

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

AUŠRA ADOMĖNIENĖ

*DIOSCOREA L. IR ASTRAGALUS L. AUGALŲ
RŪŠIŲ EKSTRAKTŲ FITOCHEMINĖS
SUDĖTIES IR FIZIOLOGIŠKAI SVARBIŲ
FERMENTŲ INHIBAVIMO ĮVERTINIMAS*

Daktaro disertacija
Gamtos mokslai, chemija (N 003)

Kaunas, 2023

Disertacija rengta 2017–2022 m. Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakulteto Maisto mokslo ir technologijos katedroje.

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Petras Rimantas VENSKUTONIS (Kauno technologijos universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

Redagavo: anglų kalbos redaktorė Dovilė Blaudžiūnienė (leidykla „Technologija“), lietuvių kalbos redaktorė Aurelija Gražina Rukšaitė (leidykla „Technologija“)

Chemijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

prof. habil. dr. Vytautas MICKEVIČIUS (Kauno technologijos universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003) – **pirmininkas**;

prof. dr. Vytas MARTYNAITIS (Kauno technologijos universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003);

doc. dr. Milda PUKALSKIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005);

prof. dr. Dalija SEGLINA (Latvijos gyvybės mokslų ir technologijų universiteto Sodininkystės institutas, Latvija, gamtos mokslai, chemija, N 003);

doc. dr. Mantas STANKEVIČIUS (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

Disertacija bus ginama viešame chemijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2023 m. birželio 22 d. 10 val. Kauno technologijos universiteto Studentų miestelio bibliotekoje, salėje M7.

Adresas: Studentų g. 48, Kaunas, LT-51367, Lietuva
Tel. (+370) 608 28 527; el. paštas doktorantura@ktu.lt

Disertacija išsiųsta 2023 m. gegužės 22 d.

Su disertacija galima susipažinti interneto svetainėje <http://ktu.edu> ir Kauno technologijos universiteto bibliotekoje (K. Donelaičio g. 20, Kaunas, LT-44239, Lietuva)

KAUNAS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

AUŠRA ADOMĖNIENĖ

EVALUATION OF PHYTOCHEMICAL
COMPOSITION AND PHYSIOLOGICALLY
IMPORTANT ENZYME INHIBITING
PROPERTIES OF *DIOSCOREA* L. AND
ASTRAGALUS L. EXTRACTS PLANT SPECIES

Doctoral Dissertation
Natural Sciences, Chemistry (N 003)

Kaunas, 2023

This doctoral dissertation was prepared at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology, Department of Food Science and Technology during the period 2017–2022.

Scientific supervisor:

Prof. Dr. Petras Rimantas VENSKUTONIS (Kaunas University of Technology, Natural Sciences, Chemistry, N 003).

Edited by: English language editor Dovilė Blaudžiūnienė (Publishing House *Technologija*), Lithuanian language editor Aurelija Gražina Rukšaitė (Publishing House *Technologija*)

Dissertation Defense Board of Chemistry Science Field:

Prof. Dr. Hab. Vytautas MICKEVIČIUS (Kaunas University of Technology, Natural Science, Chemistry, N 003) – **chairperson**;

Prof. Dr. Vytas MARTYNAITIS (Kaunas University of Technology, Natural Science, Chemistry, N 003);

Assoc. Prof. Dr. Milda PUKALSKIENĖ (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005);

Prof. Dr. Dalija SEGLINA (Latvia University of Life Sciences and Technologies, Institute of Horticulture, Latvia, Natural Sciences, Chemistry, N 003);

Assoc. Prof. Dr. Mantas STANKEVIČIUS (Vytauto Didžiojo universitetas, Natural Science, Chemistry, N 003).

The official defense of the dissertation will be held at 10 a.m on 22 June, 2023 at the public meeting of Dissertation Defense Board of Chemistry Sciences Field in M7 Hall at The Campus Library of Kaunas University of Technology.

Address: Studentų 48, Kaunas, LT-51367, Lithuania.

Phone: (+370) 608 28 527; e-mail doktorantura@ktu.lt

The doctoral dissertation was sent out on 22 of May, 2023.

The doctoral dissertation is available on the internet <http://ktu.edu> and the library of Kaunas University of Technology (K. Donelaičio 20, Kaunas, LT-44239, Lithuania).

TURINYS

LENTELIŲ SĄRAŠAS	8
PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	9
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	11
ĮVADAS	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	17
1.1. <i>Dioscorea</i> genties ir <i>Astragalus</i> genties augalų rūšių apžvalga	17
1.1.1. <i>Dioscorea</i> genties augalų rūšių paplitimas / taksonomija ir morfologiniai požymiai	17
1.1.2. <i>Astragalus</i> genties augalų rūšių paplitimas / taksonomija ir morfologiniai požymiai	17
1.1.3. <i>Dioscorea</i> L. genties augalų rūšyse aptinkami junginiai ir jų naudojimas fiziologiniuose / molekulinuose tyrimuose	18
1.1.4. <i>Dioscorea</i> L. genties augalų rūšių vartojimas medicinos praktikoje	23
1.1.4.1. <i>D. caucasica</i> , <i>D. nipponica</i> augalų rūšių vartojimas medicinos praktikoje ..	23
1.1.5. <i>Astragalus</i> L. genties augalų rūšyse aptinkami junginiai ir jų naudojimas fiziologiniuose / molekulinuose tyrimuose	26
1.1.6. <i>Astragalus glycyphyllos</i> L. vartojimas medicinoje	32
1.2. Hidrolazės, jų veikimo mechanizmai ir gamtiniai inhibitoriai	33
1.2.1. Trumpa hidrolazės klasės charakteristika	33
1.2.2. Hidrolazės, veikiančios O-glikozidinius ryšius polisacharidų molekulėse	34
1.2.2.1. α -gliukozidazės ir α -amilazės gamtiniai inhibitoriai	35
1.2.3. Hidrolazės, veikiančios karboksirūgščių esterių ryšius	37
1.2.3.1. Acetilcholinesterazės gamtiniai inhibitoriai	38
1.2.4. Hidrolazės, veikiančios peptidinius ryšius oligopeptiduose	40
1.2.4.1. Angiotenziną konvertuojančio fermento gamtiniai inhibitoriai	40
1.2.5. Hidrolazės fermentų aktyvumo tyrimo metodai	42
2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI	47
2.1. Tyrimų objektai	47
2.2. Reagentai	47
2.3. Liofilizuoto etanolinio ekstrakto paruošimas	48
2.4. Fermentinių reakcijų mišinių paruošimas	48
2.4.1. Fermentinės reakcijos mišinio paruošimas α -gliukozidazės aktyvumui nustatyti	49
2.4.2. Fermentinės reakcijos mišinio paruošimas α -amilazės aktyvumui nustatyti	50
2.4.3. Fermentinės reakcijos mišinio paruošimas AChE aktyvumui nustatyti	50
2.4.4. Fermentinės reakcijos mišinio paruošimas AKF aktyvumui nustatyti	51
2.5. Kinetinių savybių įvertinimas	51
2.6. Junginių identifikavimo sąlygos ultraefektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos (UESC-MS/MS) metodu	53
2.7. Junginių kiekio nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodu	53
2.8. Statistiniai duomenų apdorojimo metodai	55
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	56
3.1. Junginių nustatymas ultraefektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos (UESC-MS/MS) metodu	56
3.1.1. Junginių profiliai <i>D. caucasica</i> Lipsky lapų ir šakniastiebiuose ekstraktuose	56
3.1.2. Junginių profiliai <i>D. nipponica</i> Makino lapų ir šakniastiebių ekstraktuose	64
3.1.3. Junginių kiekiai <i>Dioscorea</i> spp. ekstraktuose	74
3.1.4. Junginių profiliai <i>A. glycyphyllos</i> L. lapų ekstraktuose	75

3.2.	Fermentų aktyvumo nustatymas.....	77
3.2.1.	α -gliukozidazės aktyvumo nustatymas <i>in vitro</i>	77
3.2.1.1.	Kaukazinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio α -gliukozidazės fermentui įvertinimas	77
3.2.1.1.1.	Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas.....	79
3.2.1.2.	Niponinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio α -gliukozidazės fermentui įvertinimas	83
3.2.1.2.1.	Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas.....	86
3.2.1.3.	Saldžialapės kulkšnės ekstraktų slopinamojo poveikio α -gliukozidazės fermentui įvertinimas	88
3.2.1.3.1.	Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas.....	89
3.2.2.	α -amilazės aktyvumo nustatymas <i>in vitro</i>	91
3.2.2.1.	Kaukazinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio α -amilazės fermentui įvertinimas	91
3.2.2.2.	Niponinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio α -amilazės fermentui įvertinimas	92
3.2.2.3.	Saldžialapės kulkšnės ekstraktų slopinamojo poveikio α -amilazės fermentui įvertinimas	93
3.2.3.	Angiotenziną konvertuojančio fermento aktyvumo nustatymas <i>in vitro</i>	94
3.2.3.1.	Kaukazinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio AKF fermentui įvertinimas	94
3.2.3.2.	Niponinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio AKF fermentui įvertinimas	95
3.2.3.3.	Saldžialapės kulkšnės ekstraktų slopinamojo poveikio AKF fermentui įvertinimas	96
3.2.4.	Acetilcholinesterazės aktyvumo nustatymas <i>in vitro</i>	97
3.2.4.1.	Kaukazinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio AChE fermentui įvertinimas	97
3.2.4.1.1.	Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas.....	98
3.2.4.2.	Niponinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio AChE fermentui įvertinimas	99
3.2.4.2.1.	Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas.....	100
3.2.4.3.	Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas tiriant <i>A. glycyphyllos</i> L. lapų elstrakto slopinamojo poveikio gebą AChE fermentui	102
	IŠVADOS.....	105
4.	SUMMARY	107
4.1.	RELEVANCE OF THE RESEARCH.....	107
4.2.	RESULTS AND THEIR DISCUSSION	113
4.2.1.	Profiles of compounds in leaf and rhizome extracts of <i>D. caucasica</i> Lipsky.....	113
4.2.2.	Profiles of compounds in <i>D. nipponica</i> Makino leaf and rhizome extracts.....	120
4.2.3.	Profiles of compounds in leaf extracts <i>A. glycyphyllos</i> L.....	130
4.2.4.	Determination of enzyme activity	131
4.2.4.1.	Evaluation of inhibition of <i>D. caucasica</i> extract on α -glucosidase enzyme.....	131
4.2.4.1.1.	Kinetic modeling of enzymatic reactions	133
4.2.4.2.	Evaluation of inhibition extracts of <i>D. nipponica</i> extracts on α -glucosidase enzyme	136
4.2.4.2.1.	Kinetic modeling of enzymatic reactions	139
4.2.4.3.	Evaluation of inhibition of <i>A. glycyphyllos</i> extracts on α -glucosidase enzyme.....	142
4.2.4.3.1.	Kinetic modeling of enzymatic reactions	143

4.2.4.4.	Evaluation of inhibition of extracts of <i>D. caucasica</i> on α -amylase enzyme	144
4.2.4.5.	Evaluation of inhibition of extracts of <i>D. nipponica</i> on α -amylase enzyme	145
4.2.4.6.	Evaluation of inhibition of extracts of <i>A. glycyphyllos</i> on α -amylase enzyme	146
4.2.4.7.	Evaluation of inhibition of <i>D. caucasica</i> extracts on ACE enzyme	147
4.2.4.8.	Evaluation of the inhibition of <i>D. nipponica</i> extracts on ACE enzyme	148
4.2.4.9.	Evaluation of inhibition of <i>A. glycyphyllos</i> extracts on ACE enzyme	149
4.2.4.10.	Evaluation of inhibition of <i>D. caucasica</i> extracts on AChE enzyme	149
4.2.4.10.1.	Kinetic modeling of enzymatic reactions	150
4.2.4.11.	Evaluation of inhibition of <i>D. nipponica</i> extracts on AChE enzyme	151
4.2.4.11.1.	Kinetic modeling of enzymatic reactions	153
4.2.4.12.	Kinetic modeling of enzymatic reaction investigating inhibition capacity of <i>A. glycyphyllos</i> L. leaf extract on AChE	154
LITERATŪRA		158
INFORMACIJA APIE AUTOREŅI		174
MOKSLINIŅU PUBLIKACIJŅU DISERTACIJOS TEMA SĀRAŠAS		175
PADĒKA		178
PRIEDAI		179

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1.1 lentelė. Ankstesniuose tyrimuose identifikuoti antriniai metabolitai <i>D. nipponica</i> ir <i>D. caucasica</i> rūšyse.....	19
1.2 lentelė. Niponinės dioskorėjos augalinių ruošinių biologinių tyrimų įvairovė.....	24
1.3 lentelė. Ankstesniuose tyrimuose identifikuoti antriniai metabolitai <i>Astragalus</i> L. genties rūšyse	27
1.4 lentelė. <i>Astragalus</i> L. genties augalų rūšių augalinių ruošinių biologinių tyrimų įvairovė	31
1.5 lentelė. Virškinimo fermentai, skaidantys angliavandenius	34
1.6 lentelė. Ankstesnėse studijose atlikti <i>Astragalus</i> genties rūšių slopinamojo poveikio fermentams tyrimai	39
1.7 lentelė. Angiotenziną konvertuojančio fermento gamtiniai inhibitoriai (AKFI)	41
2.1 lentelė. Slopinimo tipo modelių paaiškinimai	52
3.1 lentelė. <i>D.caucasica</i> Lipsky, lapų ir šakniastiebių ekstraktuose nustatyti junginiai UESC/Q-TOF-MS/MS metodu.....	57
3.2 lentelė. <i>D.nipponica</i> Makino, lapų ir šakniastiebių ekstraktuose nustatyti junginiai UESC/Q-TOF-MS/MS metodu.....	65
3.3 lentelė. <i>A. glycyphyllos</i> L. lapų ekstraktuose nustatyti junginiai UESC/Q-TOF-MS/MS metodu.....	75
3.4 lentelė. α -gliukozidazės aktyvumo pokyčio skirtumas tarp dviejų biologinių tyrimų	79
3.5 lentelė. Kinetinių parametrų analizės įverčiai	83
3.6 lentelė. α -gliukozidazės aktyvumo pokyčio skirtumas tarp dviejų biologinių tyrimų	85
3.7 lentelė. Kinetinių parametrų analizės įverčiai	87
3.8 lentelė. Saldžialapės kulkšnės (<i>A. glycyphyllos</i> L.) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -gliukozidazės aktyvumui	89
3.9 lentelė. Kinetinių parametrų analizės įverčiai	90
3.10 lentelė. Kaukazinės dioskorėjos (<i>D. caucasica</i> Lipsky) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AChE aktyvumui	98
3.11 lentelė. Kinetinių parametrų analizės įverčiai	101

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1.1 pav. Hidrolizės reakcija. Acetilcholinesterazės sąveika su acetilcholinu. Acetilcholino virtimas cholinu katalizuojant acetilcholinesterazei	37
1.2 pav. Acetilcholino hidrolizės reakcijos vyksmas katalizuojant acetilcholinesterazės fermentui (AChE)	38
1.3 pav. Angiotenzino I virtimas angiotenzinu II katalizuojant AKF.....	40
1.4 pav. <i>p</i> -Nitrofenil- α - <i>D</i> -gliukopiranozido virtimas <i>p</i> -nitrofenoliu katalizuojant α -gliukozidazei	43
1.5 pav. Acetiltiocholino jodido virtimas tiocholinu katalizuojant acetilcholinesterazei ir chromoforo susidarymas reaguojant su Elmano reagentu	44
1.6 pav. Hipuril-His-Leu struktūrinė formulė	45
2.1 pav. Tyrimo proceso eiliškumo schema	54
3.1 pav. <i>D. caucasica</i> Lipsky (B) ir <i>D. nipponica</i> Makino (C) lapų ir šakniastiebių etanolinio ekstrakto chromatografiniai profiliai, vaizduojantys keletą fenolinių junginių	74
3.2 pav. Kaukazinės dioskorėjos (<i>D. caucasica</i>) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -gliukozidazės aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose <i>in vitro</i> (A, B).....	77
3.3 pav. Kaukazinės dioskorėjos (<i>D. caucasica</i> Lipsky) lapų etanolinio ekstrakto sukeltas tariamasis nekonkurencinis (mišraus tipo) slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui	81
3.4 pav. Kaukazinės dioskorėjos (<i>D. caucasica</i> Lipsky) šakniastiebių ekstrakto sukeltas tariamasis konkurencinis slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui	82
3.5 pav. Niponinės dioskorėjos (<i>D. nipponica</i>) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -gliukozidazės aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose <i>in vitro</i> (A, B)	84
3.6 pav. Niponinės dioskorėjos (<i>D. nipponica</i> Makino) lapų etanolinio ekstrakto sukeltas tariamasis nekonkurencinis (mišraus tipo) slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui	86
3.7 pav. Niponinės dioskorėjos (<i>D. nipponica</i> Makino) šakniastiebių etanolinio ekstrakto sukeltas tariamasis nekonkurencinis (mišraus tipo) slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui.....	88
3.8 pav. Saldžialapės kulkšnės (<i>A. glycyphyllos</i> L.) lapų ekstrakto sukeltas tariamasis bekonkurencinis slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui	90
3.9 pav. Kaukazinės dioskorėjos (<i>D. caucasica</i>) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -amilazės aktyvumui (A) ir akarbozės vandeninio tirpalo poveikis α -amilazės aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose <i>in vitro</i> (B)	91
3.10 pav. Niponinės dioskorėjos (<i>D. nipponica</i>) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -amilazės aktyvumui (A) ir akarbozės vandeninio tirpalo poveikis α -amilazės aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose <i>in vitro</i> (B).....	92
3.11 pav. Saldžialapės kulkšnės (<i>A. glycyphyllos</i>) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -amilazės aktyvumui (A) ir akarbozės vandeninio tirpalo poveikis α -amilazės aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose <i>in vitro</i> (B).....	93
3.12 pav. Kaukazinės dioskorėjos (<i>D. caucasica</i>) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AKF aktyvumui (A) ir kaptoprilio vandeninio tirpalo poveikis AKF aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose <i>in vitro</i> (B).....	94
3.13 pav. Niponinės dioskorėjos (<i>D. nipponica</i>) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AKF aktyvumui (A) ir kaptoprilio vandeninio tirpalo poveikis AKF aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose <i>in vitro</i> (B).....	95

