
4.3 Flavonoidų kiekybinės sudėties kitimo dinamika augalo vegetacijos metu

Flavonoidų kiekybinė analizė atliekama “Beckman DU – 70” spektrofotometru, naudojant metodiką, aprašytą 3.2.4 skyriuje. Ekstraktai pagaminti pagal ekstrakcijos sąlygų nustatymo metu pasirinktą didžiausią flavonoidų suminį kiekį ekstrahuojančią metodiką (su 70 proc. etanoliu V/V, ekstrakcijos procesą paspartinant 10 min trunkančiu ultragarsinių bangų poveikiu; 2.2.4 skyrius). Praktiškai taikomam suminio flavonoidų kiekio tyrimui spektrofotometrijos metodu dažnai pritaikoma naudinga analičių savybė sudaryti spalvotus reakcijos produktus. Šie reakcijos produktai turi aliumimio ar boro rūgšties joną. Dėl to antrasis sugerties maksimumas, kuris yra ultravioletinio spektro srityje, pasislenka į regimosios srities pusę (t.y. įvyksta absorbcijos maksimumo batochrominis poslinkis ir, įvykus reakcijai, pasikeičia tiriamojo tirpalo spalva). [58] Šiuo atveju, norint įvertinti suminį flavonoidų kiekį spektrofotometriniu metodu, sudaromas spalvotas junginys su aliuminio jonu.

Norint ištirti suminio flavonoidų kiekio priklausomybę nuo augalo vegetacijos tarpsnio, spektrofotometriniu metodu buvo ištirtas kiekvieno vaistinės augalinės žaliavos mėginio ekstraktas.

Nustatyta, kad suminis flavonoidų kiekis vaistinėje augalinėje žaliavoje didžiausias, kai augalas žydi. Didžiausias suminis flavanoidų kiekis *F. ulmaria* žolėje aptinkamas masinio žydėjimo metu – net 3,49 proc.

Suminio flavonoidų kiekio kitimo dinamika pavaizduota 6 paveiksle. Galutiniai rezultatai įvertinti tyrimą pakartojus tris kartus.



6 pav. Suminio flavonoidų kiekio kitimo priklausomybė nuo *F. ulmaria* vegetacijos tarpsnio ($p < 0,05$)

Grafike pateikti rezultatai rodo, kad suminis flavonoidų kiekis labiausiai priklauso nuo augalo žydėjimo. Kadangi birželio – liepos mėnesiais augalas žydėjo, tai tuo metu suminis flavonoidų kiekis buvo didesnis, nei vidutinis, kuris yra 2,00 proc. Įvertinus rezultatus statistiškai, pastebėta, kad statistiškai reikšmingai, lyginant su visais vegetacijos tarpsniais, suminis flavonoidų kiekis kinta nuo pat vaistinio augalo žydėjimo pradžios iki žydėjimo pabaigos, t.y. nuo 2,13 proc. padidėja iki 3,49 proc., ir, besibaigiant žydėjimui, vėl sumažėja iki 1,92 proc. Prasidėjus augalo žydėjimo pabaigos tarpsniui, tolimesnis suminio flavonoidų kiekio mažėjimas jau nebėra statistiškai reikšmingas požymis ($p < 0,05$). Vadinasi, suminis flavonoidų kiekis vaistinio augalo žolėje reikšmingai priklauso nuo augalo vegetacijos tarpsnio, bet statistiškai reikšmingi pokyčiai vyksta nuo augalo žydėjimo pradžios iki augalo žydėjimo pabaigos.

Literatūros šaltinių duomenimis, flavonoidų kiekis augale priklauso nuo vegetacijos tarpsnio. Pastebimas glaudus ryšys tarp flavonoidų kiekio įvairiose augalų dalyse ir jų fenologinio vystymosi. Manoma, kad būtent dėl to vaistinė augalinė žaliava, skirta medicininiams tikslams, turėtų būti surenkama augalo žydėjimo metu, nes didžiausias suminis flavonoidų kiekis nustatomas augalo butonizacijos ir žydėjimo fazėse. [100, 101] Kaip minėta anksčiau, *F. vulgaris* savo sudėtimi panaši į *F.*

ulmaria. Kadangi literatūros duomenų apie flavonoidų kiekybinės sudėties dinamiką *F. ulmaria* vegetacijos metu trūksta, todėl pateikiamas literatūros šaltiniuose surastas pavyzdys su *F. vulgaris*: penkių flavonoidų (hiperozido, astragalino, spireozido, kemferolio ir kvercetino), dviejų katechinams priklausančių junginių ir septynių polifenolinių junginių kiekis buvo reikšmingai didesnis žydėjimo pradžioje, nei pabaigoje, baigiantis augalo masiniam žydėjimui. Toks požymis nustatytas ir pačiuose žieduose, ir lapuose. [102] Šio tyrimo rezultatai panašūs į tyrimų, atliktų su *F. vulgaris*, rezultatais.

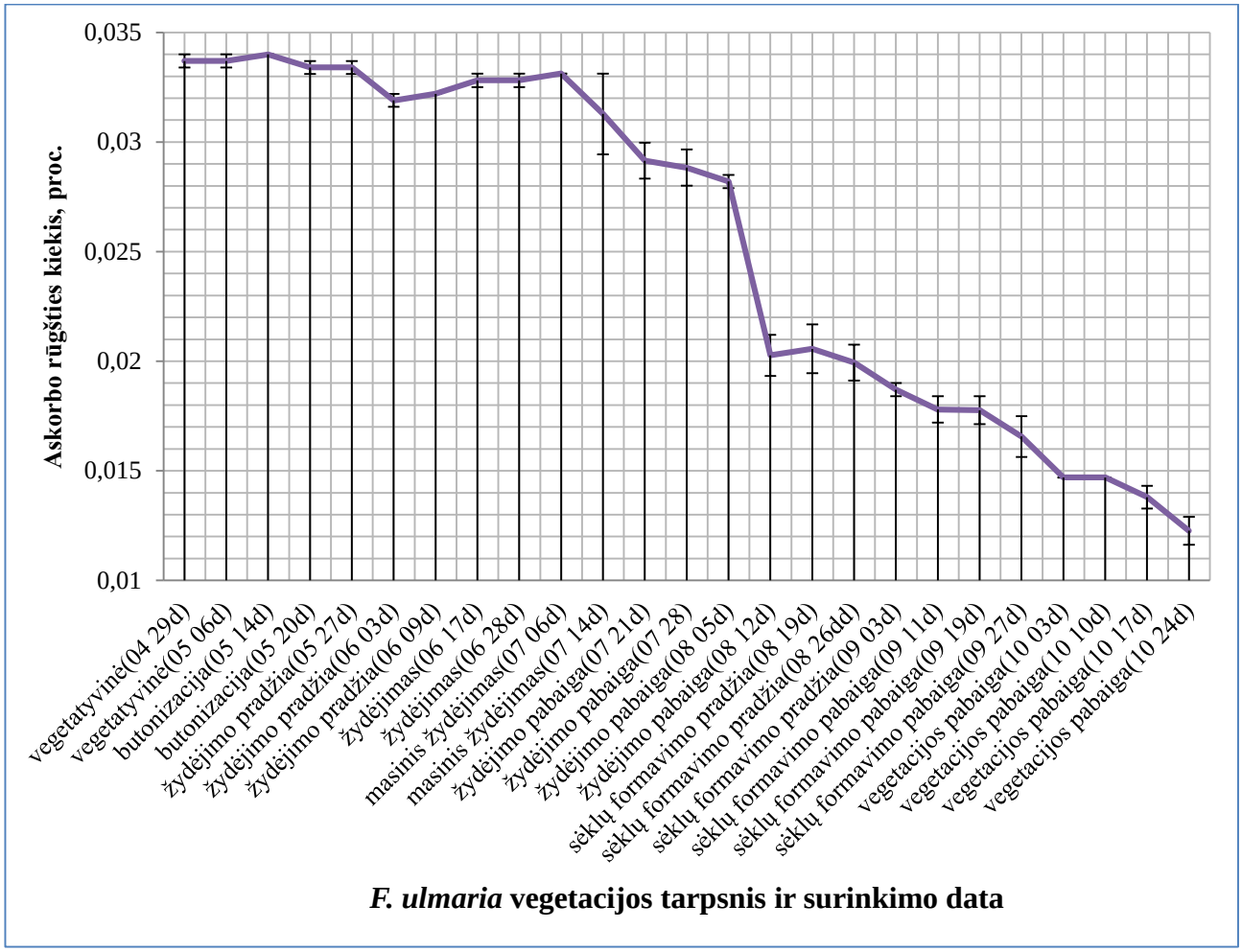
Vertinant šiuose pelkinių vingiorykščių žolės tyrimuose gautus rezultatus galima teigti, kad suminis flavonoidų kiekis pirmojoje vaistinio augalo žydėjimo pusėje yra didesnis, nei antrojoje žydėjimo pusėje, tai yra, iškart po masinio žydėjimo tarpsnio.

Svarbu pažymėti, jog duomenys, gauti taikant spektrofotometrijos metodą, ne visada atitinka duomenis, gautus efektyvesniais ir šiomis dienomis daug dažniau taikomais metodais (pvz., efektyvioji skysčių chromatografija (ESC), ar kapiliarinė elektroforezė (KE)). Duomenys gali skirtis dėl to, kad spektrofotometrijos metodas turi nemažai trūkumų. Nors spektrofotometrijos metodas yra daug paprastesnis ir pigesnis, nei ESC ar KE, tačiau jis geriau atspindi flavonoidų kiekį tokiame tiriamajame ekstrakte, kuriame vyrauja tyrimui pasirinkto palyginamojo flavonoido dariniai, pvz., kvercetinas ir jo glikozidai. Šiuo atveju palyginamuoju junginiu pasirinktas rutinas. Kitas reikšmingas trūkumas – spektrofotometrijos metodu neįmanoma vienu metu įvertinti kelių flavonoidų grupių. [58] ESC neabejotinai pasižymi didesniu tikslumu ir efektyvumu negu spektrofotometrija. Atliekant ESC, galima kokybiškai ir kiekybiškai įvertinti keletą flavonoidų grupių ir net jų kompleksinius junginius (pvz., glikozidus). [103] Tačiau spektrofotometrijos metodas yra paprastesnis ir lengviau prieinamas, dažnai nurodomas farmakopėjose vaistinės augalinės žaliavos standartizacijai, nereikia brangios aparatūros ir standartų, be to, palyginus greitai atliekamas.

4.4 Askorbo rūgšties kiekybinės sudėties įvairavimas

Askorbo rūgšties kiekybinė analizė atlikta pagal metodiką, aprašytą 3.2.6 skyriuje. Tirti visi surinkti vaistinės augalinės žaliavos mėginiai. Titrimetrinis metodas modifikuotas taip, kad būtų kuo tikslesnis: vietoj mikrobiuretės naudotos mikropipetės, kad ekvivalentinis taškas būtų nustatomas kuo tiksliau (0,01 ml tikslumu).

Nustatytas vidutinis askorbo rūgšties kiekis per visą augalo vegetacijos periodą yra 0,03 proc. Didžiausias askorbo rūgšties kiekis nustatytas pirmaisiais augalo vegetacijos mėnesiais, tikriausiai dėl to, kad augalas turėjo daugiau jaunų lapelių bei ūgliukų. Nors jaunų lapelių vėliau sumažėjo, atsirado daugiau sumedėjusių vaistinio augalo dalių, tačiau augalas pradėjo gausiai žydėti. Po žydėjimo pabaigos askorbo rūgšties kiekis pradėjo žymiai mažėti ir tapo mažesnis, nei vidutinis kiekis, galimai dėl išorinių veiksnių poveikio ir augalo nykimo. Askorbo rūgšties kiekio dinamikos priklausomybė nuo vegetacijos tarpsnio vaizduojama 7 paveiksle. Rezultatai gauti tyrimą pakartojus tris kartus.



7 pav. Askorbo rūgšties kiekio priklausomybė nuo augalo vegetacijos tarpsnio ($p < 0,05$)

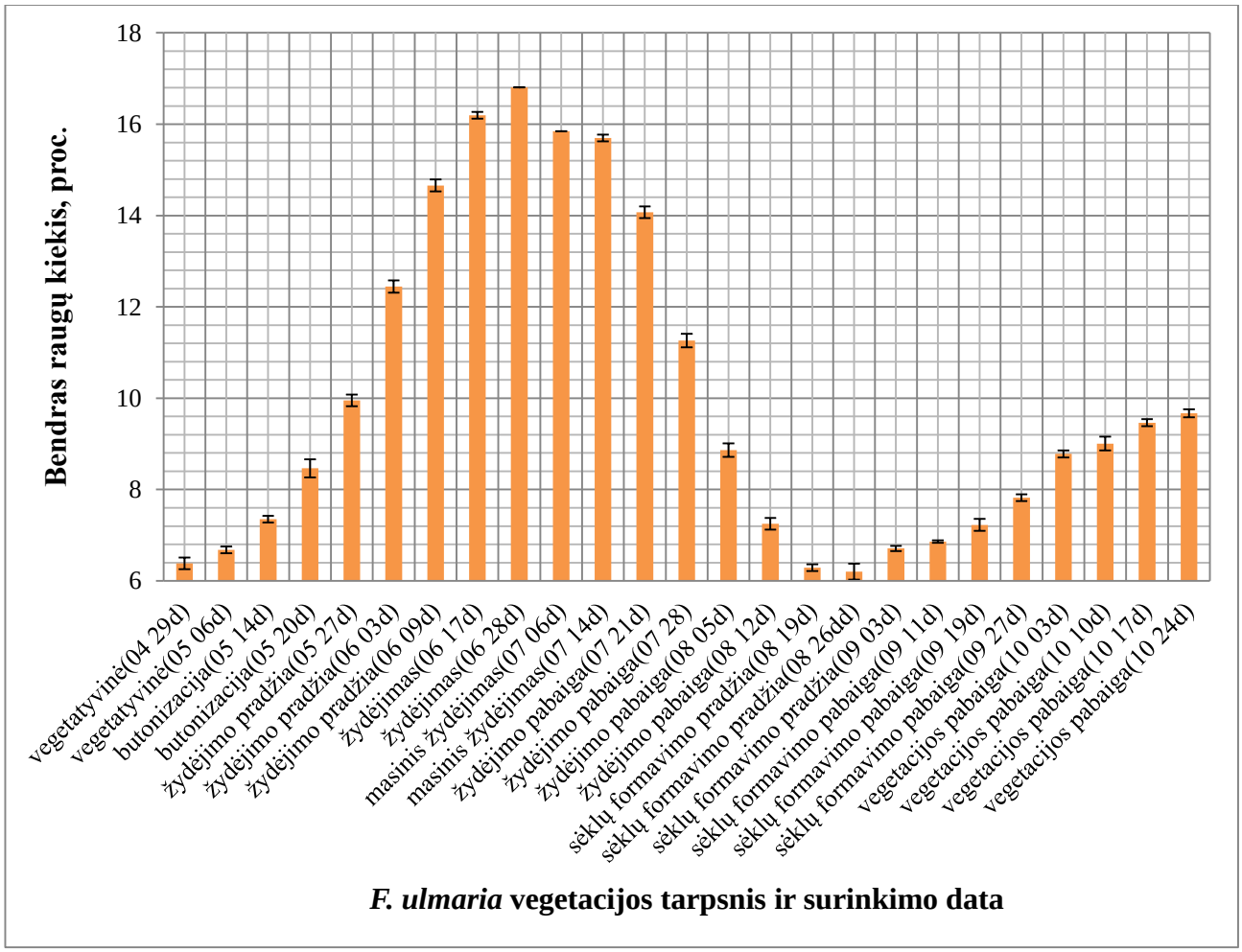
Grafike pateikti rezultatai rodo, kad didesnis askorbo rūgšties kiekis aptinkamas pirmojoje augalo fenologinio vystymosi pusėje. Tuo metu vitamino C kiekis yra didesnis už vidutinį vitamino C kiekį augale per visą jo vegetacijos laikotarpį (> 0,025 proc.) Statistiškai reikšmingai vitamino C kiekis mažėti pradeda tik po augalo masinio žydėjimo ($p < 0,05$), o iki tol šio vitamino kiekio pokytis nėra statistiškai reikšmingas. Pats mažiausias askorbo rūgšties kiekis yra pačioje augalo ontogenezės pabaigoje, vidutinei paros temperatūrai nukritus iki 10 °C. Apskritai vitamino C kiekis per visą jo vegetaciją sumažėjo nuo 0,03 iki 0,01 proc. Vadinasi, vaistinę augalinę žaliavą norint naudoti kaip vitamino C šaltinį, ją reikėtų rinkti iki augalo žydėjimo pabaigos. Literatūros šaltiniuose informacijos apie askorbo rūgšties kiekio įvairavimą vingiorykštės žaliavose nepavyko rasti, todėl tai gali būti pirmasis tokio pobūdžio tyrimas.

4.5 Raugų kiekybinės sudėties įvairavimas

Suminio raugų kiekio įvertinimas atliktas pagal 3.2.7 skyriuje aprašytą metodiką. Literatūroje skelbiama, kad buvo atliktas tyrimas, kuriuo buvo siekta įrodyti, jog virinant išgaunamas didesnis polifenolinių junginių kiekis. Buvo vertinami pirmojo kinetiniai galo rūgšties ekvivalentų parametrai, kurių skaitinė reikšmė proporcingai didėjo keliant temperatūrą nuo 60 iki 100 ºC. Vadinasi efektyviai polifenolinių junginių ekstrakcijai virinimas yra labai svarbus. [104]

Dažniausiai viename vaistiniame augale yra ir kondensuotų, ir hidrolizuojamų raugų, tačiau paprastai vyrauja tik viena iš šių grupių. Pelkinių vingiorykščių vaistinėje augalinėje žaliavoje vyrauja hidrolizuojami raugai. Labai dažnai hidrolizuojamų ir kondensuotų raugų santykis augalo vegetacijos metu keičiasi. [67] Mokslinių tyrimų duomenimis, didžiausias raugų kiekis *F.ulmaria* žiedynuose nustatomas pumpurų mezgimo ir žydėjimo fazėse. [100]

Šiame magistriniame darbe įvertinamas suminio raugų kiekio kitimas, atsižvelgiant į augalo vegetacijos tarpsnį. Titrimetriniu metodu po tris kartus tirti visi vaistinės augalinės žaliavos mėginiai. Rauginių medžiagų kiekio kitimo priklausomybė nuo vaistinio augalo vegetacijos tarpsnio pavaizduota 8 paveiksle. Rezultatai gauti tyrimą pakartojus tris kartus.



8 pav. Suminio raugų kiekio priklausomybė nuo augalo vegetacijos tarpsnio ($p < 0,05$)

Grafike pateikti rezultatai rodo, kad didžiausias suminis raugų kiekis yra pasiekiamas prieš pelkinių vingiorykščių masinio žydėjimo tarpsnį, t.y. 2012 – 06 – 28 rinktame ėminyje nustatomas didžiausias raugų kiekis – net 16,80 proc. Statistiškai reikšmingas raugų kiekio kitimas būdingas nuo žydėjimo pradžios, įskaitant masinį žydėjimą, baigiant žydėjimo pabaigos įpusėjimu t.y. laikotarpis nuo 2013 – 06 – 03 iki 2013 – 08 – 05 ($p < 0,05$).

Tokia tendencija galima dėl to, kad prieš žydėjimą svarbu didinti raugų kiekį, o per žydėjimą palaikyti jų, kaip apsauginių medžiagų, kiekį. Teigiama, kad padidėjusi taninų gamyba augale siejama su kai kuriomis augalų ligomis. Taip pat daroma prielaida, kad biologinis taninų vaidmuo yra labai didelis: taninai reikalingi tam, kad vaistinis augalas apsisaugotų nuo gresiančių infekcijų, vabzdžių ar gyvūnų žalos. [64, 69] Kuo daugiau taninų gaminama, tuo apsauga didesnė. Žydėjimo metu vaistinis augalas yra pažeidžiamiausias, todėl teigiama, kad taninų produkcija prieš žydėjimą ir jo metu yra didžiausia.