3.14 pav. Saldžialapės kulkšnės (<i>A. glycyphyllos</i>) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AKF aktyvumui (A) ir kaptoprilio vandeninio tirpalo poveikis AKF aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose <i>in vitro</i> (B).....	96
3.15 pav. Chromoforo susidarymas reaguojant su Elmano reagentu	97
3.16 pav. Kaukazinės dioskorėjos (<i>D. caucasica</i> Lipsky) lapų ekstrakto sukeltas tariamasis bekonkurencinis slopinamasis poveikis AChE fermentui.....	98
3.17 pav. Niponinės dioskorėjos (<i>D. nipponica</i>) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AChE aktyvumui (A) ir donepezilio hidrochlorido vandeninio tirpalo poveikis AChE aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose <i>in vitro</i> (B).....	99
3.18 pav. Niponinės dioskorėjos (<i>D. nipponica</i> Makino) lapų ekstrakto sukeltas tariamasis bekonkurencinis slopinamasis poveikis AChE fermentui.....	101
3.19 pav. Saldžialapės kulkšnės (<i>A. glycyphyllos</i> L.) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AChE aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose <i>in vitro</i> , turinčiose skirtingas substratų koncentracijas (0,12 mM – 0,24 mM)	102

SANTRUMPU ŠARAŠAS

ACh – acetilcholinai
AChE – acetilcholinesterazė
AChEI – acetilcholinesterazės inhibitorius
AGE – galutiniai glikacijos produktai
AKF, AKF-I – angiotenziną konvertuojantis fermentas
ATChI – acetiltiocholino jodidas
CAT (angl. *catalase*) – katalazė
[E] (angl. *enzyme*) – fermento koncentracija
ESC – efektyvioji skysčių chromatografija
HACU (angl. *the activity of high-affinity choline uptake*) – didelio afiniteto cholino pasisavinimo sistema
IC₅₀ – medžiagos koncentracija, reikalinga pusei maksimalaus slopinamojo poveikio sukelti
ID Nr. – identifikavimo numeris
IFN (-α,-β ar -γ) – alfa, beta ar gama interferonas
IL (-1,-1β,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-10,-12,-13,-17 ar -23) – interleukinai
[I] – inhibitoriaus / slopinklio koncentracija
IUMB (angl. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) – Tarptautinė biochemijos ir molekulinės biologijos sąjunga
KE – katalizinis efektyvumas
K_i – inhibicijos konstanta
K_m – Michaelio ir Menteno konstanta
GH – glikozidų hidrolazės
GPx (angl. *glutathione peroxidase*) – glutationo peroksidazė
LPS (angl. *lipopolysaccharides*) – lipopolisacharidas
m/v – masės ir tūrio santykis
m/z – molekulinės masės ir krūvio santykis
[M – H]⁻ – neprotonizuotas molekulinis jonas
MS – masių spektrometrija
MS/MS – tandeminis masių spektrometras
NK ląstelė (angl. *natural killer*) – natūralus žudikas
NKT (angl. *natural killer T cells*) – T ląstelės žudikės
NMR (angl. *nuclear magnetic resonance*) – magnetinis branduolių rezonansas MBR
PDA (angl. *photodiode array*) – fotodiodų matricos detektorius
pH – vandenilio jonų koncentracija
p-NP – p-nitrofenolis
p-NPG – p-nitrofenil-α-D-gliukopiranozidas
proc. – procentai
RDN (angl. *rhizome of Dioscorea nipponica* Makino) – tradicinis augalinis *D. nipponica* Makino šakniastiebių preparatas
SE (angl. *standard error mean*) – vidutinė standartinė paklaida
SN (angl. *standard deviation mean*) – vidutinis standartinis nuokrypis

TNB (angl. *o*-nitro benzoic acid) – 2-nitro-5-tiobenzoinė rūgštis

TNF (- α arba - β) (angl. *tumor necrosis factor*) – alfa arba beta navikų nekrozės veiksnys

t_R (angl. *time retention*) – sulaikymo laikas

UESC/Q-TOF-MS/MS (ang. *ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry*) – ultraefektyvioji skysčių chromatografija su kvadrupoliniu skriejimo laiko masių spektrometru

UESC – ultraefektyvioji skysčių chromatografija

v/v – tūrių santykis

V_{max} – didžiausias reakcijos greitis

α -GLU – α -gliukozidazė

SOD – superoksido dismutazė

ĮVADAS

Temos aktualumas

Tiriant vaistinių ir kitų augalų fitocheminę sudėtį bei biologines savybes, sukaupiama vis daugiau mokslinės informacijos apie naujus ir / ar žinomus augalinius ruošinius¹, galinčius turėti teigiamą fiziologinį poveikį įvairioms žmogaus organizmo funkcijoms. Tokia mokslinė informacija labai prisideda kuriant ir gaminant ingredientus aukštesnės biologinės vertės maisto produktams, farmacijos preparatams ir kosmetikos gaminiams. Per pastaruosius kelis dešimtmečius ypač plačiai buvo tiriamas antioksidantinis įvairių augalų potencialas ir jį sukuriančios fitocheminės medžiagos, sparčiai vystėsi ir kitų sveikatai naudingų savybių tyrimai – vėžinių ląstelių proliferacijos slopinimas, antimikrobinis, antiuždegiminis ir kitoks aktyvumas. Atliekant šiuos tyrimus gaunami svarbūs duomenys naujiems maistinių medžiagų sveikumo teiginiams pagrįsti, moksliškai patvirtinamos dažnai empirinės tradicinės medicinos žinios, praplečiamos neigiamų fiziologinių procesų bei pokyčių kontrolės ir pakoregavimo galimybės žmogaus organizme taikant inovatyvius mitybos sprendimus.

Medicinos mokslo seniai įrodyta daugelio fermentų aktyvumo kontrolės svarba. Pavyzdžiui, pripažįstama, kad angliavandenių apykaitos sutrikimo, demencijos, padidėjusio kraujospūdžio ir kai kurių kitų sveikatos sutrikimų atvejais tam tikrų hidrolazės fermentų slopinimas² yra svarbus moduluojant fiziologines funkcijas žmogaus organizme. Pripažįstama ir tai, kad prie šių neigiamų fiziologinių funkcijų prevencijos, rizikos sumažinimo bei kompleksinės terapijos gali reikšmingai prisidėti ir efektyvus vaistiniuose ir kituose augaluose esančių fitocheminių medžiagų, pasižyminčių inhibiciniu poveikiu, panaudojimas. Tam, kad tokie augalai galėtų būti tikslingai pritaikomi įvairių ligų prevencijai, reikia patikimais ir šiuolaikiškais moksliniais tyrimais gauti duomenų apie jų fitocheminę sudėtį ir biologines savybes. Todėl kompleksinis įvairių augalų sudėties ir biologinių savybių įvertinimas yra perspektyvi tyrimo sritis.

Tradicinei kinų medicinai gerai žinomos kai kurios dioskorėjos (*Dioscorea* spp.) ir kulkšnės (*Astragalus* spp.) genčių augalų rūšys, kurių naudą sveikatai pastaruoju metu teigiamai įvertino ir daugelio Vakarų šalių medicinos specialistai. Sveikatos stiprinimo, padidintos biologinės vertės maisto produktų ir maisto papildų kūrimo ir gydymo tikslais skirtingos šių genčių augalų anatomicinės dalys naudojamos išdžiovintų vaistažolių, miltelių, ekstraktų ir kitais pavidalais.

Kai kurie *Astragalus* L. genties augalai yra žinomi kaip vertingas polisacharidų, izoflavonoidų ir cikloartano tipo saponinų šaltinis. *Dioscorea* L. genties augalų

¹ Augaliniai ruošiniai – tai ruošiniai, išgauti ekstrahuojant, distiliuojant, spaudžiant, frakcionuojant, gryninant, koncentruojant arba fermentuojant augalines medžiagas: sutrintos ar susmulkintos į miltelius augalinės medžiagos, tinktūros, ekstraktai, eteriniai aliejai, išspaustos sultys ir perdirbti eksudatai [52].

² Žodžiai *inhibitorius*, *slopliklis* yra sinonimai (aut. past.).

šakniastiebiai su šaknimis³ vertinami dėl juose esančių steroidinių saponinų, ypač diosgenino, kuris farmacijos pramonėje buvo panaudotas kaip cheminis modelis kuriant hormoninius vaistus. Dėl to kai kuriose šalyse dauguma tyrimų iki šiol tebėra sutelkti į naujų ir / ar žinomų saponinų nustatymą dioskorėjų šakniastiebiuose su šaknimis (lot. *Rhizoma cum radicibus Dioscoreae*), o antžeminės augalų dalys tirtos daug mažiau. Todėl trūksta mokslinės informacijos apie antžeminių augalo dalių biologškai aktyvių junginių sudėtį ir biologines savybes.

Išsamiai susipažinus ir įvertinus šiuo metu turimą mokslinę informaciją, paaiškėjo, kad nepakankamai ir nesistemiškai ištirtos kaukazinės dioskorėjos (*D. caucasica* Lipsky) ir niponinės dioskorėjos (*Dioscorea nipponica* Makino) augalų rūšys, ypač jų antžeminės dalys. Šios rūšys yra daugiausia paplitusios tropinio ir subtropinio klimato juostose, tačiau aptinkamos ir vidutinio klimato juostos srityse. Lietuvoje šios rūšys savaime neauga, tačiau jau gana seniai auginamos Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodo vaistinių augalų kolekcijoje. Taip pat iki šiol nebuvo tirta Lietuvos botanikos soduose auginamų *Dioscorea* L. genties augalų rūšių fitocheminė sudėtis, antioksidantinės ir biologinės savybės.

Saldžialapė kulkšnė (*Astragalus glycyphyllos* L.) yra natūraliai auganti ir plačiai paplitusi Europos vidutinio klimato juostos regionuose, dažniausiai auga drėgnose buveinėse arba pievose. Mokslinių tyrimų rezultatų apie šį augalą, palyginti su niponine ir kaukazine dioskorėja, paskelbta daugiau. Tirtos Lietuvoje savaime augančios saldžialapės kulkšnės skirtingų augalo dalių antioksidantinės savybės ir fitocheminė sudėtis, tačiau biologinės savybės netirtos.

Remiantis išsamia mokslinė, etnofarmakologinė ir kitokios informacijos apžvalga bei įvertinimu, buvo suformuluota pagrindinė šio disertacinio darbo hipotezė: tyrimams pasirinktų augalų *D. caucasica*, *D. nipponica* ir *A. glycyphyllos* skirtingų anatominių dalių sudėtyje gali būti vertingų ir šiuose augaluose mažai iširtų fitocheminių junginių, kurie gali pasižymėti įvairiu bioaktyvumu, tarp jų ir kryptingu poveikiu fiziologiškai svarbių fermentų – α -amilazės, α -gliukozidazės, angiotenziną konvertuojančio fermento ir acetilcholinesterazės aktyvumui. Todėl, atlikus sisteminius pasirinktų augalų fitocheminės sudėties ir inhibicinių savybių tyrimus, galima tikėtis platesnio tokių augalų pritaikymo kuriant naujus sveikatai naudingus funkcinio maisto produktus ir maisto papildus.

Darbo tikslas – įvertinti *Dioscorea* L. ir *Astragalus* L. augalų rūšių fitocheminę sudėtį ir nustatyti iš jų išskirtų ekstraktų poveikį fiziologiškai svarbiems hidrolaziniui aktyvumu pasižymintiems fermentams.

Darbo tikslui pasiekti buvo iškelti šie uždaviniai:

1. Ištirti ir įvertinti *Dioscorea nipponica*, *Dioscorea caucasica* ir *Astragalus glycyphyllos* L. ekstraktų fitocheminių junginių sudėtį chromatografijos ir masių spektrometrijos metodais.
2. Pritaikyti žinomus *in vitro* fermentų inhibicijos metodus vertinant tiriamų augalų ekstraktų poveikį fermentams.

³ Žodžiai *šakniastiebiai su šaknimis*, *šakniastiebiai*, *šaknys* vartojami sinonimiškai (aut. past.).

3. Įvertinti skirtingų augalų ekstraktų koncentracijų įtaką α -gliukozidazės, α -amilazės, angiotenziną konvertuojančio fermento ir acetilcholinesterazės aktyvumui.
4. Nustatyti α -gliukozidazės ir acetilcholinesterazės inhibicijos kinetinius parametrus, įvertinant substrato ir inhibitoriaus sąveikas modelinėse fermentinės reakcijos sistemose *in vitro* ir nustatyti ekstraktų tariamojo slopinamojo poveikio šiems fermentams tipą.
5. Teoriškai pagrįsti galimus ryšius tarp ekstraktuose esančių bioaktyvių junginių ir fermentų slopinamojo poveikio.

Mokslinio darbo naujumas

1. Šiame darbe pirmą kartą atlikti sisteminiai *D. nipponica* Makino ir *D. caucasica* Lipsky augalų rūšių skirtingų anatominių dalių fitocheminės sudėties tyrimai efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) ir hibridinės didelės raiškos masių spektrometrijos (UESC-Q-TOF MS/MS) metodais; gauta informacija reikšmingai papildo turimas žinias apie šiuose augaluose esančius skirtingus *O*-kvercetino glikozidų darinius, hidroksicinamono rūgštis (3-*O*-kafeoilchino, 5-*O*-kafeoilchino, 4-*O*-kafeoilchino, kafeoiltreono, kumaroilchino, kafeoilšikimo ir feruloilchino) ir hidroksiriebalų rūgštis. Pirmą kartą *D. nipponica* ir *D. caucasica* lapų ekstraktuose nustatyti kai kurie kvercetino dariniai ir hidroksicinamono rūgščių izomerai. Pirmą kartą kaukazinės dioskorėjos šakniastiebiuose nustatyta piscido rūgštis, abiejų dioskorėjų šakniastiebiuose nustatytas itin retai aptinkamas augaluose acetilkarnitino ir lauro rūgšties esteris – hidroksidodekanoilkarnitinas, o saldžialapės kulkšnės lapų ekstrakto – uridinas.
2. Pirmą kartą atlikti *D. nipponica* ir *D. caucasica* lapų ir šakniastiebių bei *A. glycyphyllos* lapų ekstraktų inhibicinio poveikio fiziologiškai svarbiems fermentams (α -amilazės, α -gliukozidazės, angiotenziną konvertuojančio fermento ir acetilcholinesterazės) tyrimai.
3. Taikant ekstraktų, substratų ir fermentų reakcijos kinetikos modelines sistemas, pirmą kartą nustatytas ekstraktų slopinamojo poveikio α -gliukozidazės ir acetilcholinesterazės fermentams tipas.
4. Teoriškai suformuluotos prielaidos apie galimus ryšius tarp *Dioscorea* spp. lapų ir šaknų ekstraktų fitocheminės sudėties ypatumų ir su jais susijusių α -gliukozidazės slopinimo gebos skirtumų.
5. Atlikti sisteminiai augalų fitocheminės sudėties ir ekstraktų inhibavimo savybių tyrimai reikšmingai praplečia mokslines žinias apie šiuos augalus ir sudaro papildomas prielaidas plačiau juos taikyti praktikoje.

Darbo praktinė vertė

Gauti duomenys apie *D. caucasica*, *D. nipponica* ir *A. glycyphyllos* fitocheminę sudėtį ir ekstraktų inhibicines savybes suteikia svarbią informaciją, kuri reikalinga naujiems funkciniais preparatams iš šių augalų sukurti ir galimam jų fiziologiniam poveikiui pagrįsti. Tokie preparatai – iš skirtingų anatominių dalių išskirti ekstraktai

ir jų frakcijos – galėtų būti pritaikomi kuriant naujus maisto papildus ir naujus padidintos mitybinės vertės funkcinio maisto produktus. Be to, gauti duomenys gali pasitarnauti prognozuojant maisto produktų, kurių sudėtyje yra tirtų augalų, naudą žmonių sveikatai, pvz., kaip švelnios nevaistinės antidiabetinės priemonės, slopinančios α -gliukozidazės bei α -amilazės aktyvumą ir mažinančios glikeminių indeksą po krakmolingo maisto vartojimo. Kadangi antžeminių augalų dalių ekstraktai pasižymėjo neblogu angiotenziną konvertuojančio fermento inhibiciniu poveikiu, iš jų pagaminti preparatai galėtų būti rekomenduojami nedidelei hipertenzijai valdyti maisto produktais ir / ar maisto papildais.

Be to, gauti rezultatai skatina tobulinti ir plėsti tyrimus su pasirinktais augalais. Šios krypties tyrimai galėtų būti tęsiami frakcionuojant ekstraktus, išskiriant efektyviausius junginius, ištiriant jų aktyvumą įvairiais glaudžiau susietais su biologinėmis sistemomis *in vitro* metodais. Toliau tyrimai turėtų būti tęsiami su gyvūnais (*in vivo*) ir baigiamojoje stadijoje su žmonėmis (klinikiniai). Atlikus tokius tyrimus, galima tikėtis sudaryti pakankamai išsamų duomenų paketą sveikumo teiginiams.

Darbo apimtis ir struktūra

Disertaciją sudaro įvadas, trys skyriai (literatūros apžvalga, tyrimų objektas ir metodai, tyrimų rezultatai ir jų aptarimas ir bendrosios išvados). Bendra apimtis – 188 puslapiai. Darbe pateikti 44 paveikslai ir 28 lentelės. Rašant disertaciją naudotasi 187 literatūros šaltiniais. Disertacija parašyta lietuvių kalba.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Tyrimams pasirinktų augalų *D. caucasica*, *D. nipponica* ir *A. glycyphyllos* skirtingų anatominių dalių sudėtyje yra vertingų ir šiuose augaluose mažai ištirtų fitocheminių junginių, kurie pasižymi įvairiu bioaktyvumu, tarp jų ir kryptingu poveikiu fiziologiškai svarbių fermentų – α -amilazės, α -gliukozidazės, angiotenziną konvertuojančio fermento ir acetilcholinesterazės aktyvumui.
2. Atlikus sisteminius pasirinktų augalų fitocheminės sudėties ir inhibicinių savybių tyrimus, galima tikėtis platesnio tokių augalų pritaikymo kuriant naujus sveikatai naudingus funkcinio maisto produktus ir maisto papildus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Dioscorea* genties ir *Astragalus* genties augalų rūšių apžvalga

1.1.1. *Dioscorea* genties augalų rūšių paplitimas / taksonomija ir morfologiniai požymiai

Dioscorea L. genties augalų rūšys laikomos vienomis iš ankstyviausių gaubtasėklių (*Magnoliophyta*) augalų karalystės skyriaus. Sistematiškai *Dioscorea* L. genties augalai priskiriami magnolijūnų (*Magnoliophyta*) skyriui, magdolijainių (*Magnoliopsida*) klasei, dioskorėliečių (*Dioscoreales*) eilei, dioskorėjinių (*Dioscoreaceae*) šeimai [1]. Neseniai sudarytame žinomų augalų rūšių sąraše dioskorėjų (*Dioscoreaceae*) šeimai priskiriamos 9 gentys ir apie 715 augalų rūšių [2]. Tai daugiamečiai žoliniai, dvinamiai vijokliniai augalai, žydintys neryškiais žiedais ir turintys stambius šakniastiebius [3]. Jų geografinis paplitimo arealas yra rytinė šiaurinės Amerikos dalis, Azija, Afrika, Sakartvelas, Šiaurės Florida ir kt. [4, 5, 6, 7]. Lietuvoje savaime dioskorėjos neauga. Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sode auginamos dvi rūšys: kaukazinė dioskorėja (*Dioscorea caucasica* Lipsky) ir niponinė dioskorėja (*Dioscorea nipponica* Makino), kurių morfologiniai požymiai beveik nesiskiria. Šios rūšys užauga iki 3 m (*D. caucasica*) arba 5–7 m (*D. nipponica*) aukščio. Stiebai žoliniai, lapai paprasti, žiedai smulkūs ir neryškūs, vaisius – kapsulė. Abi rūšys turi ilgus standžius šakniastiebius. Labiausiai pastebimas skirtumas tarp šių dviejų rūšių – lapo forma. Kaukazių dioskorėjų lapai paprasti, vienodo dydžio širdiškos formos, smailia viršūne [8, 9]. Niponinių dioskorėjų lapai įvairūs: apatiniai – paprasti, plataus kiaušinio formos, su negiliomis septyniomis skiautelėmis ir vidurine stambesne, viršutiniai – paprasti, su 3–5 šoninėmis skiautelėmis ir vidurine stambesne [10]. Minėtos rūšys auga tropinėse, subtropinėse ir vidutinio klimato juostose. Pažymėtina tai, kad kaukazinė dioskorėja yra viena iš retų rūšių ir pasaulyje laikoma tretinio laikotarpio endeminiu reliktu. Jos geografinis paplitimo arealas yra vakarinė Užkaukazės regiono dalis, Sakartvelas (Abchazija) bei Krasnodaras (Adleris) [6].

1.1.2. *Astragalus* genties augalų rūšių paplitimas / taksonomija ir morfologiniai požymiai

Astragalus L. gentis – viena turtingiausių augalų rūšių, priklausanti pupinių (*Fabaceae* Lindl.) šeimai ir *Faboideae* pošeimiui [11]. Gentyje yra per 2500 rūšių, iš kurių apie 500 aptinkama Naujajame žemyne [12, 13]. Sistematiškai kulkšnės (*Astragalus* L.) genties augalai priskiriami induočių (*Tracheophyta*) skyriui, magdolijainių (*Magnoliopsida*) klasei, erškėčiažiedžių (*Rosanae*) poklasiui, pupiečių (*Fabales*) eilei, pupinių / ankštinių (*Fabaceae/Leguminosae*) šeimai [11]. Jų geografinis paplitimo arealas yra Europa, Azija, Eurazija ir šiaurinė Amerikos dalis.

Dažniausiai minimos Lietuvos floros savaime augančios kulkšnių genties augalų rūšys yra saldžialapė kulkšnė (*Astragalus glycyphyllos* L.)⁴, ilguolinė kulkšnė

⁴ Vilniaus botanikos sodas. Priega per: <https://www.botanikos-sodas.vu.lt>.

(*Astragalus cicer*) [14, p. 213], smiltyninė kulkšnė (*Astragalus arenarius* L.) [15] ir juodadantė kulkšnė (*Astragalus danicus* Retz.) [16]. Taip pat literatūroje minima gana reta rūšis – esparcetinė kulkšnė (*Astragalus onobrychis*), kurios augavietės pastaruoju metu nepavyko rasti.

Viena iš gerai žinomų savaimė augančių rūšių – saldžialapė kulkšnė (*A. glycyphyllos* L.), paplitusi įvairiose Lietuvos vietose: Vilniaus universiteto botanikos sodo savaiminės floros apylinkėse, Mažeikių, Jurbarko, Kaišiadorių, Alytaus rajonuose. Tai daugiametis žolinis augalas, pasižymintis tuo, kad savaimė išlaiko stataus stiebo formą. Žydi žalsvai geltonais žiedais, susitelkusiais į daugiažiedę kekę. Dažniausiai auga drėgnose buveinėse ar pievose [17]. Kaip ir daugelis kitų ankštinių augalų sėklų, jų išorinis sėklos apvalkalas yra kietas. Ankštys gali būti kiaušiniškos, cilindrinės arba lenktos formos [17]. Ši rūšis plačiai paplitusi visoje Europoje, tačiau retai aptinkama rytinėje Šiaurės Amerikos dalyje ir kai kuriuose Azijos regionuose.

1.1.3. *Dioscorea* L. genties augalų rūšyse aptinkami junginiai ir jų naudojimas fiziologiniuose / molekulinuose tyrimuose

Tyrimai rodo, kad *Dioscorea* L. genties augalų rūšyse identifikuoti antriniai metabolitai dažnai naudojami fiziologiniuose ir molekulinuose tyrimuose. Gerai žinomas natūralus steroidinis saponinas diosgeninas farmacijos pramonėje buvo panaudotas kaip cheminis modelis kuriant ir gaminant hormoninius vaistus. Taip pat įrodyta, kad šis metabolitas mažina oksidacinio streso žalą, gali apsaugoti miokardą nuo išemijos sukeltų pažeidimų, moduluoti žarnyno mikrobiotą ir mažinti uždegiminių ląstelių infiltraciją [18, 19, 20]. Dar vienas cheminis junginys yra taip pat gerai žinomas farmacijos pramonėje – (–)-šikimo rūgštis, kuri yra pagrindinis tarpinis produktas oseltamiviro (*Tamiflu*®) sintezėje [21, 22, 23]. Įrodyta, kad šios rūgšties yra *Dioscorea elephantipes*, *Dioscorea sylvatica* ir kitose rūšyse [24]. Kitas metabolitas, ne mažiau svarbus žmogaus organizmo fiziologinės sistemos biocheminių pokyčių moduliavime – dioscinas, kurio įrodytas antivėžinis, antigrybelinis, neuroprotekcinis ir antioksidacinis poveikis [25, 26, 27]. Taip pat farmakologiškai perspektyvus steroidinis saponinas trilinas (Diosgenin-3-*O*- β -*D*-gliukopiranozidas), kuris biologiniuose tyrimuose rodo platų antioksidacinio poveikio spektrą organizmo ląstelėms, pvz., didindamas superoksido dismutazės, lipidų peroksidacijos aktyvumą ir / ar ekspresiją ir taip mažindamas oksidacinio streso atsaką [28]. Pastarasis metabolitas vienas pirmųjų buvo nustatytas niponinių dioskorėjų (*D. nipponika* Makino) šakniastiebiuose [28]. Pažymėtina, kad vėlesniuose tyrimuose buvo aptiktas ir kitose *Dioscorea* L. genties augalų rūšyse: *D. oppositifolia* L., *D. hamiltonii* Hook.f., *D. zingiberensis* [26, 29]. Žemiau **1.1 lentelėje** pateikiama sutrumpinta kaukazinės ir niponinės dioskorėjos rūšyse nustatytų junginių apžvalga.

1.1 lentelė. Ankstesniuose tyrimuose identifikuoti antriniai metabolitai *D. nipponica* ir *D. caucasica* rūšyse

<i>Dioscorea</i> spp. rūšys ir tiriamos dalys	Paruošimo ir / ar ekstrahavimo būdas	Preparatų / ekstraktų / frakcijų cheminių charakteristikų profiliai	Literatūra
		Dominuojantys antriniai metabolitai	
I	II	III	IV
<i>D. nipponica</i> Makino Tiriamos dalys: šakniastiebiai	Ekstrahavimo tirpiklis: giluminis eutektinis tirpiklis, turintis 30 proc. vandens	Steroidiniai saponinai: protodioscinas, protogracilinas, pseudoprotodioscinas, pseudoprotogracilinas	[30]
<i>D. nipponica</i> Makino Tiriamos dalys: šakniastiebiai	Liofilizuoti milteliai, ekstrahavimo tirpiklis: 70 proc. (v/v) etanolis	Steroidiniai saponinai: dioscinas, protodioscinas, protogracilinas, pseudoprotodioscinas	[31]
<i>D. nipponica</i> Makino Tiriamos dalys: šakniastiebiai	Vandeninis sausų miltelių ekstraktas	Furastanolio saponinas: 26- <i>O</i> - β - <i>D</i> -gliukopiranozil-furost- 5(6), 20(22)-dien-3 β ,26-diolis	[32]
<i>D. nipponica</i> Makino Tiriamos dalys: lapai	Dietilo eterio lapų ekstrakto frakcija	Steroliai ir sterolio esteriai (μ g/ g sausos žaliavos svorio): sitosterolis: 302,02 \pm 28,80 sitosterolio esteriai: 14,21 \pm 1,25 sigmasterolis: 195,23 \pm 18,50 <u>sigmasterolio esteriai: 3,51 \pm 0,37</u> Bendras triterpenoidų kiekis, įskaitant esterius (μ g/g sausos žaliavos svorio): 837,83	[33]
<i>D. caucasica</i> Lipsky Tiriamos dalys: lapai	Dietilo eterio lapų ekstrakto frakcija	Pentacikliniai triterpenoidai: ursolo rūgštis, amirinas, oleanolio rūgštis, α -amirinas, β -tarakssterolis, taraksasterolis Steroliai ir sterolio esteriai (μ g/g sausos žaliavos svorio): sitosterolis: 365,64 \pm 33,16 sitosterolio esteriai: 23,40 \pm 2,20 sigmasterolis: 38,32 \pm 3,64 <u>sigmasterolio esteriai: 1,96 \pm 0,22</u> Bendras pentaciklinių triterpenoidų kiekis (μ g/g sausos žaliavos svorio): 992,00 Bendras triterpenoidų kiekis, įskaitant esterius (μ g/g sausos žaliavos svorio): 1492,56	[33]

1.1 lentelės tęsinys

<i>Dioscorea</i> spp. rūšys ir tiriamos dalys	Paruošimo ir / ar ekstrahavimo būdas	Preparatų / ekstraktų / frakcijų cheminių charakteristikų profiliai	Literatūra
		Dominuojantys antriniai metabolitai	
I	II	III	IV
<i>D. nipponica</i> Makino Tiriamos dalys: šakniastiebiai	Ekstrahavimo tirpiklis: 50 proc. (v/v) etanolis ir jo chloroformo, etilacetato, butanolio frakcijos	Silibeno dariniai: diosnipozidas A, diosniponolis C, D <hr/> Fenantreno dariniai: diosnipozidas A, B; 3,7-dihidroksi-2,4,6-trimetoksi- fenantrenas; 4,7-dihidroksi-2,6-dimetoksi-9,10- dihydrofenantrenas <hr/> Fenolinės rūgštys: vanilino rūgštis, <i>p</i> -hidroksibenzoinė rūgštis, <i>p</i> -hidroksibenzaldehidas <hr/> Flavonoidai: likviritigeninas <hr/> Lignanai: (+)-siringarezinolis	[34]
<i>D. caucasica</i> Lipsky Kaukazinės dioskorėjos kaliaus (šaknų) kultūrų <i>in</i> <i>vitro</i> ekstraktai	Ekstrahavimo tirpiklis: izopropanolis metanolis Ekstrahavimo tirpiklis: izopropanolis	Saponinai: spirosten-5-3-ol: gliukopiranozidai, ramnopiranozidai, (2 <i>S</i>)-deltozidas, deltozidas, (2 <i>S</i>)-protodioscinas, protodioscinas, spirostenolisA, B <hr/> Flavonoidai (mg/g): rutinas: 10,77 ± 0,54 kvercetas: 14,13 ± 0,71 apigeninas: 24,15 ± 1,2 magniferinas: 5,51 ± 0,28 <hr/> Hidroksicinamono rūgštis (mg/g): kavos rūgštis: 9,60 ± 0,48 <hr/> Bendras ekdisteronų kiekis (mg/g): 7,04±0,35 <hr/> Bendras flavono glikozidų kiekis (mg/g): 7,93±0,40	[35]
<i>D. nipponica</i> Makino Tiriamos dalys: šakniastiebiai	Ekstrahavimo tirpiklis: vanduo →75 proc. (v/v) etanolio frakcija	Saponinai: gracilinas, dioscinas, protodioscinas, pseudoprotodioscinas	[36]

1.1 lentelės tęsinys

<i>Dioscorea</i> spp. rūšys ir tiriamos dalys	Paruošimo ir / ar ekstrahavimo būdas	Preparatų / ekstraktų / frakcijų cheminių charakteristikų profiliai	Literatūra
		Dominuojantys antriniai metabolitai	
I	II	III	IV
<i>D. nipponica</i> Makino Tiriamos dalys: šakniastiebiai	Ekstrahavimo tirpiklis: metanolis	Saponinai: 7-oksodioscinas, gracilinas, dioscinas, metilprotodioscinas, dioseptemlozidas G, (25 <i>R</i>)-dracaenozidas G, orbikulatozidas B, progeninas III, (3 <i>β</i> ,22 <i>α</i> ,25 <i>R</i>)-26-(<i>β</i> - <i>D</i> - gliukopiranoziloksi)-22- metoksifurost-5-en-3-il- <i>O</i> -[<i>α</i> - <i>L</i> - ramnopiranozil-(1→4)]- <i>β</i> - <i>D</i> - gliukopiranozidas	[37]
<i>D. nipponica</i> Makino subsp. <i>rosthornii</i> (Pr ain et Burkill) C. T. Ting Tiriamos dalys: šakniastiebiai	Ekstrahavimo tirpikliai: etilacetatas ir etilo benzoatas	Steroidiniai saponinai: dioscinas, diosgeninas, gracilinas Steroliai: daukosetrolis Fenantreno dariniai: 2,2',7,7'- tetrametoksi-[1,1'-bifenantrenas]- 4,4',6,6'-tetrolis Diarilheptanoidai: diosponginas A ir kt. Izokumarinas: diorostornoumarinas ⁵	[38]
<i>D. nipponica</i> Makino Tiriamos dalys: šaknys	Ekstrahavimo tirpiklis: metanolis	Steroidiniai saponinai: dioscinas, diosgeninas, gracilinas, prosapogeninas A (diosgenin-3- <i>O</i> - <i>α</i> - <i>L</i> -ramnopiranozil(1→2)- <i>β</i> - <i>D</i> - gliukopiranozidas), prosapogeninas C (diosgenin-3- <i>O</i> - <i>β</i> - <i>D</i> -gliukopiranozidas)	[39]
<i>D. nipponica</i> Makino Tiriamos dalys: stiebai ir lapai	Ekstrahavimo tirpiklis: 70 proc. (v/v) etanolis → chloroformo-tirpios frakcijos	Fenantreno dariniai: 7-hidroksi- 2,3,5-trimetoksi-9,10- dihidroksifenantrenas, 2,2',7,7'- tetrahidroksi-4,4',6,6'-tetrametoksi- 1,1'-bifenantrenas, 3,7-dihidroksi- 2,4,6-trimetoksifenantrenas, 4,7-dihidroksi-2,3,6- trimetoksifenantrenas	[40]

⁵ Originalus žodis: „diorosthournoumarin“.