Po masinio žydėjimo tarpsnio suminis raugų kiekis pradeda mažėti, tačiau didesnis nei vidutinis (10,0 proc.) jų kiekis nustatomas iki pat augalo žydėjimo pabaigos. Pradėjus formuotis sėkloms ir iki pat augalo vegetacijos laikotarpio pabaigos suminis raugų kiekis pradeda nežymiai didėti, tačiau vidutinio suminio raugų kiekio (10,0 proc.) jau nebepasiekia. Vadinasi, didžiausias suminis raugų kiekis nustatomas pelkinių vingiorykščių žaliavose augalo žydėjimo metu, birželio – liepos mėnesiais.

4.6 Antimikrobinis pelkinių vingiorykščių ekstraktų aktyvumas

Antimikrobinis tyrimas buvo atliktas pagal metodiką, aprašytą 3.2.8 skyriuje. Tyrimas atliktas remiantis mikrobiologijos prof. A. Pavilonio rekomendacijomis.

Tirtas būtent tas žaliavos mėginys, kuriame nustatytas didžiausias suminis flavonoidų kiekis, t.y. 2012 – 07 – 14 d. rinkta pelkinių vingiorykščių vaistinė augalinė žaliava. Suminis flavonoidų kiekis joje yra 3,49 proc, o suminis raugų kiekis – 15,63 proc. Beveik tokia pati šių BAM koncentracija tais pačiais šiame magistriniame darbe naudotais metodais nustatyta ir etanoliniame, ir vandeniniame ekstraktuose (etanoliniame ekstrakte - 3,37±0,16 proc.; vandeniniame ekstrakte - 15,39 ± 0,31 proc.). Šie etanoliniai ir vandeniniai ekstraktai buvo skirti gaminti tirštiesiems ekstraktams. Antimikrobinio tyrimo rezultatai vertinti Petri lėkšteles keletą minučių palaikius kambario temperatūroje, žiūrint į atidengtas lėkšteles, laikant jas vertikalioje padėtyje prieš dienos šviesą. Rezultatai pateikiami 4 ir 5 lentelėse.

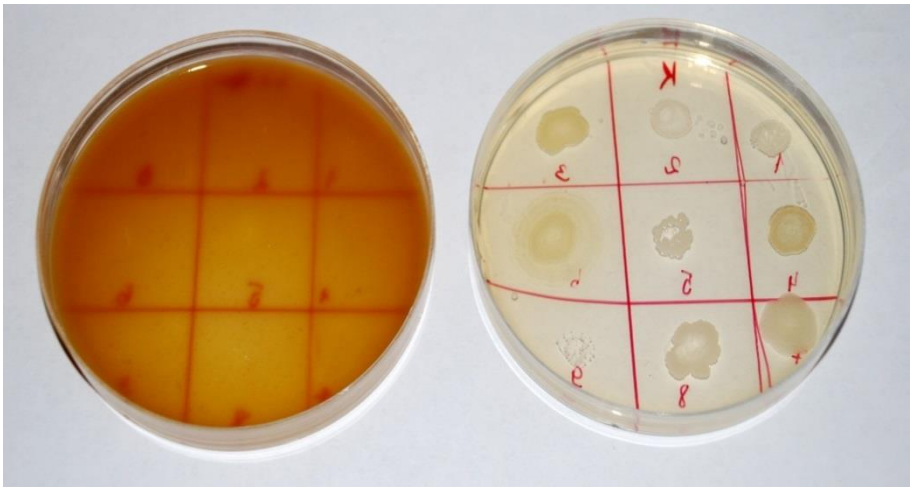
4 lentelė. Skirtingų etanoliu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų koncentracijų įtaka mikroorganizmų augimui

Konc. mg/ml	*S.aureus*	*E.faecalis*	*E.coli*	*P.aeruginosa*	*K. pneumoniae*	*P.mirabilis*	*B.cereus*	*B.subtilis*	*C.albicans*
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6	-	-	+	++	-	-	-	-	+
4	-	-	++	++	-	-	-	-	+
2	-	-	+++	+++	-	-	-	-	++

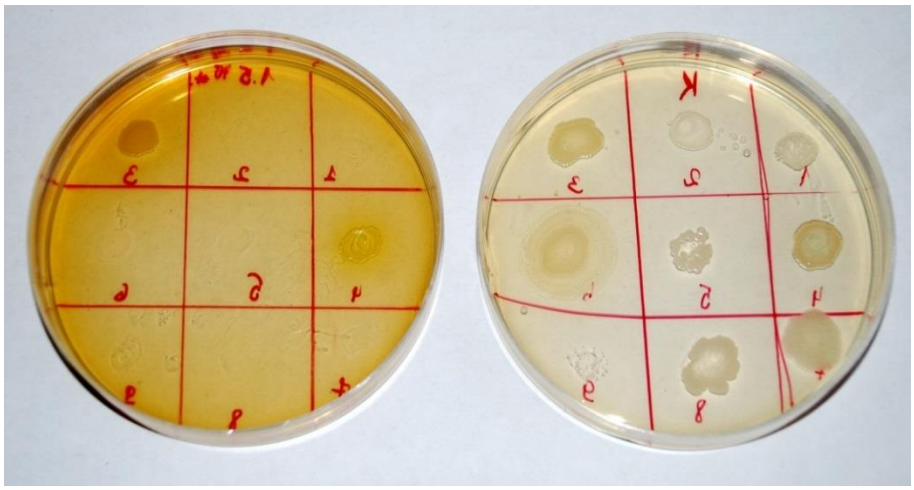
Minimali slopinanti etanoliu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų koncentracija (MIC), sprendžiant iš šio tyrimo rezultatų, prieš *E.coli* ir *P.aeruginosa* yra 8 mg/ml, o prieš *C.albicans* – 10 mg/ml. Norint patikslinti MIC prieš šiuos mikroorganizmus, reikėtų atlikti daugiau išsamesnių antimikrobinių tyrimų, kuriuose būtų tiriamas poveikis mikroorganizmų augimui, naudojant tarpines (pvz., 6,5 ar 2,5 mg/ml) preparatų koncentracijas.

Kitų tirtų mikroorganizmų augimas buvo visiškai slopinamas visomis penkiomis (10, 8, 6, 4, 2 mg/ml) etanoliu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų koncentracijomis. Galima daryti išvadą, kad *C.albicans*, *E. coli* ir *P. aeruginosa* yra patys atspariausi organizmai, ir jų augimą slopinti gali tik didesnės koncentracijos veikliųjų medžiagų, išskirtų iš *F. ulmaria* 70 proc. etanoliu V/V.

10 mg/ml ir 2 mg/ml etanoliu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų koncentracijų poveikis prieš visas 9 mikroorganizmų kultūras pavaizduotas 9 ir 10 paveiksluose.



9 pav. 10 mg/ml etanoliu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų koncentracijos poveikis mikroorganizmų augimui: neauga nei vienos kultūros kolonijos, lyginant su kontroline lėkštele



10 pav. 2 mg/ml etanoliu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų koncentracijos poveikis mikroorganizmų augimui: trimis pliusais įvertintas *E.coli* ir *P.aerugi*nosa kolonijų augimas bei dviemis pliusais įvertintas *C.albicans* augimas

5 lentelė. Skirtingų vandeniu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų koncentracijų įtaka mikroorganizmų augimui

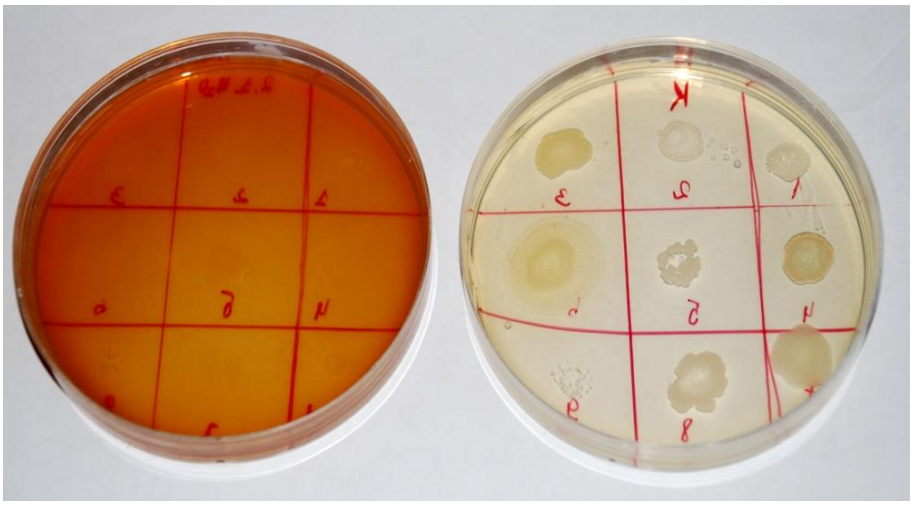
Konc. mg/ml	*S.aureus*	*E.faecalis*	*E.coli*	*P.aeruginosa*	*K.pneumoniae*	*P.mirabilis*	*B.cereus*	*B.subtilis*	*C.albicans*
10	-	-	-	-	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	+

6	-	-	-	++	-	-	-	-	+
4	-	-	++	++	-	-	-	-	+
2	-	++	+++	+++	-	-	-	++	+++

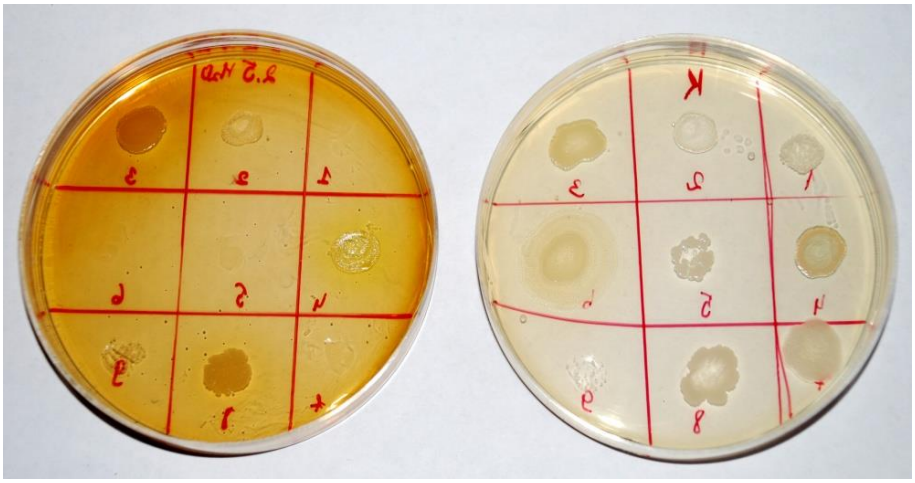
Vertinant vandeniu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų antimikrobinį poveikį pagal šio tyrimo rezultatus, galima teigti, kad MIC prieš *P.aeruginosa* yra 8 mg/ml, prieš *E.coli* – 6 mg/ml, o prieš *E.faecalis* ir *B.subtilis* – 4 mg/ml. *C. albicans* augimą minimaliai veikia vandeniu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų 4 – 10 mg/ml koncentracija, o 2 mg/ml koncentracija *C.albicans* kolonijų augimui įtakos nebeturi; grybelis tokiai koncentracijai yra atsparus. Vandeniu ekstrahuoti tirštieji ekstraktai silpniausiai slopina tų pačių mikroorganizmų, kaip ir etanoliu ekstrahuoti tirštieji ekstraktai, augimą, be to, 2mg/ml koncentracijos vandeniu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų tirpalams atsparios dar dvi bakterijos – *E. faecelis* ir *B. subtilis*.

Vandeniu ekstrahuotuose tirštuosiuose ekstraktuose pagrindinę veikliųjų madžiagų dalį sudaro taninai. Taninų molekulės pasižymi antibakterinėmis ir antigrybelinėmis savybėmis. Daugybėje mokslinių publikacijų teigiama, kad pelkinių vingiorykščių ekstraktas slopina ešerichijų, pseudomonų, mikrokokų ir kitų mikroorganizmų augimą.[14]

10 mg/ml ir 2 mg/ml vandeniu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų koncentracijų poveikis prieš visas 9 mikroorganizmų kultūras pavaizduotas 11 ir 12 paveiksluose.



11 pav. 10 mg/ml vandeniu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų koncentracijos poveikis mikroorganizmų augimui: vienu pliusu įvertintas *C.albicans* kolonijų augimas, lyginant su kontroline lėkštele



12 pav. 2 mg/ml vandeniu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų koncentracijos poveikis mikroorganizmų augimui: trimis pliusais įvertintas *E.coli, P.aeruginosa* ir *C.albicans* kolonijų augimas bei dviemis pliusais įvertintas *E.faecalis* bei *B.subtilis* kolonijų augimas

Galima teigti, kad etanoliu ekstrahuoti pelkinių vingiorykščių tirštieji ekstraktai pasižymi šiek tiek didesniu antimikrobiniu poveikiu, ypač prieš *E. faecalis* ir *B. subtilis*. Nesunku pastebėti, kad didžiausiu atsparumu pasižymi grybelis *C.albicans* – jo kolonijų augimą visiškai nuslopino tik didžiausia, 10 mg/ml vandeniu ekstrahuotų tirštųjų ekstraktų koncentracija. Be to, Petri lėkštelės su mikroorganizmų kultūromis buvo paliktos trims paroms kambario temperatūroje. Pastebėta, kad nežinomos tapatybės mikroorganizmų, patekusių iš aplinkos, pavienės kolonijos pradėjo augti tik lėkštelėse su vandeniu ekstrahuotais tirštaisias ekstraktais (su 2 mg/ml, 4mg/ml ir 6 mg/ml preparatų koncentracijomis, tačiau jokių plika akimi matomų mikroorganizmų kolonijų neatsirado lėkštelėse su 8 mg/ml ir 10 mg/ml koncentracijomis).

Rezultatus tikslinga palyginti su literatūros šaltinių duomenimis. Publikacijų su kai kurių mikroorganizmų tyrimais nepavyko rasti. Daugiausiai tiriamas antimikrobinis aktyvumas prieš *S. aureus, E. coli* ir *C. albicans*. Difuziniu metodu buvo įvertintas iš *F. ulmaria* išskirtų fenolinių junginių antimikrobinis aktyvumas prieš tris mikroorganizmų rūšis (*C. albicans, E. coli* ir *S. aureus*). Nustatyta, kad ryškiausią poveikį sukėlė kvercetinas ir naringeninas. *E. coli* ir *S. aureus* augimą visiškai inhibavo 500 µg metanolinio vaistinio augalo žolės ekstrakto (1 mg/ml). *C. albicans* yra pats atspariausias šių flavonų poveikiui – *F. ulmaria* ekstraktui būdingas švelnus antimikrobinis poveikis. [105] Kitame tyrime buvo nustatytas inhibuojantis metanolinių *F. ulmaria* ekstraktų poveikis prieš maistą gadinančias bakterijas. 48 valandas visiškai buvo inhibuojamas *E. coli* bakterijų augimas, naudojant 14 proc. ekstraktą ir *S. aureus* bakterijų augimas, naudojant 7 proc. koncentracijos ekstraktą. Tiriant antimikrobinį poveikį prieš kitas mikroorganizmų rūšis (pvz., *Salmonella enteridis, Pseudomonas fragi, Aeromonas caviae*) poveikis dar ryškesnis. Būtent *E.coli* augimui inhibuoti prireikė didžiausios koncentracijos *F. ulmaria* ekstrakto. [106] Kitų mokslinių tyrimų rezultatai rodė, kad specialia

technologija paruošti vaistinio augalo ekstraktai, daugiausiai savo sudėtyje turėję fenolinių rūgščių (galo, kavos, kumarino, vanilino, ferulo), o iš flavonoidų – miricetino, švelniai slopino *S. aureus* ir *B. cereus* augimą, švelnus antimikrobinis poveikis nustatytas ir prieš *E.faecelis*. [107, 108] Išanalizavus literatūroje pateiktus duomenis ir palyginus juos su šiame tyrime gautais rezultatais, galima daryti išvadą, kad vaistinio augalo ekstraktų poveikiui pats atspariausias iš tirtų mikroorganizmų yra grybelis *C. albicans*. *E.coli* augimui nuslopinti taip pat dažniausiai reikia didesnių koncentracijų ekstraktų, nei kitų bakterijų augimo inhibicijai (pvz., *S. aureus* ar *B. cereus*). Žinoma, antimikrobinio tyrimo eiga ir rezultatai priklauso nuo daugelio faktorių (pvz., mikroorganizmo kilmės ir aktyvumo, terpių maistingumo, inkubacijos sąlygų, ekstraktų gamybos technologijos bei paties tyrimo metodo), tačiau šiame magistriniame darbe aprašyto antimikrobinio tyrimo rezultatai yra panašūs į mokslinėje literatūroje pateiktus. Bet būtina pabrėžti, kad mokslinėje literatūroje nepavyko rasti pelkinių vingiorykščių antimikrobinio poveikio prieš *P. mirabilis* poveikio tyrimų, todėl tai gali būti pirmasis tokio pobūdžio tyrimas. *P. mirabilis* – tai gramneigiama aplinkoje gausiai paplitusi bakterija, dažnai sukelianti ūmines ir lėtines šlapimo takų ligas, virškinimo trakto ligas (pvz., gastroenteritą, tulžies nutekamųjų latakų uždegimą), žaizdų infekcijas. *P. mirabilis* sukelia įvairias hospitalines infekcijas; ji labai dažnai, kaip ir *E.coli*, yra infekcinės ligos priežastis nustatoma mikrobiologiniuose pasėliuose [109]. Todėl galima teigti, kad pelkinių vingiorykščių ekstraktai gali padėti gydant šlapimo takų ir viškinimo trakto infekcines ligas ir turi didelį potencialą augalinių vaistinių preparatų, pagamintų šio augalo vaistinės augalinės žaliavos pagrindu, sukūrimui.