1.1 lentelės tęsinys

<i>Dioscorea</i> spp. rūšys ir tiriamos dalys	Paruošimo ir / ar ekstrahavimo būdas	Preparatų / ekstraktų / frakcijų cheminių charakteristikų profiliai	Literatūra
		Dominuojantys antriniai metabolitai	
I	II	III	IV
<i>D. nipponica</i> Makino Tiriamos dalys: šakniastiebiai	Ekstrahavimo tirpiklis: 50 proc. (v/v) etanolis → organinių tirpiklių frakcijos	Saponinai: dioscinas, 25(<i>R</i>)-dracaenzidas E, G, diosgeninas-(3β, 25 <i>R</i>)-spirost-5-en- 3-olis, diosgenin-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> - gliukopiranozil(1→3)-β- <i>D</i> - gliukopiranozidas, gracilinas, prosapogenin B, protodioscinas, 7-oksodioscinas, opfoipogoninas <i>C'</i> , hipoglaucinas F, protoneogracillinas	[27]
<i>D. nipponica</i> Makino Tiriamos dalys: švieži šakniastiebiai	Ekstrahavimo tirpiklis: 60 proc. (v/v) etanolis	Benzil-1- <i>O</i> -β- <i>D</i> -gliukopiranozidas, leonurizidas A, pirokatecholis 1- <i>O</i> - β- <i>D</i> -gliukopiranozidas, (+)-siringaresinol-4- <i>O</i> -β- <i>D</i> - gliukopiranozidas, adozinas, ikarisidas D ₂ , ciklo-(Leu-Tyr)	[41]

Kaip parodyta **1.1 lentelėje**, ankstesniuose tyrimuose tirtų augalinių ruošinių sudėtyje, be gerai žinomų saponinų, dominuoja ir kitų klasių junginiai. Pavyzdžiui, tarp gerai žinomų fenolinių junginių *Dioscorea* L. genties augalų rūšyse dominuoja fenolinės rūgštys: chino, siringo, vanilino, *p*-hidroksibenzoinė; hidroksicinamono rūgštys: chlorogeno, *p*-kumaro [29, 34]; flavonoidai: kvercetino dariniai, rutinas, kemferolis ir katechinai; antocianai: alantoino izomerai ir kt. [29]. Pažymėtina tai, kad seniai yra įrodytas šių junginių gebėjimas mažinti reaktyvių deguonies radikalų kiekį ir taip apsaugoti žmogaus organizmą nuo vidinio oksidacinio streso daromos žalos.

Zhang et al. (2007) [41] niponinių dioskorėjų (*D. nipponica* Makino) šakniastiebių etanoliniuose ekstraktuose (**1.1 lent.**) nustatė junginius: benzil-1-*O*-β-*D*-gliukopiranozidą, leonurizidą A, ikarisidą D₂, pirokatecholį, 1-*O*-β-*D*-gliukopiranozidą, (+)-siringarezinol-4-*O*-β-*D*-gliukopiranozidą, ciklo-(Leu-Tyr) ir adoziną. Taip pat tyrėjai pažymi, kad aptikti junginiai šios rūšies šakniastiebiuose nustatyti pirmą kartą.

Kiek mažiau minima, tačiau svarbi dar viena aromatinių metabolitų klasė – fenantreno dariniai, kurie aptinkami skirtingose *Dioscorea* L. genties augalų rūšyse: *D. batatas* Decne, *D. rotundata*, *D. nipponica* Makino, *D. communis* L. [34, 42, 43, 44]. Pastarieji pasižymi antigrybeliniu ir antioksidaciniu poveikiu [42, 43, 44].

Maistiniu ir ekonominiu požiūriu vieni iš svarbesnių natūralių augalų junginių, naudojamų kuriant ir / ar perdurbant biologinės vertės maisto produktus ir / ar maisto papildus, – krakmolos, sudarantis apie 75 proc. visų šakniastiebiuose esančių angliavandenių, maistinės skaidulos, sacharozė, baltymai ir riebalų rūgštys, kurios daugiausia dominuoja dioskorėjų šakniastiebiuose [45, 46]. Taip pat šių visų junginių aptinkama lapuose, tačiau nedideliais kiekiais.

1.1.4. *Dioscorea L. genties augalų rūšių vartojimas medicinos praktikoje*

Daugelyje pasaulio regionų *Dioscorea L. genties* augalų rūšys žinomos dėl sąsajos su pigaus maisto gamybos ir valgymo kultūra, tradicine kinų medicina, šiuolaikine Vakarų medicina bei farmacijos pramone. Seniai yra žinoma, kad skirtingų rūšių *Dioscorea L. genties* augalų dalys kaupia skirtingus biologiškai aktyvius junginius. Dėl nevienodos pastarųjų junginių kokybės sudėties skirtingos augalų dalys naudojamos gaminant tikslinius produktus – vaistines medžiagas, biologinės vertės maisto produktus (miltus, makaronus, desertus), maisto papildus [47, 48, 49].

1.1.4.1. *D. caucasica, D. nipponica* augalų rūšių vartojimas medicinos praktikoje

Viena vertingiausių *Dioscorea L. genties* augalų rūšių – kaukazinė dioskorėja (*D. caucasica* Lipsky), kurios šakniastiebiai su šaknimis naudojami miltelių, užpilų, nuovirų, arbatų ir etanolinių ekstraktų pavidalu. Kaukazo regione naudojami liaudies medicinoje širdies ir kraujagyslių sistemos funkcijoms gerinti, kognityvinei funkcijai išlaikyti ir / ar gerinti, cholesterolio kiekiui kraujyje mažinti. Ar liaudies medicinoje naudojami augaliniai ruošiniai / preparatai gali prisidėti prie sveikatos stiprinimo, nėra daug duomenų. Tačiau yra informacijos, kad *D. caucasica* šakniastiebių ruošiniai normalizuoja kraujospūdį tiek hipertenzija, tiek hipotenzija sergantiems žmonėms [50]. Taip pat moksliskai patvirtintas šakniastiebių gydomasis poveikis [51]. Būtent *D. caucasica* šakniastiebiai naudojami farmacijos pramonėje gaminant neogaleninius vaistus aterosklerozei gydyti [51]. Kaip minėta ankstesniame skyriuje, pastaroji rūšis yra tretinio laikotarpio endeminis reliktas. Tačiau, nepaisant šios rūšies natūraliai augančių išteklių mažėjimo, vaistinio augalo dalys įdomios tiek mokslo, tiek farmacijos pramonės srityse.

Kita *Dioscorea L. genties* rūšis, ne mažiau vertinga sveikatos stiprinimo požiūriu, – niponinė dioskorėja (*D. nipponica* Makino), kurios šakniastiebiai su šaknimis įvairių farmacinių formų pavidalu naudojami tradicinės kinų medicinos, Kampo medicinos ir Vakarų medicinos praktikoje. Mokslinių įrodymų randama daugiau, palyginti su anksčiau aprašyta rūšimi. Tyrimai rodo, kad ekstraktai ir / ar ruošiniai, kurių sudėtyje yra niponinių dioskorėjų susmulkintų šakniastiebių bei augalinės kilmės junginių, išgautų iš niponinių dioskorėjų sudedamųjų dalių, geba veikti šias vėžinių ląstelių linijas: U2OS – žmogaus osteosarkomos [31], Huh7, u-PA žmogaus hepatomos [53], HL60 – žmogaus leukemijos [54], DU145 – žmogaus prostatos [55]; uždegimą slopinančias ląstelių linijas: Th17 imuninės sistemos [56], BV-2 pelės smegenų mikroglijos ląsteles [27]. Kinijoje klinikinėje praktikoje plačiai

naudojamas tradicinis augalinis niponinės dioskorėjos (*D. nipponica* Makino) šakniastiebių preparatas, turintis saponinų: diosciną, protodiosciną, pseudoprotodiosciną, podagriniam artritui gydyti [57]. Yra įrodytas šio augalinio preparato uždegimą slopinantis poveikis [57]. Dėl anabolinio poveikio sporto aplinkoje plačiai paplitęs *D. nipponica* Makino žolelių ekstraktas, dar žinomas kaip anabolinis ir androgeninis ekstraktas, kuris didina testosterono kiekį kraujyje [58]. Žemiau **1.2 lentelėje** pateikta platesnė apžvalga apie šios rūšies biologinių tyrimų įvairovę.

1.2 lentelė. Niponinės dioskorėjos augalinių ruošinių biologinių tyrimų įvairovė

Paruošimo sąlygos	Tyrimas	Įrodytas poveikis	Literatūra
Niponinių dioskorėjų (<i>D. nipponica</i> Makino) sausas etanolinis ekstraktas (70 proc. v/v)	<i>In vitro</i> : ląstelių kultūros modelis; žmogaus osteosarkomos U2OS ląstelių linija	Ekstraktas sukėlė apoptozę žmogaus osteosarkomos ląstelių linijoje U2OS	[31]
Diosgeninas, išgautas iš niponinių dioskorėjų šakniastiebių	<i>In vivo</i> : gyvūnų modelis; ovablumino sukelta bronchų astma	Kvėpavimo takų epitelijoje slopina TNF- α , IL-1 β , IL-6 sekreciją, taip sustiprindamas gliukokortikoidų receptorių ekspresiją	[20]
Saponinai, išgauti iš niponinių dioskorėjų šakniastiebių: protoneogracilinas, opfiopogoninas ⁶ C'	<i>In vitro</i> : ląstelių kultūros modelis; naudojant pelių mikroglijos BV-2 ir C6 gliomos ląstelių linijas	Didina nervų augimo faktorių (angl. <i>nerve growth factor</i> , NGF), nesukeldami reikšmingo toksiškumo ląstelėms; ↓NO	[27]
Tradicinis augalinis niponinės dioskorėjos (<i>D. nipponica</i> Makino) šakniastiebių preparatas (RDN), kurio sudėtyje yra dioscinio, protodioscinio, pseudo-protodioscinio	<i>In vivo</i> : gyvūnų modelis; urato kristalais sukeltas podagrinis artritas; 100, 300, 900 mg/kg kūno svorio dozės, kas 24 valandas 7 dienas, <i>per os</i>	RDN atstatė urato kristalų sukeltą prouždegiminių citokinų, tokių kaip TNF- α , pro-interleukinai IL-1 β , IL-8, gamybą iki normalių sąlygų. Reguliuoja organizmo antioksidacinės sistemos gynybos pajėgumą ir „NALP3 inflamatomų“ kompleksą	[59]

⁶ Originalus žodis: „opfiopogonin C“.

1.2 lentelės tęsinys

Paruošimo sąlygos	Tyrimas	Įrodytas poveikis	Literatūra
Bendras saponinų kiekis RDN preparate, kurio sudėtyje yra dioscino, protodioscino, pseudo-protodioscino	<i>In vivo</i> : gyvūnų modelis; kalio oksonatosukeltas podagrinis artritas žiurkėms; duodant 60, 300, 600 mg/kg kūno svorio dozės kas 24 valandas 6 dienas prieš indukciją, <i>per os</i>	Bendras saponinų kiekis normalizavo kalio oksonato sukeltus šlapimo rūgštis ir kreatinino pokyčius šlapime: mažino šlapimo rūgštis koncentraciją kraujyje ir kreatinino kiekį kraujo serume	[60]
Niponinių dioskorėjų, <i>D. nipponica</i> Makino, šakniastiebių sausas etanolinis ekstraktas (80 proc. v/v)	<i>In vivo</i> : gyvūnų modelis; izoprenalino sukeltas ūminio išeminio miokardo sužalojimas; Diosgenino 20, 40, 80 mg/kg kūno svorio dozės vieną kartą per parą 3 dienas, <i>per os</i> , po izoprenalino injekcijos	Diosgeninas mažina oksidacinio streso sukiamas pažaidas, taip apsaugodamas miokardą nuo sužalojimų	[18]
Sausas ekstraktas ir diosgenino suspensijos 1 proc. (m/v) vandeninis karboksilmetilceliuliozės tirpalas	Ekstrakto 500 mg/kg kūno svorio dozės, vieną kartą per parą 3 dienas, <i>per os</i> , po izoprenalino injekcijos	D.N ekstraktas: SOD, CAT ir GPx ↑ lygi; lipidų peroksidaciją ↓	
Saponinai, išgauti iš niponinių dioskorėjų (<i>D. nipponica</i> Makino) šakniastiebių	<i>In vivo</i> : gyvūnų modelis; izoprenalino sukeltas ūminis išeminio miokardo sužalojimas; ekstrakto 150, 300 mg/kg kūno svorio dozės, vieną kartą per parą 3 dienas, <i>per os</i> , prieš ir po izoprenalino injekcijos	Saponinai apsaugo miokardą nuo sukulto išeminio miokardo pažeidimo. Saponinų turintis preparatas: SOD, CAT, GPx ir T-AOC ↑ lygi	[61]

1.2 lentelės tęsinys

Paruošimo sąlygos	Tyrimas	Įrodytas poveikis	Literatūra
Niponinių dioskorėjų (<i>D. nipponica</i> Makino) šakniastiebių liofilizuoti milteliai	<i>In vivo</i> : gyvūnų modelis; riebalinės emulsijos sukeltas lipidų metabolizmas pelėms; duodant 200 ml mg/kg kūno svorio dozės riebalinės emulsijos ir 100 mg/kg kūno svorio dozės dioscino / diosgenino, <i>per os</i>	Dioscinas ir diosgeninas sumažino triacilglicerolio lygį plazmoje po 4 val.	[39]
Niponinių dioskorėjų (<i>D. nipponica</i> Makino, ND) šakniastiebių sausas etanolinis ekstraktas (65 proc. v/v) → trilinas (po frakcionavimo)	<i>In vivo</i> : gyvūnų modelis; riebios dietos (angl. <i>high-fat diet</i>) sukelta hiperlipidemija žiurkėms; duodant 0,5 mg/kg kūno svorio dozės trilino kartą per dieną 2 savaites intraperitoniniu būdu	Sumažino trigliceridų, cholesterolio koncentraciją plazmoje, didino SOD aktyvumą ir sumažino lipidų peroksidaciją	[28]

¹↑, padidėjimas. ²↓ sumažėjimas.

Paminėtini tyrimai rodo, kad *D. nipponica* Makino turi tariamąjį antiuždegiminį, antivėžinį, imunomoduliacinį ir neuroprotekcinį poveikį. Todėl suprantama, kad įvairių šalių medicinos praktikoje augaliniai ruošiniai, pagaminti iš niponinių dioskorėjų (*D. nipponica* Makino) šakniastiebių, naudojami imuninei sistemai reguliuoti, skausmui ir uždegimui mažinti [60].

1.1.5. *Astragalus* L. genties augalų rūšyse aptinkami junginiai ir jų naudojimas fiziologiniuose / molekulinuose tyrimuose

Daugelyje Vakarų šalių *Astragalus* L. genties augalų rūšys tampa vienu iš svarbesnių mokslinių tyrimų objektų kuriant tikslius produktus. Toks platus susidomėjimas šios genties augalais susijęs su mokslininkų paskelbtais tyrimais, įrodančiais augalo/-ų visose dalyse aptiktus junginius ir jų veiksmingumą mažinant reaktyviųjų deguonies radikalų kiekį ir kai kurių fermentų aktyvumą. Ankstesniuose tyrimuose identifikuoti antriniai metabolitai *Astragalus* L. genties rūšyse pateikti **1.3 lentelėje**, o **1.4 lentelėje** yra pateikta platesnė biologinių tyrimų įvairovė.