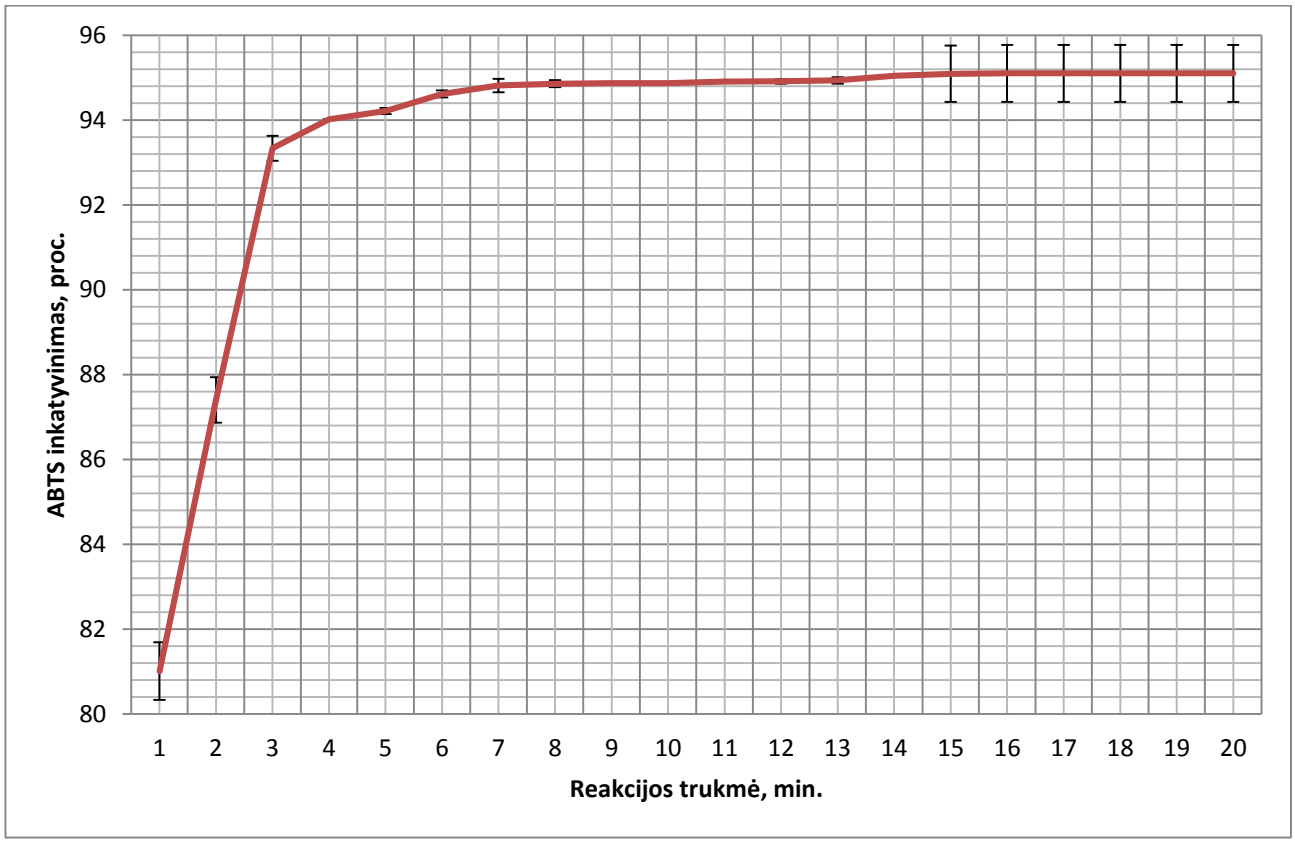
4.7 Laisvųjų radikalų surišimo įvertinimas

Antiradikalinio poveikio tyrimas atliktas pagal 3.2.9 skyriuje aprašytą metodiką laisvųjų radikalų surišimo įvertinimui. Miller ir kt. 1993 pirmieji aprašė laisvųjų radikalų surišimo įvertinimui skirtą spektrofotometrinį metodą, kurį pavadino troloksui ekvivalentiškos antioksidantinės galios (TEAC) metodu. Gerai žinomas originalus TEAC metodas pagrįstas metmioglobino aktyvacija. Antiradikaliniu poveikiu pasižymintys junginiai gali surišti susidariusius ABTS radikalus. Išmatavus po reakcijos gauto mišinio absorbciją, nustatomas nesurištų ABTS•+ kiekis ir įvertinamas tiriamojo ėminio antiradikalinis aktyvumas. [53]

Pelkinių vingiorykščių vaistinė augalinė žaliava turtinga polifenoliniais junginiais, kurie pasižymi antioksidantiniu aktyvumu. Be to, stipriu antioksidantiniu aktyvumu pasižymi ir askorbo rūgštis. [110]

Reakcijos kinetikos stebėjimui pasirinktas daugiausiai flavonoidų turinčio mėginio (rinkto 2012 – 07 – 14 d.) etanolinis 1:10 ekstraktas. Jo absorbsijos duomenys užrašomi kas minutę ir laukiama, kol reakcija pasieks dinaminę pusiausvyrą. Bandymas kartojamas tris kartus ir nustatyta, kad dinaminė

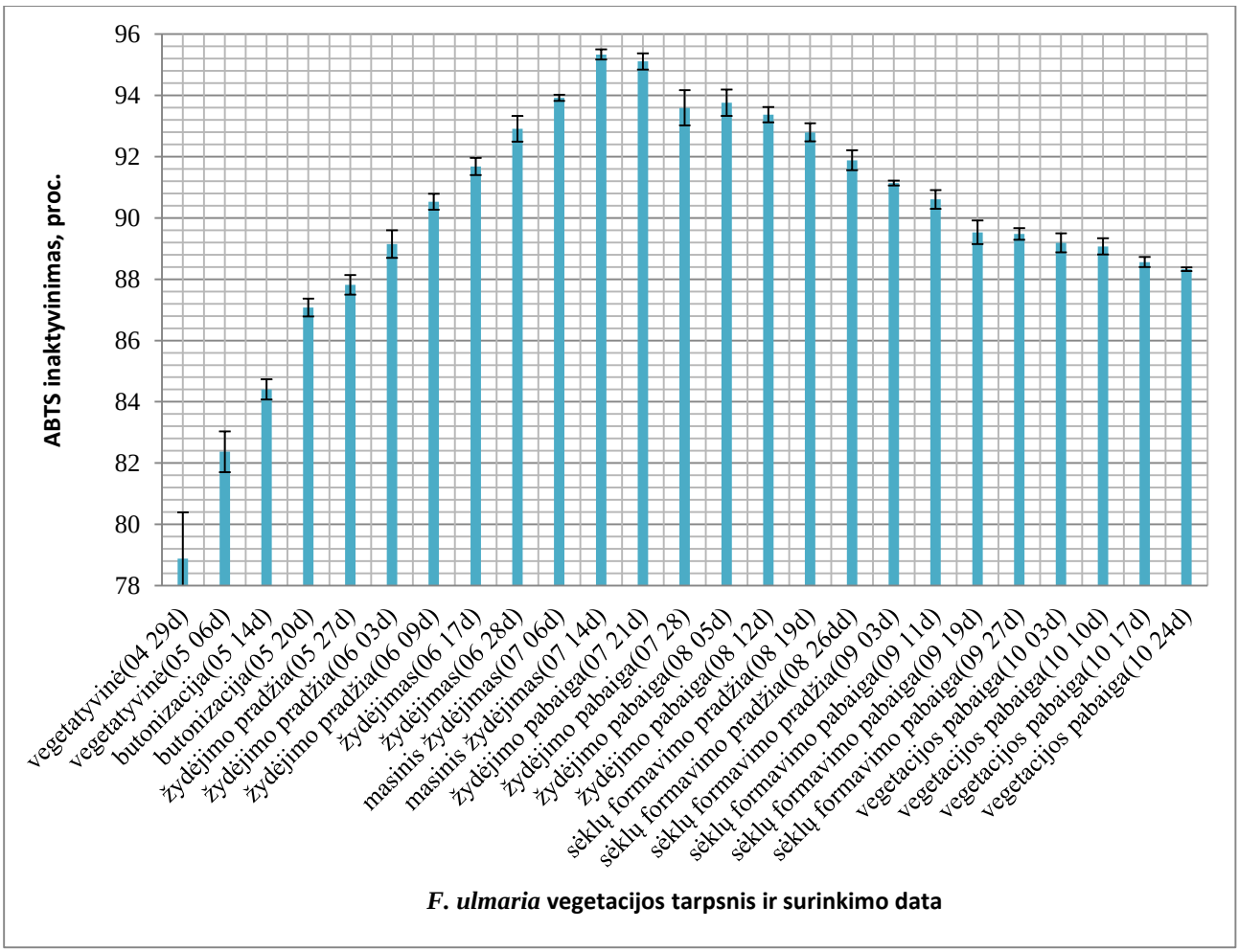
reakcijos pusiausvyra pasiekiama po 15 min. Duomenys, perskaičiuoti ABTS inaktyvinimo procentais, vaizduojami 13 paveiksle.



13 pav. ABTS inaktyvinimo priklausomybė nuo reakcijos trukmės

Iš grafiko nesunku pastebėti, kad surištų ABTS radikalų kiekis per 8 minutes sparčiai didėja nuo 81,01 ± 0,68 proc. iki 94, 82 ± 0,06 proc., vėliau išlieka panašus. Pusiausvyra visiškai pasiekiama po 15 min, inaktyvuotas ABTS radikalų kiekis siekia 95,1 ± 0,67 proc. Įdomu tai, kad per pirmąją rakcijos minutę surišama net 81,01 ± 0,68 proc ABTS radikalų, o per kitas 14 minučių – tik 14,09 %.

Pagal tokią pačią metodiką tirti visų vaistinio augalo 2012 metais rinktos vaistinės augalinės žaliavos etanoliniai ekstraktai. Stebėta, ar suminis flavonoidų ir taninų kiekis turi įtakos antiradikaliniam aktyvumui, išreikštam procentais – šiuo tikslu apskaičiuotas koreliacijos koeficientas. Tyrimas atliktas pagal tą pačią ABTS metodiką, leidžiant reakcijai vykti po 15 min., kol pasiekiama dinaminė reakcijos pusiausvyra. Tyrimas atliktas po tris kartus kiekvienam ekstraktui, atliekant po tris matavimus spektrofotometru (matuojant 10 mm storio tirpalo sluoksnį 734 nm bangos ilgyje). Antiradikalinio aktyvumo tyrimo rezultatatų kitimo dinamika pateikiama 14 paveiksle.



14 pav. ABTS inaktyvinimo dinamika, atsižvelgiant į pelkinių vingiorykščių žolės surinkimo datą ($p < 0,05$)

Iš grafiko matyti, kad surištų laisvųjų radikalų kiekis nuo augalo vegetacijos pradžios iki masinio žydėjimo tarpsnio nuolat didėja – nuo 78,88 ± 1,51 proc. iki 95,33 ± 0,16 proc. Po žydėjimo maksimumo ABTS laisvųjų radikalų surišimo geba nuolat mažėja iki 88,32 ± 0,06 proc. Statistiškai reikšmingas antiradikalinio aktyvumo stiprėjimas pastebimas prasidėjus butonizacjos tarpsniui ir tęsiasi iki masinio žydėjimo, o statistiškai reikšmingas antiradikalinio aktyvumo silpnėjimas pastebimas prasidėjus augalo žydėjimo pabaigos ir besitęsiantis iki augalo apnykimo ($p < 0,05$). Nuo intensyvaus augalo žydėjimo pradžios iki pat vaisių suformavimo ekstraktų antiradikalinis aktyvumas yra didesnis už vidutinį antiradikalinį aktyvumą (90,02 proc.) per visą augalo vegetaciją.