1.3 lentelė. Ankstesniuose tyrimuose identifikuoti antriniai metabolitai *Astragalus* L. genties rūšyse

Kulkšnės (<i>Astragalus</i> spp.) rūšys ir tiriamos dalys	Paruošimo ir / ar ekstrahavimo būdas	Preparatų / ekstraktų / frakcijų cheminių charakteristikų profiliai	Literatūra
		Dominuojantys antriniai metabolitai	
I	II	III	IV
<i>Astragalus glycyphyllos</i> L. Tiriamos dalys: žolė	Džiovinta žolė, miltelių pavidalo Ekstrahavimo tirpiklis: karštas demineralizuotas vanduo	Fenolinės rūgštys: galo rūgštis Flavonoidai: (+)-katechinas, (-)-epikatechinas, (-)-epigalokatechinas, (-)-epikatechino galatas	[62]
<i>Astragalus glycyphyllos</i> L. Tiriamos dalys: žolė	Džiovinta žolė, miltelių pavidalo Ekstrahavimo tirpiklis: 80 proc. (v/v) metanolis	Flavonoidų glikozidai: kaempferol-3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> - β - <i>D</i> -galaktopiranozil-6- <i>O</i> - α - <i>L</i> -ramnopiranozil]- β - <i>D</i> -gliukopiranozidas (kameliazidas A ⁷); Kvercetin-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)-[α - <i>L</i> -ramnopiranozil-(1 \rightarrow 6)]- β - <i>D</i> -galaktopiranozidas (alcesefolizidas ⁸); Kaempferol-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)-[α - <i>L</i> -ramnopiranozil-(1 \rightarrow 6)]- β - <i>D</i> -galaktopiranozidas (mauritaninas); <i>N</i> -(8-metilkaempferol-3- <i>O</i> -[α - <i>L</i> -ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)]-[α - <i>L</i> -ramnopiranozil-(1 \rightarrow 6)]- β - <i>D</i> -galaktopiranozil])-3-hidroksipiperidin-2-onas	[63]
<i>Astragalus glycyphyllos</i> L. Tiriamos dalys: lapai, žiedai, stiebai	Ekstrahavimo tirpiklis: 80 proc. (9:1,v/v) metanolis / vanduo naudojant ultragarsą	Izoflavonai: genisteinas, daidzeinas, biochaninas A, formonetinas Bendras izoflavonų kiekis (mg/100g): lapuose: 14,63	[64]
<i>Astragalus glycyphyllos</i> L. Tiriamos dalys	Kaliaus (ūglių) kultūrų <i>in vitro</i> suspensijos	Flavonoidai: rutinas kameliazidas A,	[65]

⁷ Originalus žodis: „camelliaside A“.

⁸ Originalus žodis „alcesefoliaside“.

1.3 lentelės tęsinys

Kulkšnės (<i>Astragalus</i> spp.) rūšys ir tiriamos dalys	Paruošimo ir / ar ekstrahavimo būdas	Preparatų / ekstraktų / frakcijų cheminių charakteristikų profiliai	Literatūra
		Dominuojantys antriniai metabolitai	
I	II	III	IV
<i>Astragalus glycyphyllos</i> L. Tiriamos dalys: džiovintos šaknys	Ekstrahavimo tirpiklio mišinys: petrolio eteris, dichlormetanas ir metanolis / vanduo (70:30) (v/v) → butanolio frakcija	Triterpeniniai glikozidai (cikloartano tipo glikozidai): 3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -arabinopiranozil-(1→2)- β - <i>D</i> - ksilopiranozil-20(<i>R</i>),24(<i>R</i>)-3 β ,6 α ,16 β ,25- pentahidroksi-cikloartanas (askendozidas C) 3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -arabinopiranozil-(1→2)- β - <i>D</i> - ksilopiranozil-25- <i>O</i> -[β - <i>D</i> -gliukopiranozil]- 20(<i>R</i>),24(<i>R</i>)-3 β ,6 α ,16 β ,25-pentahidroksi- cikloartanas (askendozidas F)	[66]
<i>Astragalus membranaceus</i> (Fish.) Tiriamos dalys: šaknys	Ekstrahavimo tirpiklis: 50 proc. (v/v) etanolis	Izoflavonai: daidezinas, naringinas, kalikozinas, formononetinas. Flavonoidų glikozidas: ramnocitrin- <i>O</i> -gliukozidas, Saponinai: astragalozidai I, II, III, IV, VI; izoastragalozidas II, sojasaponinas I	[67]
<i>Astragalus macrocephalus</i> subsp. <i>Finitimus</i> Tiriamos dalys: lapai	Maceracijos metodas	Flavonoidai (μ g/g ekstrakto): (-)-epikatechinas: 5,60 \pm 0,11 apigeninas: 23,0 \pm 0,12 hesperidinas: 7,05 \pm 0,03 hiperozidas: 1828,94 \pm 21 kvercetinas: 3,27 \pm 0,06 luteolinas: 32,58 \pm 1,07 Flavonoidų glikozidai (μ g/g ekstrakto): apigenin-7-gliukozidas: 16,85 \pm 0,19 luteolin-7-gliukozidas: 13,45 \pm 0,17 Fenolinės rūgštys (μ g/g): ferulo: 37,61 \pm 0,03 galo rūgštis: 2,24 \pm 0,01 protokatecho rūgštis: 18,90 \pm 0,16 Hidroksicinamono rūgštys (μ g/g): <i>p</i> -kumaro rūgštis: 33,12 \pm 0,35 chlorogeno rūgštis: 0,75 \pm 0,26 Fenilpropanoidai (μ g/g): verbaskozidas: 1,13 \pm 0,08	[68]

1.3 lentelės tęsinys

Kulkšnės (<i>Astragalus</i> spp.) rūšys ir tiriamos dalys	Paruošimo ir / ar ekstrahavimo būdas	Preparatų / ekstraktų / frakcijų cheminių charakteristikų profiliai	Literatūra
		Dominuojantys antriniai metabolitai	
I	II	III	IV
<i>Astragalus brachycalyx</i> <i>FISCHER</i> w Tiriamos dalys: šaknys	Ekstrahavimo tirpiklis: etanolis	Fenolinės rūgštys (mg/kg ekstrakto): fumaro rūgštis: 7229,15 siringo rūgštis: 258,59 ----- Hidroksicinamono rūgštys (mg/kg ekstrakto): chlorogeno rūgštis: 160,89 kavos rūgštis: 19,88 ----- Flavonoidai (mg/kg ekstrakto): apigeninas: 585,36 kvercetas: 8,76 naringeninas: 280,73 rutinas: 179,93 ----- Flavonoidų glikozidai (mg/kg ekstrakto): luteolin-7-rutinozidas: 26,09 ----- Fenilpropanoidas (mg/kg ekstrakto): verbaskozidas: 303,51	[69]
<i>Astragalus leporinus</i> Boiss. var. <i>hirsutus</i> Tiriamos dalys: šaknys	Ekstrahavimo tirpiklis: metanolis	Fenolinės rūgštys (µg/g ekstrakto): (-)-chino rūgštis: 4814,49 ± 23,23 galo rūgštis: 24,25 ± 1,22 <i>p</i> -hidroksibenzenkarboksirūgštis: 184,86 ± 9,56 ----- Hidroksicinamono rūgštys (µg/g): chlorogeno rūgštis: 173,95 ± 8,47 <i>p</i> -kumaro rūgštis: 460,36 ± 23,46 ----- Flavonoidai (µg/g ekstrakto): hesperidinas: 9441,78 ± 462,61 hiperozidas: 932,24 ± 45,66 rutinas: 7389,81 ± 369,45	[70]
<i>Astragalus distinctissimus</i> Tiriamos dalys: šaknys	Ekstrahavimo tirpiklis: metanolis	Fenoliniai junginiai (µg/g ekstrakto): (-)-chino rūgštis: 5094,77 ± 244,51 galo rūgštis: 28,18±1,43 <i>p</i> -hidroksibenzenkarboksirūgštis: 1799,27 ± 93,54 protokatecho rūgštis: 122,04 ± 6,22 ----- Hidroksicinamono rūgštys (µg/g): <i>p</i> -kumaro rūgštis: 392,87 ± 19,99 chlorogeno rūgštis: 306,45 ± 14,99	[70]

1.3 lentelės tęsinys

Kulkšnės (<i>Astragalus</i> spp.) rūšys ir tiriamos dalys	Paruošimo ir / ar ekstrahavimo būdas	Preparatų / ekstraktų / frakcijų cheminių charakteristikų profiliai	Literatūra
		Dominuojantys antriniai metabolitai	
I	II	III	IV
		Flavonoidai (µg/g ekstrakto): hesperidinas: 1604,34 ± 78,59 hiperozidas: 228,31 ± 11,17 rutinas: 1028,27 ± 51,40	
<i>Astragalus schizopterus</i> Boiss. Tiriamos dalys: šaknys	Ekstrahavimo tirpiklis: metanolis	Fenoliniai junginiai (µg/g ekstrakto): (-)-chino rūgštis: 111302,77±5342,49 galo rūgštis: 290,63 ± 14,79 protokatecho rūgštis: 1607,98±81,95 <i>p</i> -hidroksibenzenkarboksirūgštis: 1033,00 ± 53,71 <hr/> Hidroksicinamono rūgštys (µg/g): <i>p</i> -kumaro rūgštis: 475,85 ± 24,22 chlorogeno rūgštis: 400,31 ± 19,60 <hr/> Flavonoidai (µg/g ekstrakto): hesperidinas: 969,43 ± 475,06 hiperozidas: 1992,69 ± 97,60 rutinas: 13351,76 ± 667,55	[70]
<i>Astragalus armatus</i> Tiriamos dalys: ankštys	Ekstrahavimo tirpiklis: etanolis/vanduo (80:20, v/v) → ir jo etilacetato, butanolio frakcijos	Izoramnetinas, izoramnetin-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> - ramnopiranozil-(1→6)- β - <i>D</i> - galaktopiranozidas, izoramnetin-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -apiofuranozil-(1→2)-[α - <i>L</i> - ramnopiranozil-(1→6)]- β - <i>D</i> - galaktopiranozidas, kaempferol-3- <i>O</i> - (2,6-di- <i>O</i> - α - <i>L</i> -ramnopiranozil)- β - <i>D</i> - galaktopiranozidas, kaempferol-3- <i>O</i> - (2,6-di- <i>O</i> - α - <i>L</i> -ramnopiranozil)- β - <i>D</i> - gliukopiranozidas, pinitolis, ciklomakrozidas D	[71]
<i>Astragalus turkestanus</i> Bge. <i>Astragalus xanthomeloides</i> Eug. Korr. et M. Pop. Tiriamos dalys: antžeminė dalis	Ekstrahavimo tirpiklis: metanolis	Flavonoidų glikozidai: 7-metoksi kaempferol-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -arabinozil- (1→6)- β - <i>D</i> -galaktopiranozidas, kaempferol-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -ramnopiranozil-7- <i>O</i> - α - <i>L</i> -ramnopiranozil-(1→6)- β - <i>D</i> - galaktopiranozidas, kaempferol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -7-metoksi-gliukopiranozidas <hr/> <i>D</i> -pinitolis (3- <i>O</i> -metil- <i>D</i> -chiro- inozitolis) Saponinas: azukisaponinas V <hr/> Stigmasterolio gliukozidas: daukosterolis	[72]

1.4 lentelė. *Astragalus* L. genties augalų rūšių augalinių ruošinių biologinių tyrimų įvairovė

Kulkšnės (<i>Astragalus</i> spp.) rūšys ir paruošimo sąlygos	Tyrimas	Įrodytas poveikis	Literatūra
<i>A. gummifer</i> Labill. šaknų etanolinis liofilizuotas ekstraktas (80 proc. v/v)	<i>In vivo</i> : gyvūnų modelis; 4 proc. acto rūgštis sukeltas opinis kolitas žiurkėms, atliekant infuziją į tiesiąją žarną Ekstrakto 400 mg/kg kūno svorio dozės, vieną kartą per parą 5 dienas, prieš sukeliant opinį kolitą, <i>per os</i>	Ekstraktai sumažino acto rūgštis sukeltą uždegimą, viduriavimą ir išopėjimą; ↓MPO aktyvumą	[73]
<i>A. kurdicus</i> Boiss. šaknų etanolinis liofilizuotas ekstraktas (80 proc. v/v)	Ekstrakto 200, 400 mg/kg kūno svorio dozės, vieną kartą per parą 5 dienas, prieš sukeliant opinį kolitą, <i>per os</i>		
<i>A. gummifer</i> Labill. šaknų etanolinis liofilizuotas ekstraktas (80 proc. v/v)	<i>In vivo</i> : gyvūnų modelis; karageno sukelta letenų tūrio edema; ekstrakto 200, 400 mg/kg kūno svorio dozės, vieną kartą per parą 5 dienas, <i>per os</i>	Sumažino karagenino sukeltą uždegimą	[73]
<i>A. kurdicus</i> Boiss. šaknų etanolinis liofilizuotas ekstraktas (80 proc. v/v)	<i>In vivo</i> : gyvūnų modelis; karageno sukelta pelės letenų edema; ekstrakto 200, 400 mg/kg kūno svorio dozės, vieną kartą per parą 5 dienas, <i>per os</i>		
<i>A. membranaceus</i> šaknų vandeninis ekstraktas, kurio sudėtyje yra bioaktyvių peptidų	<i>In vivo</i> : gyvūnų modelis; sukelta hipertenzija žiurkėms; vandeninio ekstrakto 200 mg/kg kūno svorio dozės, <i>per os</i>	Sumažino sistolinio kraujospūdžio lygį 22,33 ± 3,61 mmHg vartojant 200 mg/kg vandeninio ekstrakto	[74]

¹↓ sumažėjimas.

Liu ir kt. klinikinių tyrimų metu parodė, kad *Astragalus membranaceus* pagerino kognityvinį ir socialinį funkcionavimą pacientams, kuriems pasireiškė nuovargis po insulto [75]. Kim ir kt. tyrė šios rūšies ekstrakto poveikį sergantiems diabetine nefropatija. *A. membranaceus* ekstraktas, vartojant po 30 g vieną mėnesį, padidino glomerulų filtracijos greitį (GFG) nuo 47 iki 72 ml/min./1,73 m², sumažino baltymų kiekį šlapime [76]. Taip pat tyrėjai pastebi geresnius gydymo atvejus skiriant AKF slopiklių ir augalinio ekstrakto derinį. Hanifa ir kt. klinikinių tyrimų metu

pastebėjo geresnius gydymo rezultatus pogimdyvine hipertenzija sergančioms moterims, skiriant vaistinių preparatą nifedipiną ir *Dioscorea alata* vandeninių ekstraktų, kurių sudėtyje yra flavonoidų, ir dioskorino derinį [77]. Bulgarijos mokslininkai, atlikę monoamino oksidazės B (hMAO-B) slopinimo tyrimą, pateikė duomenis apie *Astragalus glycyphyllos* L. metanolinių ekstraktų frakcijose nustatytą junginių veiksmingumą slopinant pastarąjį fermentą [78]. Pažymėtina, kad 17(R),20(R)-3 β ,6 α ,16 β -trihidroksicikloartanil-23-karboksil-16-laktono-3-O- β -D-gliukopiranozidas ir kameliazidas A sumažino hMAO-B aktyvumą atitinkamai 44 proc. ir 35 proc. Taip pat tyrėjai pažymi, kad junginys saldžialapės kulkšnės žaliavoje nustatytas pirmą kartą.

1.3.1 *Astragalus glycyphyllos* L. vartojimas medicinoje

Astragalus genties augalų rūšių vartojimas tradicinės kinų medicinos praktikoje gydant įvairius sveikatos sutrikimus, dažniausiai susijusius su imunine sistema, lėtinėmis degeneracinėmis ligomis bei širdies ir kepenų ligomis, yra seniai žinomas. Dabar *Astragalus* genties augalai tampa labai vertinami Vakarų šalių medicinoje kaip papildomos ir alternatyvios medicinos galimybė gerinant gyvenimo kokybę.

Saldžialapės kulkšnės (*Astragalus glycyphyllos* L.) augalo dalių, įskaitant lapų, naudojimo sveikatai stiprinti ir / ar gydyti įrodymų nėra daug. Yra keletas preliminarių įrodymų, leidžiančių manyti, kad *A. glycyphyllos* lapai, vieni ar / ir derinyje su kitomis žolelėmis, gali turėti potencialios naudos imuninei sistemai, esant idiopatiniam nevaisingumui, taip pat širdžiai ir kepenims bei kaip pagalbinė vėžio terapijos priemonė [79,80].

Lysiuk ir kt. [62] toje pačioje rūšyje aptiko (+)-katechino ir (-)-epigallokatechino junginius, kurie, kaip žinoma, turi hepatoprotekcinę ir antioksidacinę savybę [81,82]. Be to, atlikti tyrimai su *A. glycyphyllos* L. augalo skirtingomis dalimis rodo, kad augaliniai ruošiniai turi daug perspektyvių biologinių savybių. Įrodytas imunomoduliuojamasis, antiproliferacinis poveikis navikams *in vitro* / *in vivo* [80], antineoplastinis [78, 80], antimikrobinis [83], hepatoprotekcinis [84] ir neuroprotekcinis poveikis [78].