Pastebėta, kad polifenolinių junginių kiekis turi įtakos antiradikaliniam ekstraktų aktyvumui. Be to, nereikėtų pamiršti, kad didelę įtaką turi ne tik polifenolinių junginių kiekybinė, bet ir kokybinė sudėtis. Taip pat reikšmingą antiradikalinį aktyvumą šiuo atveju gali turėti ir kitos veikliosios medžiagos, pavyzdžiui, askorbo rūgštis. 2008 metais iš *F. ulmaria*, panaudojant koloninę chromatografiją, pirmą kartą buvo izoliuotas naujas kvercetino glikozidas, pavadintas filimarinu. Nustatyta, kad filimarinas turi didelį antioksidantinį aktyvumą, panašų į vieną stipriausių gamtinių

antioksidantų, t.y. askorbo rūgšties antioksidantinį aktyvumą ir dvigubai didesnį antioksidantinį aktyvumą už dihidrokvercetino antioksidantinį aktyvumą (nustatyta pagal kinetinį kriterijų). [111] Tai įrodo, kad svarbi ne tik kokybinė, bet ir kiekybinė polifenolinių junginių sudėtis.

Norint sužinoti, ar flavonoidų, raugų ir askorbo rūgšties kiekis lemia antiradikalinį pelkinių vingiorykščių ekstraktų aktyvumą, apskaičiuotas koreliacijos koeficientas (KK). Lyginant suminio flavonoidų kiekio ir antiradikalinio aktyvumo skaitines reikšmes, gautas KK, lygus 0,52. Tai reiškia, kad tarp suminio flavonoidų kiekio ir antiradikalinio aktyvumo būdinga vidutinė koreliacija. Lyginant suminio raugų kiekio ir antiradikalinio aktyvumo skaitines reikšmes, gautas KK, lygus 0,49; tai rodo silpną koreliaciją. Askorbo rūgšties KK yra artimas nuliui (0,02), tai reiškia, kad koreliacija yra labai silpna, beveik nereikšminga. Palyginus flavonoidų ir raugų KK, nesunku pastebėti, kad antiradikalinį vaistinio augalo aktyvumą jie lemia panašiai, tačiau suminio flavonoidų kiekio įtaka šiam poveikiui yra nors ir nežymiai, bet šiek tiek didesnė, nei suminio raugų kiekio.

Taigi, galima daryti išvadą, kad laisvųjų radikalų surišimo geba labiausiai priklauso būtent nuo polifenolinių junginių kiekio, tačiau, kaip minėta anksčiau, remiantis literatūros duomenimis, didelę įtaką gali turėti ir kokybinė sudėtis bei kiti antioksidantinį aktyvumą turintys junginiai, pavyzdžiui, tokie vitaminai, kaip askorbo rūgštis ir tokoferolis. Vadinasi, norint tiksliau nustatyti antiradikalinio aktyvumo priklausomybę nuo polifenolinių junginių kokybinių ir kiekybinių charakteristikų, kitų sudėtinių medžiagų, nuo augalo vegetacijos tarpsnio bei nuo kitų veiksnių, reikėtų atlikti išsamesnius bei ilgiau trunkančius tyrimus, taikant įvairias modelines sistemas ir pažangesnius medžiagų skirstymo metodus.

Daugiausiai tirtų BAM, t.y. net 20,01 proc. vaistinis augalas yra sukaupęs prieš pat masinį žydėjimą. Veikliųjų medžiagų kiekis panašus per visą intensyviausią augalo žydėjimą (19,1 – 20,01 proc.) ir pradeda reikšmingai statistiškai mažėti, vos tik prasidėjus nužydėjimo fazei. Vadinasi, vaistinis augalas didžiausią suminį flavonoidų, raugų ir vitamino C kiekį kaupia pirmoje žydėjimo pusėje. Tokie rezultatai sutampa su kitais mokslinėje literatūroje rastais autorių duomenimis apie pelkines vingiorykštes. [100, 102] Pastebėta, kad būtent šiuo vegetacijos tarpsniu vaistinis augalas būdingas didžiausias antiradikalinis aktyvumas. Norint sužinoti, ar šių veikliųjų medžiagų kiekis lemia antiradikalinį vaistinio augalo aktyvumą, apskaičiuotas KK; jis lygus 0,51. Tai reiškia, kad tarp suminio tirtų veikliųjų medžiagų kiekio ir antiradikalinio aktyvumo skaitinės reikšmės būdinga vidutinė koreliacija.

Remiantis literatūros duomenimis, labai svarbu, ne tik kaip, bet ir kada vaistinė augalinė žaliava yra renkama. Medicininiams tikslams skirtą vaistinę augalinę žaliavą geriausia rinkti žiedų ontogenezės metu, nes tada BAM kiekis daugumoje augalų pasiekia aukščiausią lygį. [112]

IŠVADOS

1. Atlikus optimalaus poliškumo tirpiklio parinkimą, maceraciją purtyklėje ir maceraciją ultragarso vonelėje, pagal suminį flavonoidų kiekį nustatyta, kad tinkamiausias ekstrahentas yra 70 proc. V/V etanolis, ekstrakcijos metodas - maceracija ultragarsu, vykdant ją 10 minučių.
2. Suminis flavonoidų kiekis *F.ulmaria* žolėje reikšmingai priklausė nuo augalo vegetacijos tarpsnio: didžiausias suminis flavonoidų kiekis aptiktas nuo augalo žydėjimo pradžios iki augalo žydėjimo pabaigos lyginant su augalo vegetacijos pradžia ir apnykimo periodu, o maksimalus kiekis nustatytas vaistinio augalo masinio žydėjimo laikotarpiu (3,49 proc.).
3. Askorbo rūgšties kiekis per vaistinio augalo vegetaciją reikšmingai kito: pirmojoje fenologinio vystymosi pusėje askorbo rūgšties kiekis buvo didesnis už vidutinį per visą vaistinio augalo vegetacijos laikotarpį (>0,03 proc.), antrojoje augalo fenologinio vystymosi pusėje, įpusėjus žydėjimui, jis pradėjo mažėti ir pačioje ontogenezės pabaigoje tapo pats mažiausias per visą vegetacijos laikotarpį. (0,01 proc.).
4. Suminis raugų kiekis augalo vegetacijos metu taip pat kito: maksimalus kiekis pasiektas prieš pelkinių vingiorykščių masinio žydėjimo tarpsnį (16,80 proc.), o ryškiausias suminio raugų kiekio kitimas nustatytas nuo vaistinio augalo žydėjimo pradžios iki žydėjimo pabaigos įpusėjimo.
5. 70 proc. etanoliu ekstrahuoti pelkinių vingiorykščių tirštieji ekstraktai, kuriuose vyravo flavonoidai, pasižymėjo šiek tiek didesniu antimikrobiniu poveikiu nei vandeniu ekstrahuoti tirštieji ekstraktai, kuriuose vyravo raugai, ypač prieš *E. faecalis* ir *B. subtilis* mikrobines kultūras. Mažiausiu atsparumu pasižymėjo *S.aureus, K.pneumoniae, P.mirabilis, B.cereus* mikrobinės kultūros, o didžiausias atsparumas būdingas buvo grybeliui *C.albicans*.
6. Surištų laisvųjų radikalų kiekis pelkinių vingiorykščių ekstraktuose nuo vegetacijos pradžios iki masinio žydėjimo tarpsnio nuolat statistiškai reikšmingai didėjo ir masinio žydėjimu metu pasiekė maksimumą (95,33 ± 0,16 proc.), o po masinio žydėjimo statistiškai reikšmingai mažėjo iki 88,32 ± 0,06 proc.
7. Palyginus suminio flavonoidų, suminio raugų ir askorbo rūgšties kiekių skaitines reikšmes su antiradikalinio aktyvumo skaitinėmis reikšmėmis, didžiausias koreliacijos koeficientas (0,52) buvo gautas lyginant su suminio flavonoidų kiekio skaitinėmis reikšmėmis; tai rodo vidutinę teigiamą koreliaciją.

LITERATŪRA

1. Ragažinskienė O. Rimkienė S. Sasnauskas V. Vaistinių augalų enciklopedija. Kaunas: Lututė, 2005. p. 410-411
2. Prieiga per Internetą. European Medicines Agency internetis puslapis. Monografija. [Žiūrėta 2013 10 05] <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2011/09/WC500115355.pdf
3. Prieiga per Internetą. [Žiūrėta 2013 11 17] Drugs.com – informacija apie vaistus profesionalams ir pacientams internete. <http://www.drugs.com/npp/meadowsweet.html>
4. Prieiga per Internetą. [Žiūrėta 2013 10 01] Miklušytė R. Augalų gentys – vingiorykštė: Pelkinė vingiorykštė (*Filipendula ulmaria* L.).<http://www.botanikos-sodas.vu.lt/lt/zalieji-puslapiai/augalu-gentys/vingiorykste>
5. Pakutkienė L. Sasnauskas V. 100 gamtos vaistų. Kaunas: Spindulys, 1998, p.196.
6. Murkaitė R. Karazija S. Lietuvos miškų augalai. Vilnius: Mokslas, 1977. p. 188
7. Grigas A. Lietuvos augalų vaisiai ir sėklos. Vilnius: Mokslas, 1986. p. 173
8. Gudžinskas Z. Lietuvos vaistiniai augalai. Kaunas: Šviesa, 2007, p. 150-151.
9. Šveistytė L. Vaistinių ir aromatinių augalų genetiniai ištekliai. Akademija: Augalų genų bankas, 2011 P. 213.
10. Naujalis J. Augalų populiacinė ekologija. Vilnius: Mokslo ir enciklopedijų leidykla, 1992. p. 63
11. Prieiga per Internetą. Plants for a future internetinis puslapis. [Žiūrėta 2013 10 03] <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Filipendula+ulmaria>
12. McHoy P. Westland P. The Herb Bible. Vilnius: Algarvė, 2010. p. 45
13. French Pharmacopoeia 2012. Meadowsweet/*Spiraea ulmaria* for homeopathic preparations.Prieiga internete: <http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/d17ac58d8918774744b14ad28a82e1f4.pdf>
14. Vasiliauskas A. Gastroduodeninės srities gleivinės oksidacinių procesų ir augalų tinktūrų poveikio eksperimentinis ir klinikinis įvertinimas. Daktaro disertacija, Vilnius, 2010. Prieiga internete: http://vddb.library.lt/fedora/get/LT-eLABa-0001:E.02~2006~D_20060530_224801-93007/DS.005.0.01.ETD
15. Smaliukas D. Lekavičius A. Butkus V. Lietuvos naudingieji augalai. Vilnius: Mokslo ir enciklopedijų leidykla, 1992. p. 214
16. Pakutkienė L. Sasnauskas V. 100 gamtos vaistų. Kaunas: Spindulys, 1998, p.196.

17. Dadákova E. Vrchotova N. Tříska J. Content of selected biologically active compounds in tea infusions of widely used European medicinal plants. *Journal of Agrobiology*, 27(1): 27–34, 2010.
18. Nikolova M. Dzhurmanski A. Evaluation of free radical scavenging capacity of extracts from cultivated plants. *Biotechnol. & biotechnol*. EQ. 23/2009/SE/. Special edition/on-line.
19. Barros L. Cabrita L. Boas MV. Carvalho AM. Ferreira I. Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chemistry* 127, 2011, 1600–1608.
20. Mildažienė V. Jarmalaitė S. Daugelavičius R. Ląstelės biologija. Kaunas: VDU leidykla, 2004, p. 293 – 307.
21. Prieiga per Internetą. [Žiūrėta 2013 10 17] Nature savaitinio tarptautinio mokslo žurnalo internetinis puslapis. <http://www.nature.com/nature/journal/v112/n2818/abs/112674a0.html>
22. Blazics B. Papp I. Kery A. LC–MS Qualitative Analysis and Simultaneous Determination of Six Filipendula Salicylates with Two Standards. *Chromatographia Supplement* Vol. 71, 2010.
23. Toiu A. Vlase l. Oniga I. Benedec D. Tămaş M. HPLC analysis of salicylic derivatives from natural products. *Farmacia*, Vol.59, 1, 2011
24. Eisenreich W. Handel A. Zimmer U. Išsamus augalų ir gyvūnų žinynas. Vilnius: Naujoji Rosma, 2007. p. 140
25. Kalvėnienė Z. Savickas A. Briedis V. Kompleksinio raminamojo fitopreparato vaikams technologija ir stabilumo įvertinimas. *Biomedicina*, t. 2, Nr. 2, 2002.
26. Raal A. Sõukand R. Classification of remedies and medical plants of Estonian ethnopharmacology. *TRAMES*, 2005, 9(59/54), 3, 259–267.
27. Y. Nitta et al. Food Chemistry. p. 1551–1556, 2013.
28. Braun L. Cohen M. Herbs & Natural Supplements. *Elsevier Australia*, 2010, P. 277-278.
29. Pemp E. Reznicek G. Krenn L. Fast Quantification of Flavonoids in Filipendulae Ulmariae Flos by HPLC/ESI-MS Using a Nonporous Stationary Phase. *Journal of Analytical Chemistry*, 2007, Vol. 62, No. 7.
30. Prieiga per Internetą. Sigma – Aldrich koorporacijos internetinis puslapis. [Žiūrėta 2013 10 30] < http://www.sigmaaldrich.com/life-science/nutrition-research/learning-center/plant-profiler/filipendula-ulmaria.html>
31. Dowdle H. The super simple guide to healing herbs: cure digestive ailments, seasonal colds, and mild aches and pains with these herbal home remedies.(PART ONE)(Report). J *Natural health*. 2009 vol:39. p. 60.

32. Nesterova I. Povet'eva TN. Aksinenko SG. Suslov NI. Gaĭdamovich NN. Nagorniak I. Popova EV. Kravtsova SS. Andreeva TI. Evaluation of anti-inflammatory activity of extracts from Siberian plants. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2009;(11):30-4.
33. Keturkienė A. Vaičiūnienė J. Leonavičienė A. Vaitkienė D. Jasiulevičiūtė L. Genytė L. Pelkinės vingiorykštės preparato gamybos būdas. Patentas nr. 4880, LR Valstybinis patentų biuras, 2002.
34. Leonavičienė L. Vaitkienė D. Keturkienė A. Bradūnaitė R. Vasiliauskas A. Eksperimentinis osteoartritas ir jo gydymas augaliniais preparatais. *Gerontologija*, 2008; 9(1): 34–48.
35. Halkes S.B.A. et al. In vitro immunomodulatory activity of *Filipendula ulmaria*. *Phytother*. Res. 11, 518–520, 1997.
36. Lamaison JL. Carnat A. Petitjean-Freytet C. Tannin content and inhibiting activity of elastase in *Rosaceae*. *Ann Pharm Fr*. 1990;48(6):335-40.
37. Zeylstra H. *Filipendila ulmaria. J Phytotherapy*, 1998;5:8–12.
38. Drummond EM. Harbourne N. Marete E. Martyn D. Jacquier J. O'Riordan D. Gibney ER. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. *Phytother Res*. 2013, p. 588-94
39. Churin AA. Masnaia NV. Shilova IV. Effect of *Filipendula ulmaria* extract on immune system of CBA/CaLac and C57Bl/6 mice. *Eksp Klin Farmakol*. 2008 Sep-Oct;71(5):32-6
40. Cwikla C. Schmidt K. Matthias A. Bone KM. Lehmann R, Tiralongo E. Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytother Res.* 2010 May;24(5):649.
41. Liapina LA, Koval'chuk GA. A comparative study of the action on the hemostatic system of extracts from the flowers and seeds of the meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 1993 Jul-Aug;(4):625-8.
42. Bove M. When GERD strikes: herbs and more that soothe and heal. *Better Nutrition*. vol:67. p. 46, 2005.
43. Calliste C. Trouillas P. Allais D. Simon A. Duroux J. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. J Agric Food Chem. 2001 Jul;49(7):3321-7.
44. Spiridonov NA. Konovalov DA. Arkhipov VV. Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plants and plant compounds. *Phytother Res.* 2005 May;19(5):428-32.
45. Peresun'ko AP. Bespalov VG. Limarenko AI. Aleksandrov VA. Clinico-experimental study of using plant preparations from the flowers of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim for the

treatment of precancerous changes and prevention of uterine cervical cancer. *Vopr Onkol*. 1993;39(7-12):291-5.

46. Liapina LA, Koval'chuk GA. A comparative study of the action on the hemostatic system of extracts from the flowers and seeds of the meadowsweet *(Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* 1993 Jul-Aug;(4):625-8.
47. Kudriashov B. Ammosova I. Liapina L. Osipova N. Azieva L. Liapin G. Basanova A. Heparin from the meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and its properties. *Izv Akad Nauk SSSR Biol.* 1991.
48. Kudriashov BA, Liapina LA, Azieva LD. The content of a heparin-like anticoagulant in the flowers of the meadowsweet (*Filipendula ulmaria*). *Farmakology Toksikology*. 1990 Jul-Aug;53(4):39-41.
49. Redzic S.J. Wild Edible Plants and Their Traditional Use in the Human Nutrition in Bosnia-Herzegovina, *Ecology of Food and Nutrition*. 2006. 45:3, 189-232.
50. Blumenthal M. Busse WR. Goldberg A. et al. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Austin: American Botanical Council and Boston: Integrative Medicine Communications, 1998, 169.
51. Moro PA. Flacco V. Cassetti F. Clementi V. Colombo ML. Chiesa GM. Menniti-Ippolito F. Raschetti R, Santuccio C. Hypovolemic shock due to severe gastrointestinal bleeding in a child taking an herbal syrup. *Ann Ist Super Sanita*. 2011;47(3):278-83.
52. Mačiulaitis R. Milašius A. Nepageidaujamos vaistų tarpusavio sąveikos. Kaunas: KMU spaudos ir leidybos centro leidykla, 2002, p.32.
53. Raudonis R. Raudonė L. Janulis V. Viškelis P. Antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo nustatymo metodai (apžvalga). *Sodininkystė ir daržininkystė*. 31(3–4), 2012.
54. Cesar G. Plant Phenolics and Human Health– Biochemistry, Nutrition and Pharmacology . Wiley. p.632
55. Stalikas D. C. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 3268 – 3295.
56. Prieiga per Internetą. Maisto papildų enciklopedija - internetinis puslapis. [Žiūrėta 2013 10 20] < http://www.mpe.lt/lt/mpe/medziagos,id,Vitaminas_P>
57. Pinheiro F. Gonçalo C. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds -A Review of Spectroscopic Applications, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition andHealth, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, 2012.
58. Jakštas V. Janulis V. Trumbeckaitė S. Cheminis fitopreparatų tyrimas. Kaunas: KMU spaudos ir leidybos centro leidykla, 2009, p. 71-94.