1.4 Hidrolazės, jų veikimo mechanizmai ir gamtiniai inhibitoriai

Klinikinėje praktikoje padidėjęs fermento aktyvumas dažniausiai vertinamas kaip ligos ar patologijos rodiklis. Taip yra taikoma ir hidrolazių klasės fermentams. Dėl padidėjusio hidrolazių aktyvumo žmogaus organizme vyksta fiziologiniai pokyčiai, apimantys virškinamąją, širdies ir kraujagyslių ir kitas sistemas. Yra žinoma, kad šių neigiamų fiziologinių pokyčių galima išvengti vartojant inhibitorius, kurie literatūroje apibūdinami kaip cheminiai junginiai, gebantys jungtis su fermentais ir taip mažinti fermentinės reakcijos greitį [85, p.194]. Todėl medicinos ir sveikatos mokslo srityje pripažįstama, kad fermentinės sistemos funkcionavimas yra susijęs su vaistinės(-ių) medžiagos(-ų) poveikiu esant žmogaus fiziologinių funkcijų pokyčiams. Šiuo atžvilgiu tyrimai, susiję su gamtiniais inhibitoriais ir jų paieška, yra labai svarbūs.

1.4.1 Trumpa hidrolazės klasės charakteristika

Hidrolazės (EC 3.x) – plačiai paplitusi fermentų klasė, kuri katalizuoja kovalentinio ryšio skilimą (C-O, C-N, C-C ar/ir P-N) įvairiose molekulėse prijungdama vandens molekulę [86]. Kiekvienos fermentinės reakcijos vyksmo etapas apima junginio hidrolizę ir katalizinę funkciją. Kaip būdinga visoms hidrolazėms, hidrolizės reakcijos metu susidaro du produktai, kurie pavaizduoti žemiau lygtyje [87, p. 45]:



Pavaizduota suminė B grupės mainų su OH grupe lygtis (1), kuri rodo molekulės (AB) skilimą, vykstantį kartu su vandens molekule (H₂O) hidrolizės reakcijos metu. Junginio skilimo metu susidaro dvi mažesnės molekulės (AOH ir BH), kurių viena iš vandens prisijungia hidroksi (OH⁻) grupę, kita – protoną (H⁺). Fermentinių reakcijų su kitais hidrolazės klasės fermentais principai yra tie patys, kaip ir hidrolizės reakcijoje, t. y. pirmiausia panaudojama substrato molekulė prisijungti prie vandens molekulės, po to vykstanti fermentinė katalizė keičia substrato struktūrą, t. y. substratą verčia į produktus. Priklausomai nuo hidrolizuojamo cheminio ryšio molekulėje, hidrolazės klasės fermentai skirstomi į trylika (EC3.1 – EC3.13) poklasių [88]. Šių poklasių kiekvienas fermentas skiriasi savo veikimo specifiškumu. Kaip pavyzdį galima apžvelgti kelis šiai klasei, tačiau skirtingam poklasiui priklausančius fermentus:

- esterazėms (EC 3.1.1.-) priklausanti acetilcholinesterazė (EC 3.1.1.7), atliekanti karbonil esterio ryšių hidrolizę acetilcholine,
- glikozilazėms (EC 3.2.1.-) priklausanti α-gliukozidazė (EC 3.2.1.20) ir α-amilazė (EC 3.2.1.1), atliekančios O-glikozidinių ryšių hidrolizę polisacharidų molekulėse,
- peptidazėms (EC 3.4.-) priklausantis angiotenzino konvertuojančio fermento inhibitorius (EC 3.4.15.1), atliekantis peptidinių ryšių hidrolizę baltymų molekulėse (oligopeptiduose) [89].

Kitas svarbus hidrolazių savybių aspektas – fermento selektyvumas ir specifiškumas substratui. Mokslininkų atliktuose *in vitro* enzimologiniuose tyrimuose

jau seniai pripažįstama, kad vienas fermentas gali katalizuoti kelis substratus arba sąveikauti su keliomis aktyviomis vietomis [90]. Literatūroje fermentų specifiskumas substratui apibrėžiamas kaip fermento gebėjimas katalizuoti tos pačios / ar panašios molekulės substrato transformaciją. Kiek kitaip nei fermentų specifiskumas substratui, fermentų selektyvumas apibrėžiamas kaip fermento gebėjimas atskirti ir katalizuoti skirtingas chemines grupes substratui transformuoti [86]. Todėl, žinant mokslo įrodymus būdingus fermento ir substrato sąveikos modelius, paprasčiau pradėti mokslinius tyrimus pasirenkant tinkamą substratą konkrečiam fermentui.

1.4.2 Hidrolazės, veikiančios *O*-glikozidinius ryšius polisacharidų molekulėse

Hidrolazės, veikiančios *O*-glikozidinius ryšius angliavandenių molekulėse, priskirtos antrajam glikozilazių poklasiui (EC 3.2.-) [89]. Pats glikozilazių poklasis toliau suskirstytas į glikozidazes – fermentus, kurių vieni katalizuoja angliavandenių ir kitų molekulių *O*- ir *S*- glikozidinių ryšių hidrolizę (EC 3.2.1), kiti – nukleozidų ir / ar nukleotidų *N*- glikozidinių ryšių hidrolizę (EC 3.2.2 n) [89]. Yra žinoma, kad dauguma glikozidazių, skaidančių *O*-glikozidinius ryšius, priklauso virškinimo fermentams. Hernandez-Hernandez ir kt. (2019) [91] pateikia lentelę, kurioje trumpai apibūdinami pagrindiniai fermentai, skaidantys angliavandenius žmogaus virškinamojoje sistemoje (**1.5 lent.**)

1.5 lentelė. Virškinimo fermentai, skaidantys angliavandenius

Fermentai, skaidantys angliavandenius	Fermentų išskyrimo vieta / tipas	Gaminamų fermentų išskyrimo organas / pagrindinė skaidymo vieta	Hidrolizuojamos glikozidinės jungtys	Pagrindiniai substratai	Pagrindiniai produktai
α -amilazė Šeima: GH13	Sekrecijos liaukos (seilės) / α -GLU	Seilių liaukos / burna	Glc α (1 \rightarrow 4)Glc	Krakmolai; linijinės struktūros maltooligosacharidai (n > 6)	Maltozė, maltotriozė, α -dekstrinas
α -amilazė Šeima: GH13	Sekrecijos liaukos / α -GLU	Kasa / plonoji žarna	Glc α (1 \rightarrow 4)Glc	Krakmolai; linijinės struktūros maltooligosacharidai (n > 6)	Maltozė, maltotriozė, α -dekstrinas
Sukrazė-izomaltazė Šeima: GH31	Gleivinė / α -GLU	Plonosios žarnos (šepetinis epitelio kraštas) / plonoji žarna	Glc α (1 \leftrightarrow 2) β Fru Glc α (1 \rightarrow 4)Glc Glc α (1 \rightarrow 6)Glc	Sacharozė, maltozė, izomaltazė, α -dekstrinas, maltotriozė	Gliukozė, fruktozė
Maltazės-glikoamilazė Šeima: GH13	Gleivinė / α -GLU	Plonosios žarnos (šepetinis epitelio kraštas) / plonoji žarna	Glc α (1 \rightarrow 4)Glc Glc α (1 \rightarrow 6)Glc	Linijinės ir šakotos struktūros maltooligosacharidai (n = 2 – 9)	Gliukozė

1.5 lentelės tęsinys

Fermentai, skaidantys angliavandenius	Fermentų išskyrimo vieta / tipas	Gaminamų fermentų išskyrimo organas / pagrindinė skaidymo vieta	Hidrolizuojamos glikozidinės jungtys	Pagrindiniai substratai	Pagrindiniai produktai
Laktazė-florizinhidrolazė Šeima: GH1	Gleivinė / α -GLU	Plonosios žarnos (šepetinis epitelio kraštas) / plonoji žarna	Glc β (1 \rightarrow 4)Gal Glc β (1 \rightarrow 4)Glc	Laktozė, celobiozė, celotriozė, celiuliozė	Gliukozė, Galaktozė
Trehalazė Šeima: GH37	Gleivinė / α -GLU	Plonosios žarnos epitelio kraštas) / plonoji žarna	Glc α (1 \leftrightarrow 1) α Glc	Trehalozė	Gliukozė

Kaip matyti iš **1.5 lentelės**, žmogaus virškinamojoje sistemoje yra šeši fermentai, kurie hidrolizuoja oligo- ir disacharidus į monosacharidus ir taip užtikrina angliavandenių pasisavinimą žarnyne. Pagal angliavandenių skaidymo eiliškumą, žmogaus virškinamojoje sistemoje glikozidazių fermentus galima suskirstyti į dvi grupes – fermentus, skaidančius α -1,4-glikozidinius (Glc) polisacharidų vidinius ryšius, ir fermentus, skaidančius α -1,2-Glc, α -1,4-Glc ir α -1,6-Glc polisacharidų ryšius. Jau seniai yra žinoma, kad seilės, kasos sultys ir plonosios žarnos gleivinės epitelinės ląstelės išskiria fermentą α -amilazę, kuri hidrolizuoja α -1,4-glikozidinius krakmolingų polisacharidų vidinius ryšius ir taip sudaro linijinės struktūros maltooligosacharidus. Kiti fermentai, ne mažiau svarbūs krakmolingų polisacharidų skaidymo tęstinume, – keturios α -gliukozidazės, kurios angliavandenių hidrolizę katalizuoja plonosios žarnos gleivinės epitelinėse ląstelėse. Jau seniai pripažinta, kad šios keturios gleivinės α -gliukozidazės vieną kitą veikia sinergistiškai ir taip užtikrina visišką krakmolingų polisacharidų hidrolizę iki gliukozės ir fruktozės [92, 93] Būdinga ir tai, kad tokiose sinergistinėse sąveikose dalyvauja ne vienas α -gliukozidazės fermentas, o keli membraninių baltymų kompleksai: maltazės-glikoamilazės kompleksas (MGAM; EC 3.2.1.20/3) ir sukrazės-izomaltazės (SI; fermentų nomenklatūros EC 3.2.148/10) kompleksas. Skirtingai nei α -amilazės, šios disacharidazės (MGAM ir SI) skaido α -1,4-Glc, α -1,6-Glc ryšius neredukuotame polisacharido molekulės gale ir taip formuoja gliukozės monomerus. Dar vienas, ne mažiau svarbus šepetinio krašto fermentas – trehalazė, kuri hidrolizuoja disacharido α -1,1-Glc ryšius ir atskelia gliukozės liekaną. Visi paminėti fermentai literatūroje apibrėžiami kaip pagrindiniai angliavandenius skaidantys fermentai žmogaus virškinamojoje sistemoje [91].

1.4.2.1 α -gliukozidazės ir α -amilazės gamtiniai inhibitoriai

Tyrimais įrodyta, kad polisacharidus skaidančių fermentų funkcionalumas turi įtakos gliukozės metabolizmo reguliavimui [94]. Kaip žinoma, pagrindiniai žmogaus virškinamojoje sistemoje fermentai, skaidantys polisacharidus, yra α -amilazė ir α -gliukozidazė, kurie fiziologinėmis sąlygomis palaiko pusiausvyrą polisacharidų

skaidymo procese. Dėl įvairių ligų patologijos sutrikdomas polisacharidų skaidymo kelias, o neigiami fiziologiniai pokyčiai reguliuojami inhibitoriais. Yra įrodyta, kad α -amilazės ir α -gliukozidazės inhibitoriai keičia angliavandenių absorbciją žarnyne, taip mažindami gliukozės kiekį kraujyje [94]. Medicinos ir sveikatos mokslo seniai įrodyta glikemijos kontrolės svarba. Todėl pripažįstama, kad angliavandenių apykaitos sutrikimo atveju vaistiniai augalai yra svarbūs kompleksinėms terapijoms ar prevencijai [95]. Esama nemažai tyrimų, įrodančių jų veiksmingumą. Kinijos mokslininkai, atlikę α -gliukozidazės slopinimo tyrimą, pateikia duomenis apie *D. opposita* Thunb. šakniastiebių etanoliniuose ekstraktuose nustatytų junginių veiksmingumą slopinant pastarąjį fermentą. Pažymėtina, kad 6-hidroksi-2,4,7-trimetoksifenantrenas, *trans-N-p*-kumaroiltiraminas ir 1,7-bis(4-hidroksifenil)heptan-3,5-diolis sumažino α -gliukozidazės aktyvumą, kai IC_{50} siekė atitinkamai 0,77 mmol/l, 0,40 μ mol/l ir 0,38 mmol/l, [96]. Tang ir kt. (2019) [97] tyrimais parodė, kad kvercetas ir (-)-epigalokatechino galatas sumažino kasos α -amilazės aktyvumą, kai IC_{50} siekė atitinkamai 1,36 ir 0,31 mg/ml.

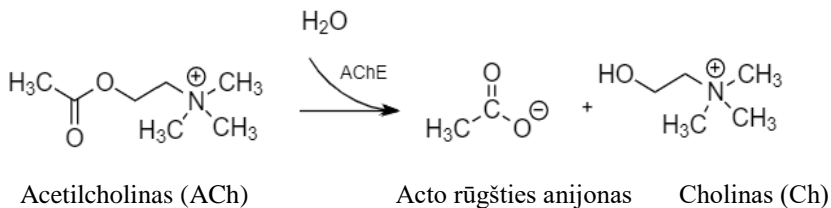
Tadera ir kt. (2006) [98] atliktame tyrime buvo nustatytas *in vitro* ir *in vivo* flavonoidų slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui. Tirtų flavonoidų (200 μ M) *in vitro* slopinamojo poveikio α -gliukozidazės fermentui geba pasiskirstė taip: miricetas (94 proc.) > genisteinas (93 proc.) > luteolinas (92 proc.) > kvercetas (91 proc.) > daidzeinas (89 proc.) > (-)-epigalokatechino galatas (89 proc.) > fisetinas (88 proc.) > kaempferolis (82 proc.) > naringeninas (73 proc.) > (-)-epigalokatechinas (71 proc.) > hesperetinas (61 proc.) > (+)-katechinas (45 proc.) > apigeninas (43 proc.) > (-)-epikatechinas (24 proc.); flavonoidų (50 μ M) *in vivo* α -gliukozidazės fermento slopinimo geba pasiskirstė taip: (-)-epigalokatechino galatas (32 proc.) > miricetas (29 proc.) > kvercetas (28 proc.) > fisetinas (26 proc.) > luteolinas (19 proc.) > baikaleinas (16 proc.) > kaempferolis (8 proc.) > hesperetinas, genisteinas (2 proc.). Ta pati mokslininkų grupė nustatė *in vivo* flavonoidų (50 μ M) slopinamojo poveikio α -amilazės fermentui gebą. Flavonoidai sumažino α -amilazės aktyvumą taip: miricetas (64 proc.) > luteolinas (61 proc.) > kvercetas (50 proc.) > fisetinas, genisteinas (33 proc.) > (-)-epigalokatechinas (32 proc.) > baikaleinas (31 proc.) > apigeninas, (-)-epigalokatechino galatas (21 proc.) > daidzeinas (19 proc.) > kaempferolis (18 proc.) > hesperetinas (16 proc.) > (-)-epikatechinas (14 proc.) > (-)-epigalokatechinas, naringeninas (5 proc.).

Atlikę α -gliukozidazės slopinimo tyrimą, Janibekov ir kt. (2018) [72] pateikia duomenis apie *Astragalus turkestanus* Bge. ir *Astragalus xanthomeloides* Eug. Korr. et M. Pop. metanoliniuose ekstraktuose nustatytų junginių veiksmingumą slopinant pastarąjį fermentą. Pažymėtina, kad 7-metoksi-kaempferol-3-*O*- α -*L*-arabinozil-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-galaktopiranozidas, azukisaponinas V ir kaempferol-3-*O*- α -*L*-ramnopiranozil-7-*O*- α -*L*-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 6))- β -*D*-galaktopiranozidas sumažino α -gliukozidazės aktyvumą, kai IC_{50} siekė atitinkamai $50,31 \pm 4,98$ μ g/ml, $117,96 \pm 1,96$ μ g/ml ir $79,60 \pm 7,74$ μ g/ml. Taip pat šie tyrėjai pažymi, kad pastarieji flavonoidų gliukozidai nustatyti *Astragalus* genties rūšyse pirmą kartą.