59. Baliūtytė G. Dviskiaučių ginkmedžių (*Ginkgo biloba* L.) lapų ekstraktų poveikis mitochondrijų oksidacinio fosforilinimo sistemai. Daktaro disertacija, LSMU: Biochemijos institutas, 2001, p. 22
60. Tapas A. Sakarkar D. Kakde R. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2008; 7 (3): 1089-1099.
61. Liobikas J. Trumbeckaitė S. Bendokas V. Baniulis L. Majienė D. Kopustinskienė D. L. Šikšniakas T. Anisimovienė N. Proapoptozinis juodojo serbento (*Ribes nigrum* L.) uogų poveikis žiurkės širdies mitochondrijoms. *Žemdirbystė – Agriculture*, t.96, nr. 3, 2009, p. 149
62. Puodžiūnienė G. Janulis V. Barsteigienė Z. Milašius A. Budnikas V. Vidurius laisvinančių vaistažolių arbatų kūrimas. *Medicinos teorija ir praktika* 2008 - T. 14, Nr. 4, 331–336 p.
63. Prieiga per Internetą. Žodynas.lt internetinis puslapis. [Žiūrėta 2013 11 01] <http://www.zodynas.lt/terminu-zodynas/T/taninai>
64. Khanbabaee K. van Ree T. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*, 2001, 18, 641–649.
65. Rangari VD. Tannin Containing Drugs. 2007. Prieiga Internete: <http://nsdl.niscair.res.in/bitstream/123456789/591/1/revised+Tannins+containing+Drugs.pdf>
66. Ramakrishnan K. Krishnan M.R. Tannin – classification, analysis and applications. *Ancient Science of Life*, Vol XIII Nr. 3, 1994, p. 232 – 238.
67. Janulis, V., Puodžiūnienė, G., Malinauskas, F. Fitocheminė analizė. Kaunas: KMU spaudos ir leidybos centro leidykla, 2008. 144 p.
68. Serrano J. Puupponen-Pimiä R. Dauer A. Aura AM. Fulgencio SC. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*. Volume 53, Issue 2, 2009. p.310 – 327.
69. Chung K. Wong T. Cheng I. Huang Y. Lin Y.Tannins and Human health: A Review. *Molecular Nutrition & Food Research*. Volume 38, Issue 6, 1998. P. 421 – 426.
70. Hassanat F. Benchaar C. Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* Volume 93, Issue 2, 2013. p. 332 – 339 .
71. Pellikaan W. Stringano E. Leenars J. Bongers D. Schuppen S. Plant J. Mueller – Harvey I. Evaluating effects of tannins on extent and rate of in vitro gas and CH4 production using an automated pressure evaluation system (APES). *J Animal Feed Science and Technology.* Volumes 166–167, 2011, p. 377–390.

72. Kumari M. Jain S. Tannins: An Antinutrient with Positive Effect to Manage Diabetes. *Research Journal of Recent Sciences*. Vol. 1(12), 2012, p. 70-73.
73. Kolodziej H. Kiderlen A. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. *J Phytochemistry.* Volume 66, Issue 17, 2005, p. 2056–2071
74. Praškevičius A. Burneckienė J. Ivanovienė L. Fermentai ir vitaminai. Kaunas: KMU spaudos ir leidybos centro leidykla, 2002, p.192-197.
75. Prieiga per Internetą. A service of the U.S. National Library of Medicine. [Žiūrėta 2013 11 01] Vitamin C. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002404.htm>
76. Mildažienė V. Jarmalaitė S. Daugelavičius R. Ląstelės biologija. Kaunas: VDU leidykla, 2004, p. 293 – 307.
77. Murray R. Bender A. Botham K. Kennelly P. Rodwell V. Weil P. Harpers Illustrated Biochemistry. McGraw Hill Professional, 2009, p. 480
78. Devlin T. M. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. John Wiley & Sons; 7 edition, 2010, p. 1084
79. Jarašūnienė D. Šimaitis A. Oksidacinis stresas ir endotelio disfunkcija. *Medicina*. 39 tomas, Nr. 12, 2003.
80. Jasutienė I. Viškelienė R. Mėlynių, juodųjų serbentų ir spanguolių sulčių bei ekstraktų sudėtis ir antioksidacinis aktyvumas. *Maisto chemija ir technologija*. 2006. T. 40, Nr. 1.
81. Ka¨hko¨nen et al. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 3954-3962
82. Ryzhikov MA. Ryzhikova VO. Application of chemiluminescent methods for analysis of the antioxidant activity of herbal extracts. *Vopr Pitan*. 2006;75(2):22-6.
83. Sroka Z. Cisowski W. Seredyńska M. Luczkiewicz M. Phenolic extracts from meadowsweet and hawthorn flowers have antioxidative properties. *Z Naturforsch* C. 2001 Sep-Oct;56(9-10):739-44.
84. Pavilonis A. Lasinskaitė-Čerkašina A. Vaičiuvėnas V. Akramas L. Medicinos mikrobiologijos pagrindai. Kaunas: KMU spaudos ir leidybos centro leidykla, 2000, p. 47 – 197.
85. Šalomskienė J. Bartiuk T. *Bacillus cereus* maisto produktuose ir jų nustatymo metodai (apžvalga). *Maisto chemija ir technologija.* 2006. T. 40, Nr. 1
86. Prieiga per Internetą. Medicininis portalas. [Žiūrėta 2013 11 09] <http://veek.lt/enterobacteriaceae-seimos-bakteriju-isskirtu-is-kraujo-chirurginiame-skyriuje-gydytiems-pacientams-atsparumo-antibiotikams-analize,t1788>

87. Prieiga per Internetą. Vakarų Lietuvos Medicinos internetinis puslapis. [Žiūrėta 2013 11 05] <http://www.vlmedicina.lt/2012/06/atrastas-vienas-is-letiniu-uzdegiminiu-zarnyno-ligu-issivystymo-mechanizmu>
88. Prieiga per Internetą. VDU Gamtos mokslų fakulteto internetinis puslapis. [Žiūrėta 2013 11 06] <http://gamta.vdu.lt/bakalaurai/pop_straipsniai/pseudomonas_aeruginosa/pseudomonas_aeruginosa.htm>
89. Prieiga per Internetą. Visivaistai.lt internetinis puslapis. [Žiūrėta 2013 11 06] <http://www.visivaistai.lt/Ligos/Odos_ir_nag%C5%B3_kandidoz%C4%97/135>
90. Bergner P. Filipendula: Antibiotic activity of meadowsweet. *Medical Herbalism* 6(1):13, 2001.
91. L. Barros et al. Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *J Industrial Crops and Products* 44 (2013) 104–110.
92. Jakštas, V. Lietuvoje augančių gudobelės (*Crataegus* L.) Genties augalų fitocheminės sudėties įvertinimas. Daktaro disertacija. Kaunas, 2005. p. 38
93. Pupelienė, I., Ramonaitytė, D. T. Majaro reakcijų produktų antiradikalinės savybės modelinėse sistemose. *Maisto chemija ir technologija.* 2008. T.42, Nr. 2.
94. Rea R. Pellegrinia N. Proteggentea A. Pannalaa A. Yanga M. Rice-Evansa C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *J Free Radical Biology and Medicine.* Volume 26, Issues 9–10, 1999, p.1231 – 1232.
95. Andersen M. Markham R.K. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. Boca Raton: Taylor and Francis Group. 2006.
96. Shilova I. V. et al. Antioxidant properties of extracts from the above-ground parts of *Filipendula ulmaria. J Pharmaceutical Chemistry*. Vol. 40, No. 12, 2006.
97. Shilova IV. Semenov AA. Suslov NI. Korotkova EI. Vtorushina AN. Belyakova VV. Chemical composition and biological activity of a fraction of meadowsweet extract. *Pharmaceutical Chemistry Journal* Vol. 43, No. 4, 2009.
98. Vičkačkaitė V., Ekstrakciniai mėginio paruošimo dujų chromatografinei analizei metodai. Vilnius: Vilniaus universitetas, 2008, p. 4, 16.
99. Biesaga M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography* A. Volume 1218, Issue 18, 2011, p. 2505–2512
100. Bashilov, A.V. Accumulation of biologically active substances depending on phases of vegetation in plant raw materials of the representatives of *Filipendula* Mill. and

Polemonium L. genus. Vestsi Natsyyanal'naj Akadehmii Navuk Belarusi. Seryya Biyalagichnykh Navuk. Nr. 2, 2008.

101. Cirak C. Radusiene J. Ivanauskas L. Jakstas V. Camas N. Phenological changes in the chemical content of wild and greenhouse-1 grown *Hypericum pruinatum*: Flavonoids. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 37:1, 2013.
102. Baczek K. Cygan M. Przybyl J. Kosakowska O. Weglarz Z. Seasonal variation of phenolics content in above- and underground organs of dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench). *J Herba Polonica.* Vol. 58 No. 3 2012.
103. Savickienė N. Dagilytė A. Barsteigienė Z. Kazlauskas S. Vaičiūnienė J. Flavonoidų analizė raudonosios monardos (*Monarda didyma* L.) žieduose ir lapuose. *J Medicina*, 38 tomas, Nr. 11, 2002.
104. Harbourne N. Christophe Jacquier J. O'Riordan D. Optimisation of the aqueous extraction conditions of phenols from meadowsweet (*Filipendula ulmaria* L.) for incorporation into beverages. *Food Chemistry* 116 722–727, 2009.
105. Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol*. 2000 May 25;56(1):3-12.
106. Boziaris IS. et al.: Antimicrobial Effect of *F. ulmaria* Against Foodborne Bacteria, *Food Technol. Biotechnol.* 49 (2) 263–270, 2011.
107. Proestos C. et al.: Antioxidant Constituents from Aromatic Plants, *Food Technol. Biotechnol.* 46 (2) 151–156, 2008.
108. Turker, H.; Yıldırım, A. B.; Karakaş, F. P. Sensitivity of bacteria isolated from fish to some medicinal plants. *J Fisheries and Aquatic Sciences* 2009 Vol. 9 No. 2 p. 185.
109. Kalibatienė D. Aleknienė B. Aleknaitė S. Infekcijos sukeltos ligos ir jų gydymas vidaus ligų skyriuje. *Medicinos teorija ir praktika* 2011 - T. 17 (Nr. 4), p. 533.
110. Kahkonen M. et al. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 3954−3962
111. Krasnov E. Raldugin V. Avdeeva E. Filimarin, a new flavanol glycoside from *Filipendula ulmaria* and its antioxidant activity. *J Pharmaceutical Chemistry*. Vol. 43, No. 11, 2009.
112. Cirak C, Radusiene J, Camas N, Caliskan O, Odabas MS. Changes in the contents of main secondary metabolites in two Turkish *Hypericum* species during plant development. *Pharm Biol*. 51(3):391-9, 2013.

113. Tsimogiannis D. Samiotaki M. Panayotou G. Oreopoulou V. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *J Molecules* 2007, 12, 593-606.

114. Yıldırım AB. Turker AU. In vitro adventitious shoot regeneration of the medicinal plant meadowsweet (Filipendula ulmaria (L.) Maxim). In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant (2009) 45:135–144.