1.4.3 Hidrolazės, veikiančios karboksirūgščių esterių ryšius

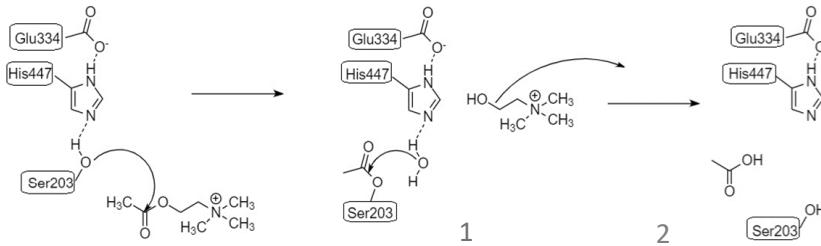
Pagal Tarptautinę biochemijos ir molekulinės biologijos sąjungos (angl. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, IUBMB) priimtą ir patvirtintą fermentų klasifikaciją ir nomenklatūrą, hidrolazės, veikiančios esterių ryšius, priskirtos pirmajam esterazių poklasiui (EC 3.1.-) [99]. Pastarasis pagal hidrolizuojamos esterinės jungties pobūdį toliau skirstomas į įvairius popoklasius. Parodyta, kad pirmajam popoklasiui priskirtos karboksirūgščių esterių hidrolazės (EC 3.1.1.-) katalizuoja esterinio ryšio skilimą įvairiuose substratuose. Tačiau numeracijos sekoje esantis paskutinis skaičius rodo ir / ar patikslina, kad kai kurios karboksirūgščių esterių hidrolazės (EC 3.1.1.-), priklausomai nuo substrato, gali hidrolizuoti ne tik karboksilinius (COO^-) esterių ryšius, bet ir kitų struktūrų molekulių darinių esterinius ($-\text{O}-\text{C}$), amidinius ($-\text{N}-\text{C}-$) ir tioesterių ($-\text{S}-\text{C}$) ryšius [100].

Pažymėtina, kad, kaip ir daugelis kitų karboksilų esterių hidrolazės (EC 3.1.1.-) klasei priklausančių fermentų, acetilcholinesterazė (EC 3.1.1.7) katalizuoja ne tik karbonilo grupės ($>\text{C}=\text{O}$) hidrolizę acetilcholine, bet ir trans-acetilimą [89]. Bendroji reakcija, kurią katalizuoja acetilcholinesterazė (EC 3.1.1.7), pavaizduota žemiau:



1.1 pav. Hidrolizės reakcija. Acetilcholinesterazės sąveika su acetilcholinu. Acetilcholino virtimas cholinu katalizuojant acetilcholinesterazei

Tyrimais įrodyta, kad acetilcholinesterazės molekulėje yra dvi aktyvios vietos. Viena vadinama *„esterine“*, kurioje aptinkamos trys aminorūgščių liekanos – His447, Glu334 ir Ser203 [101], svarbios skaidant substrato peptidinius ryšius, o kita *„anijonine“*, kurioje nustatyta aromatinė rūgšties liekana – W84, svarbi acetilcholino trimetilamonio grupės sujungimui [102]. Kaip ir daugelio kitų hidrolazės klasei priskirtų fermentų, acetilcholinesterazės fermentinė reakcija vyksta dviem etapais: pirmame etape katalizuojant acetilcholinesterazei acilgrupė ($\text{R}-\text{CO}^-$) nuo acetilcholino pernešama ant Ser203 aminorūgšties likučio, esančio fermento paviršiaus aktyviame centre. Taip susidaro kovalentinis ryšys tarp acetil liekanos ir fermento aktyvios vietos (aminorūgšties serino dalies), dar vadinamas tarpiniu kovalentiniu fermento-substrato produktu. Kitame etape vandens molekulė, kaip nukleofilas, atakuoja tarpinį kovalentinį fermento-substrato produktą, susidariusį peresterifikavimo reakcijos metu. Taip susidaro galutinis produktas – acto rūgštis. Taip acetilcholinesterazė atsinaujina ir vėl gali reaguoti su kita acetilcholino molekule. Gulčėn ir kt. [103] pateikia fermentinės reakcijos vyksmą – hidrolizės reakciją, rodančią pastarosios reakcijos vyksmą nuosekliais etapais: 1) susidarant acilo-serino ryšiumi; 2) atsipalaiduojant acto rūgščiai (**1.2 pav.**).



1.2 pav. Acetilcholino hidrolizės reakcijos vyksmas katalizuojant acetilcholinesterazės fermentui (AChE)

Seniai yra mokslo įrodyta, kad žmogaus organizme cholinerginiai neuronai išskiria acetilcholiną [104]. Acetilcholiną yra vienas iš pagrindinių neurotransmiterių centrinėje nervų sistemoje, autonominėje nervų sistemoje ir sensomotorinėje sistemoje [105]. Yra įrodyta, kad šis cholinerginis neurotransmiteris centrinėje nervų sistemoje padeda reguliuoti kognityvines funkcijas.

Kaip žinoma, acetilcholino, kaip ir kitų neuromediatorių, mechanizmas pagrįstas tuo, kad, patekęs į sinapsinį plyšį, jis difunduoja ir sąveikauja su intrasinapsiniais receptoriais [106]. Tačiau, skirtingai nei kiti neuromediatoriai, acetilcholiną turi tikslinį fermentą – acetilcholinesterazę, kuri hidroliziniu būdu katalizuoja acetilcholino skilimą į choliną ir acto rūgštį [107]. Po hidrolizės acetatas greitai pasklinda į aplinkinę terpę, o choliną vėl patenka į presinapsinę ląstelę, naudodamas didelio afiniteto cholino pasisavinimo (ang. *the activity of high-affinity choline uptake*, HACU) sistemą [108, 109].

Pažymėtina tai, kad iki šiol mokslininkų stebimas cholinerginės sistemos disfunkcijos tęstinumas nuo kognityvinio senėjimo iki lengvo pažinimo sutrikimo ir Alzheimerio ligos [110]. Tokie stebėjimai patvirtina seniausią kognityvinio išsivystymo hipotezę. Tačiau nuo klasikinės mokslo įrodytos teorinės hipotezės iki šiuolaikinių teorijų vis dar neaišku: ar acetilcholiną veikia kaip neuromodulatorius, ar kaip neuromediatorius, nes abi teorijos patvirtintos įrodymais [110, 111]. Nepaisant sudėtingų teorijų tęstinumų, moksliniais tyrimais įrodyta, kad slopinant fermento acetilcholinesterazės aktyvumą, galima sumažinti kognityvinių funkcijų progresavimą. Dėl vykstančios AChE inaktyvacijos acetilcholiną kaupiasi sinapsiniame plyšyje ir taip skatina muskarino ir nikotino receptorių išsiskyrimą postsinapsinėse membranose [112], o tai kliniškai reiškiasi poveikiu kognityvinei simptomatikai.

1.4.3.1 Acetilcholinesterazės gamtiniai inhibitoriai

Mokslo įrodyta, kad acetilcholinesterazės slopinimas centrinėje nervų sistemoje yra svarbi Alzheimerio ligos gydymo strategija [113, 114]. Žinant, kad sukurtų vaistų nuo Alzheimerio ligos farmakologinis poveikis pasireiškia daugiausia dėl acetilcholinesterazės slopinimo, antriniai augalų metabolitai vis dažniau tampa pagrindiniais taikiniai kuriant vaistus.

Svarbu prisiminti, kad amarilinių (*Amaryllidaceae*) šeimai priklausančios *Galanthus* spp. genties augalų rūšys iki šiol įvardinamos kaip potencialūs junginių šaltiniai acetilcholinesterazės slopikliams išgauti [113, 114, 115].

Kaip parodė vėlesni tyrimai, pataisūnų (*Lycopodiaceae*) ir rūgtinių (*Polygonaceae*) šeimoms priklausančios skirtingos augalų rūšys ne mažiau svarbios kuriamų ir / ar ieškomų naujų inhibitorių tyrimų plėtrai [114]. Jau seniai moksliniuose šaltiniuose įvardinama, kad didžiosios daugumos šių augalų rūšių sudėtyje yra alkaloidų grupei priklausančių junginių įvairovė [113]. Tyrimais įrodytas berberino, palmatino, huperizino A, galantamino ir jo darinių veiksmingumas slopinant AChE fermentą [113].

Nepaisant jau gerai žinomų augalų genčių, kurių sudėtyje yra junginių, gebančių slopinti AChE aktyvumą, mokslinėje literatūroje aprašomos ir kitos augalų rūšys bei gamtiniai inhibitoriai, veiksmingai mažinantys AChE aktyvumą. Heo ir kt. (2004) [116] pateikė duomenis apie flavonono naringenino, išskirto iš *C. junos* vaisių metanolinio ekstrakto, veiksmingumą slopinant AChE fermentą. Li ir kt. (2020) [117] tyrė *A. membranaceus* (Fish.) šaknų ekstraktų sudėtyje dominuojančių junginių slopinamąjį poveikį AChE fermentui. Nustatyta, kad junginiai: calycosin-7-O-β-d-gliukozidas (63,19 proc.), pratensein-7-O-β-d-gliukozidas (53,14 proc.), formononetin-7-O-β-d-gliukozidas (50,63 proc.), kalikozinas (58,42 proc.), genisteinas (60,05 proc.), formononetinas (62,19 proc.) sumažino fermento aktyvumą. Kitų mokslininkų tyrimai įrodė kvercetino (76,2 ± 0,99 proc.; 1mg/ml), luteolin-7-O-rutinozido (24,7 ± 0,34 proc.; 1mg/ml), galo rūgšties (15,7 ± 1,02 proc.; 1mg/ml) [118], makluraksantono (IC_{50} , μM: 8,47) [119], katechino [120] slopinamąjį poveikį pastarajam fermentui. Taip pat yra nemažai mokslinių tyrimų, įrodančių, kad AChE aktyvumą mažina augaliniai ekstraktai ar kiti ruošiniai. Žemiau **1.6 lentelėje** pateikta *Astragalus* genties augalinių ruošinių ir / ar ekstraktų geba slopinant acetilcholinesterazės fermentą.

1.6 lentelė. Ankstesnėse studijose atlikti *Astragalus* genties rūšių slopinamojo poveikio fermentams tyrimai

Nr.	Kulkšnės (<i>Astragalus</i> spp.) rūšys ir augalo dalys	Ekstrahavimo tirpiklis	Fermento aktyvumo sumažėjimas (proc.)	Literatūra
	I	II	III	IV
1.	<i>Astragalus leporinus</i> Boiss. var. <i>hirsutus</i> Tiriamos dalys: šaknys	Petroleteris	46,96 ± 4,06	[70]
2.	<i>Astragalus distinctissimus</i> Tiriamos dalys: šaknys	Petroleteris	17,79 ± 0,81	[70]
3.	<i>Astragalus schizopterus</i> Boiss. Tiriamos dalys: šaknys	Petroleteris	13,21 ± 0,21	[70]
		Acetonas	12,11 ± 0,34	
4.	<i>Astragalus neurocarpus</i> Bioss. Tiriamos dalys: šaknys	Vanduo	40,26 ± 1,14	[121]
		Etanolis	62,50 ± 0,60	

1.6 lentelės tęsinys

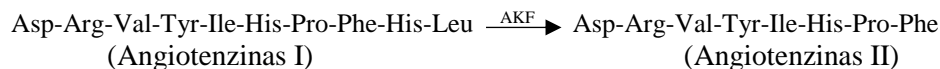
Nr.	Kulkšnės (<i>Astragalus</i> spp.) rūšys ir augalo dalys	Ekstrahavimo tirpiklis	Fermento aktyvumo sumažėjimas (proc.)	Literatūra
	I	II	III	IV
	antžeminė augalo dalis	Vanduo	44,68 ± 0,12	
		Etanolis	68,14 ± 0,03	
5.	<i>Astragalus armatus</i> Tiriamos dalys: ankštys	Etanolis/vanduo (80:20, v/v) → ir jo etilacetato frakcija	10,04 ± 0,2 (200µg/ml)	[71]

Ankstesnėse studijose Haşimi ir kt. [70] tirdami tris *Astragalus genties* rūšis – *A. leporinus*, *A. distinctissimus*, *Astragalus schizopterus* nustatė, kad kulkšnių šaknų ekstraktai sumažino AChE fermento aktyvumą iki 50 proc. (**1.6 lent.**) Didžiausią inhibicinį poveikį tarp tirtų ekstraktų turėjo *A. leporinus* šaknų ekstraktas 46,96 ± 4,06 proc., mažiausią – *A. schizopterus* šaknų ekstraktas 13,21 ± 0,21 proc. Tyrimo metu pasirinktas petroleterio ekstrahentas turėjo stipresnį inhibicinį poveikį fermentui nei vandeninis tirpiklis.

1.4.4 Hidrolazės, veikiančios peptidinius ryšius oligopeptiduose

Analogiškai klasifikuojamos ir peptidazės (EC 3.4.-), kurios priskirtos ketvirtajam hidrolazės klasės poklasiui [99]. Kaip žinoma, šis poklasis toliau skirstomas į mažesnius poklasius ir popoklasius. Pagrindinis fermentas, kuris slopina renino- angiotenzino- aldosterono sistemą yra angiotenzino konvertuojančio fermento inhibitorius, nomenklatūrinėje sistemoje žymimas EC 3.4.15.1 [99, 122].

Angiotenziną konvertuojantis fermentas (AKF; EC 3.4.15.1, peptidil-dipeptidazė A), priklausantis M2 šeimai, žmogaus organizme atlieka svarbų fiziologinį vaidmenį reguliuojant kraujospūdį per renino-angiotenzino ir kallikreino kinino sistemas [122]. AKF yra glikozilinta Zn²⁺ dipeptidilkarboksipeptidazė, katalizuojanti peptido angiotenzino I⁹ vartimą angiotenzinu II, atskirdama C-galo histidino ir leucino (His-Leu) dipeptidą (**1.3 pav.**). Angiotenzinas II yra stiprus vazokonstriktorius, ir jo poveikis priklauso nuo C-galinės dalies Phe⁸ liekanos; be to, šis fermentas skatina aldosterono išskyrimą iš antinksčių žievės ir bradikinino vartimą neaktyviais heptapeptidais.



1.3 pav. Angiotenzino I vartimas angiotenzinu II katalizuojant AKF

1.2.4.1. Angiotenziną konvertuojančio fermento gamtiniai inhibitoriai

AKF inhibitoriai yra vieni veiksmingiausių vaistų padidėjusiam kraujospūdžiui mažinti. Pirmieji įrodymai, kad peptidai geba mažinti angiotenzino I konvertuojančio

⁹ Žodžiai *angiotenzinas I*, *angiotenzinas* yra sinonimai (aut. past.).

fermento aktyvumą, buvo gauti tiriant gyvačių nuodus (lot. *Bothrops jararaca*) 1965 metais. Būtent Ferreira ir kt. (1965) [123] mokslinių tyrimų metu nustatė, kad peptidai, išskirti iš gyvačių nuodų, efektyviai slopina AKF-I aktyvumą ir taip sumažina angiotenzino II vazokonstriktinį poveikį kraujagyslėms. Pastebima, kad iki šių dienų angiotenzino konvertuojančio fermento aktyvumo slopinimas tapo perspektyviu aukšto kraujospūdžio reguliavimo ir gydymo būdu. Pažymėtina, kad šio fermento aktyvumo mažėjimą įrodo ne tik širdies ir kraujagyslių sistemą veikiantys vaistai, bet ir pavieniai junginiai, išskirti iš vaistinės augalinės žaliavos ir / ar gyvūninės kilmės maisto produktų.

Vieni iš geriausiai žinomų gyvūninės kilmės peptidų, mažinančių angiotenzino konvertuojančio fermento aktyvumą, yra kazeinas, zeinas, α -laktalbuminas ir β -laktoglobulinas, o augalinės kilmės – klampus baltymas dioskorinas, randamas *Dioscorea* spp. šakniastiebiuose. Mokslininkų atliktuose tyrimuose dioskorinas, išskirtas iš *D. opposita* Thunb., *D. alata* cv. Tainong No. 1 šakniastiebių, turėjo reikšmingą AKF slopinamąjį poveikį [46, 124]. Hsu ir kt. [124] tyrimais parodė, kad pastarasis junginys, priklausomai nuo koncentracijos, slopino AKF-I aktyvumą atitinkamai 12,5–750 μ g, 20,83–62,5 proc., naudojant *N*-[3-(2-Furil)akriloil]-Phe-Gly-Gly (FAPGG) kaip substratą.

Tačiau daugėja pranešimų apie mažiau žinomus junginius ir / ar augalinės kilmės ruošinius, gebančius mažinti AKF-I aktyvumą. Daskaya-Dikmen ir kt. [125] apžvalginiame straipsnyje pažymi, kad gyvūninės kilmės peptidai gali būti naudojami kaip alternatyvūs AKF-I slopikliai, kurių IC_{50} vertė yra maža, palyginti su vaistais. Yra duomenų apie augalinių ekstraktų sudėtyje esančių taninų veiksmingumą mažinant AKF-I aktyvumą. Liu ir kt. [126] tyrė augalinių ekstraktų sudėtyje esančių taninų klasei priklausančių kafeoilchinatų, flavan-3-olių ir galotaninų poveikį AKF-I fermentui. Išsamiaje tyrime šie mokslininkai trumpai pateikia informaciją apie kitų grupių taninų formas gebančias slopinti AKF-I fermentą (**1.7 lent.**), pažymėdami, kad taninai angiotenzino konvertuojančio fermento aktyvumą mažino, kai IC_{50} siekė 200 μ M.

1.7 lentelė. Angiotenziną konvertuojančio fermento gamtiniai inhibitoriai (AKFI)

Taninai	IC_{50}, μM
Kafeoilchinatai	
Metil-3,5-di- <i>O</i> -kafeoilchinatai	82,9
Metil-3,4-di- <i>O</i> -kafeoilchinatai	169,6
Flavan-3-oliai	
Galokatechinai	195,9
Katechin-3- <i>O</i> -galatas	113,0
Epikatechin-3- <i>O</i> -galatas	18,3
Epigalokatechin-3- <i>O</i> -galatas	37,4
Epigalokatechin-3- <i>O</i> -metilgalatas	26,6
Galotaninai	
1,2,3,6-tetra- <i>O</i> -galoil-h- <i>D</i> -gliukozė	101,4
1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -galoil-h- <i>D</i> -gliukozė	73,1

Nemažai atliktų tyrimų *in vitro* parodė panašius pastebėjimus, kad taninų klasei priklausantys junginiai mažina angiotenzino konvertuojančio fermento aktyvumą; tai *L*-epigalokatechinas [26], procianidin C1-3,3',3''-tri-*O*-galatas [127] aptinkami *Rheum* spp., *Saxifraga stolonifera* ir kt. Taip pat izokvercitrinas [128, p. 263], aptinkamas daugelio augalų rūšių dalyse.

Kita vertus, yra atliktų tyrimų, įrodančių AKF slopinimą augaliniais ekstraktais ar kitais ruošiniais. Wu ir kt. (2020) [74] tyrė peptidų, išskirtų iš *A. membranaceus* šaknų, inhibicinį poveikį AKF fermentui. Atlikus *in vivo* tyrimus, nustatyta, kad vandeniniai ekstraktai, turintys bioaktyvių peptidų, sumažino AKF aktyvumą, kai IC_{50} siekė $1,85 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$. Taip pat pastarojo tyrimo metu su žiurkių modeliu, duodant 200 mg/kg vandeninio ekstrakto, sumažėjo sistolinio kraujospūdžio lygis $22,33 \pm 3,61$ mmHg. Lee ir kt. (2003) [129] pateikė duomenis apie gleivių, išskirtų iš *D. batatas* Decne. šakniastiebių, veiksmingą poveikį AKF-I fermentui. Gleivės, priklausomai nuo koncentracijos, sumažino AKF aktyvumą atitinkamai 102,46–409,84 $\mu\text{g/ml}$, 28,79–59,8 proc.

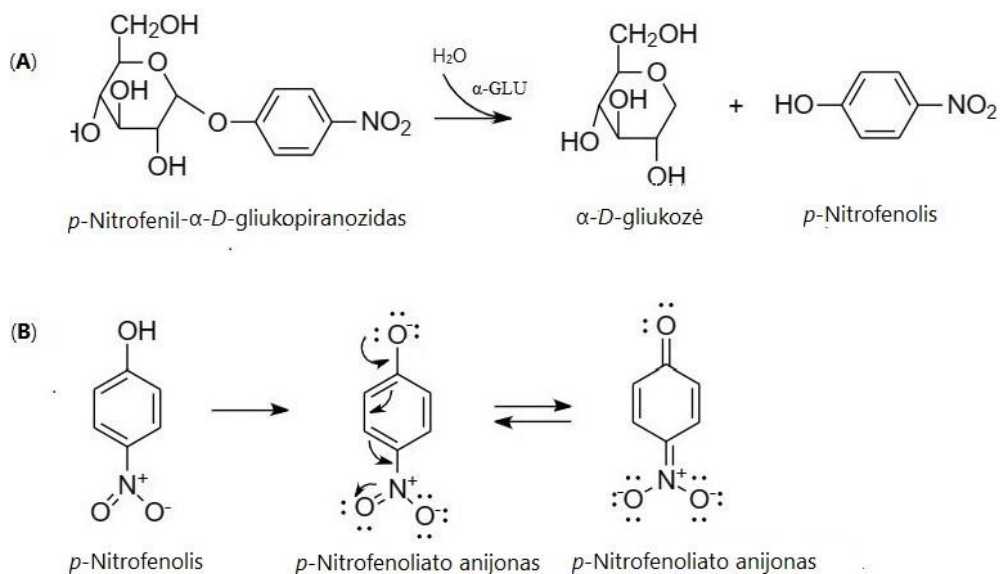
Atliktų tyrimų apie vaistinio augalo saldžialapės kulkšnės (*A. glycyphyllos* L.) veiksmingumą mažinant angiotenzino-I konvertuojančio fermento aktyvumą nepavyko rasti. Tačiau randama duomenų apie ankstesnėse studijose tirtų kitų *Astragalus* L. genties rūšių augalinių ruošinių atliktus tyrimus. Seo ir kt. (2005) [130] nustatė, kad metanolinis *A. membranaceus* ekstraktas 45,0 proc. sumažino fermento aktyvumą esant 5 mg/ml koncentracijai.

1.2.5. Hidrolazės fermentų aktyvumo tyrimo metodai

Fermento aktyvumo nustatymas yra vienintelis svarbiausias parametras, įrodantis fermento funkcionavimą. Yra žinoma, kad fermentų aktyvumas tiek *in vitro*, tiek *in vivo* aplinkoje priklauso nuo temperatūros, pH terpės ir substrato koncentracijos [86]. Be minėtų sąlygų, mokslinėje literatūroje aprašyti biologiniai tyrimo metodai *in vivo* dažnai skiriasi nuo esamų sąlygų, vyraujančių *in vitro* aplinkoje. Todėl, siekiant nustatyti fermento aktyvumą *in vitro*, daugeliu atvejų šiek tiek keičiamos žinomų metodų sąlygos ir taip pritaikomos prie sąlygų, vyraujančių *in vitro* aplinkoje.

Didžioji dauguma apibūdintų metodų hidrolazės klasės fermentų aktyvumui nustatyti ir aptikti, kaip ir visų kitų fermentų, yra pagrįsti optiniais matavimo metodais. Tarp optinių tyrimo metodų, taikomų fermentų aktyvumui nustatyti ir aptikti, kolorimetrinis tyrimo metodas taikomas dažniau, palyginti su kitais metodais – fluorescencija, turbidimetrija ar poliarimetrija [131, 132]. Kaip žinoma, kolorimetrinis tyrimo metodas pagrįstas junginio, atpalaiduoto naudojant fermentą iš substrato, kiekybiniu vertinimu. Kaip fermentinėje sistemoje per hidrolizės vyksmą fermentas gebės atpalaiduoti būdingas molekules, labai priklauso nuo substrato savybių. Kaip pavyzdį galima paminėti substratą *p*NPG, kuris turi panašias chemines grupes, kaip dauguma glikozidazių (EC 3.2.1) poklasio fermentų. Be šios savybės, substratas turi ir chromogeninių savybių, kurios per fermentinės hidrolizės vartimą formuoja geltonos spalvos produktą/us – nitrofenolio darinius, kurie lengvai aptinkami regimos šviesos diapazone [133]. Tuo paaiškinamas pastarojo substrato

naudojimas daugelio glikozidazių aktyvumo nustatymo ir slopinimo įvertinimo tyrimuose. Dėl substrato turimų chromogeninių savybių šie tyrimai dažniausiai įvardijami kaip chromogeniniai metodai ar spektrofotometriniai α -gliukozidazės nustatymo metodai. Šio metodo esmė tai, kad α -GLU katalizuoja *p*NPG virtimą α -*D*-gliukoze ir *p*-nitrofenoliu fermentinės hidrolizės metu [134]. Taip susidaro geltonos spalvos produktas (*p*-nitrofenolis; $C_7H_5NO_3$) (1.4 pav.), kurio kiekybinis vertinimas nustatomas pagal tirpalo šviesos sugertį esant $\lambda = 405$ nm bangos ilgiui [134]. Taip pat reiktų paminėti ne mažiau svarbų metodikose nurodomą reagentą – natrio karbonatą, kurio panaudojimas reakcijos pabaigoje aiškinamas kaip fermentinės reakcijos sustabdymas [134] ir / ar chromatinių savybių padidinimas [133]. Įdomu tai, kad pastarasis reagentas ne visada fermento aktyvumo nustatymo tyrimuose naudojamas [135, 136]. Pastebima, kad nėra vieningo metodo, tačiau visiems šiems metodams bendra yra tai, kad per hidrolizės vyksmą atpalaiduotas *p*-nitrofenolis labai svarbus fermento kiekybiniam įvertinimui. Šio junginio (*p*-nitrofenolio) susidarymas katalizuojant α -gliukozidazei parodytas žemiau (1.4 pav.).

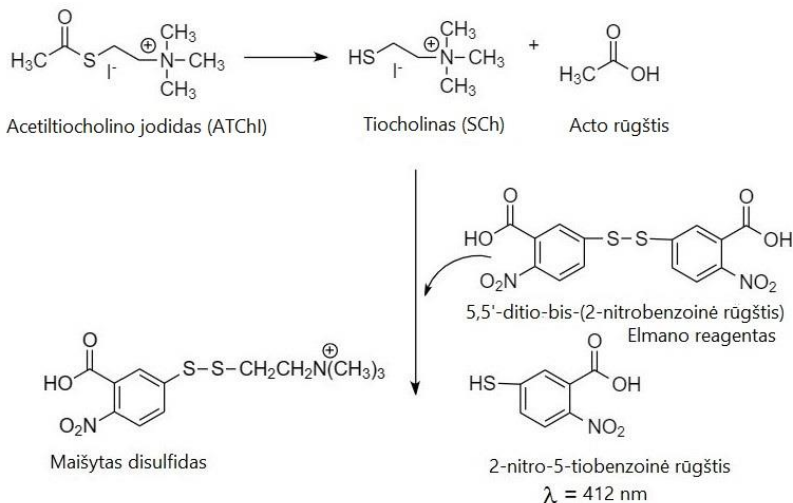


1.4 pav. *p*-Nitrofenil- α -*D*-gliukopiranozido virtimas *p*-nitrofenoliu katalizuojant α -gliukozidazei

Kaip matyti iš schemas, pirmoji reakcija (A) parodo chromogeninio substrato, *p*-nitrofenil- α -*D*-gliukopiranozido, virtimą į alfa-*D*-gliukozę ir *p*-nitrofenolį katalizuojant α -gliukozidazei. Antroji reakcija (B) parodo, kaip *p*-nitrofenolio hidroksilo grupė (-OH) praranda protoną (H^+) šarminėje terpėje. Dėl vykstančio intramolekulinio vandenilinio ryšio disociacijos fenolio žiede susidaro *p*-nitrofenoliato anijonas (1.4 pav., B), kurio sugertis matuojama 400–420 nm bangų tarpsnyje [137]. Žinant tai, kad antroje reakcijos stadijoje, atskilus protonui nuo hidroksilo grupės (-OH), susidaro spalvota (geltona) *p*NP neprotonuota forma

(anijoninė forma) (**1.4 pav., B dalis**), peršasi mintis, kad dalinai pasikeitęs sugerties spektras labai priklauso nuo terpės charakteristikos. Taip pat žinant, kad fermento aktyvumą *in vitro* gali stipriai paveikti gamtiniai inhibitoriai, nėra aišku, ar jie turi įtakos chromatinių savybių padidimui šarminėje terpėje *in vitro*. Nors gausus tyrimų, vertinančių α -gliukozidazės aktyvumą *in vitro* veikiant gamtiniais inhibitoriais, skaičius, tačiau išvalgų ar rekomendacijų nėra daug. Neseniai atliktas Syedd-León ir kt. lipazių aktyvumo tyrimas, kurio metu buvo taikytina platesnė *p*-nitrofenolio analizė [138]. Tyrėjų išvalgos parodė, kad, priklausomai nuo pH vertės, temperatūros, fermentinės reakcijos terpės, sustiprėja / susilpnėja *p*-nitrofenolio atsakas. Pabrėžiama, kad tyrimo metu šie kintamieji turi būti griežtai kontroliuojami. Todėl nenuostabu, kad metodo parinkimas fermento aktyvumui įvertinti fermentinės reakcijos sistemose *in vitro* išlieka atviru klausimu. Pažymint, kad α -gliukozidazės aktyvumą *in vitro* veikiant gamtiniais inhibitoriais įrodančių panašių tyrimų nepavyko rasti.

Kaip jau buvo minėta, taikant chromogeninį substratą galima aptikti ir nustatyti daugelio hidrolazės klasės fermentų aktyvumą. Tačiau nustatant fermentų aktyvumą ne mažiau svarbūs – spalviniai reagentai. Pastarieji, skirtingai nei chromogeniniai substratai, hidrolizės metu išsiskyrusį junginį nudažo jam būdinga spalva. Iš tokių reagentų galima paminėti Elmano reagentą, kuris ypač svarbus nustatant acetilcholinesterazės aktyvumą *in vivo* [139]. Šio metodo esmė ta, kad acetilcholinesterazė katalizuoja acetiltiocholino virtimą tiocholinu (SCh) fermentinės hidrolizės metu. Šiam junginiui reaguojant su Elmano reagentu (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoinė rūgštis), susidaro geltonos spalvos chromoforas (2-nitro-5-tiobenzoatas) (**1.5 pav.**), kurio kiekis nustatomas matuojant tirpalo šviesos sugertį esant $\lambda = 412$ nm bangos ilgiui [139]. Reakcijos vyksmas pavaizduotas žemiau pateiktoje schemoje (**1.5 pav.**)

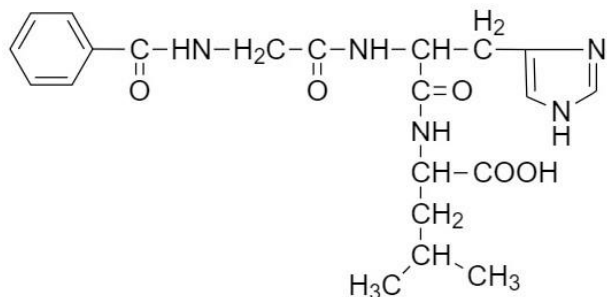


1.5 pav. Acetiltiocholino jodido virtimas tiocholinu katalizuojant acetilcholinesterazei ir chromoforo susidarymas reaguojant su Elmano reagentu

Kaip žinoma, pastarąjį metodą, kaip nustatyti acetilcholinesterazės aktyvumą, aprašė vokiečių mokslininkas Elmanas G. [139]. Dabar šis metodas gerai žinomas ne tik biocheminiuose tyrimuose *in vivo*, bet ir *in vitro*. Tai įrodo ir Santos kartu su bendraautorais (2018) [114] paskelbtas apžvalginis straipsnis, teigiantis, kad Elmano metodas plačiai taikomas tiriant augalinių ekstraktų ir išskirtų junginių, *AChE slopiklių*, veiksmingumą mažinant acetilcholinesterazės aktyvumą. Verta paminėti, kad Elmano metodas pripažintas visame pasaulyje kaip auksinis standartas acetilcholinesterazės aktyvumui nustatyti [114].

Skirtingai nuo aptartųjų kolorimetrinio metodo taikymo principų, fermento aktyvumas nustatomas ne tik pagal fermentinėje reakcijoje naudoto spalvinio reagento ir / ar chromogeninio substrato duomenis. Atskirai būtina paminėti ir įvairiomis reakcijomis su skirtingais substratais mokslo pagrįstus metodus, būdingus hidrolazės klasei priklausančiam AKF fermentui. Fermento aktyvumas tiek *in vitro*, tiek *in vivo* aplinkoje nustatomas tuo pačiu principu, kaip aukščiau aprašytuose kolorimetriniuose metoduose ir / ar spalvinėse reakcijose. Tačiau skirtumas tarp UV spektrofotometrinio metodo ir optinio kolorimetrinio metodo yra tas, kad nekolorimetrinis metodas enzimologiniu požiūriu padeda įvertinti fermento aktyvumą pagal substrato konversijos santykį naudojant platų UV/regimojo spektro šviesos diapazoną nei tai galima įvertinti kolorimetriniu metodu. Galima paminėti tokius spektrofotometrinius metodus, kaip Cushman ir Cheung (1971) [140], pagrįstą substrato hipuril-histidil-leucino (HHL) naudojimu (λ : 228 nm); Hayakari ir kt., (1978) [141], pagrįstą hipuril-histidil-leucino (HHL) naudojimu, kuriam būdinga spalvinė reakcija įdėjus 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazino kaip spalvinio reagento (λ : 382 nm); Holmquist ir kt. (1979) [142], pagrįstą kito substrato, 3-(2-furilakriloil)-L-Phe-Gly-Gly, naudojimu (λ : 340 nm), kuriam po hidrolizės būdingas mėlynas sugerties spektro poslinkis; Ronca-Testoni (1983) [143], pagrįstą panašiu principu, kaip Holmquist ir kt. (1979), tik su nedideliais metodo pakeitimais (λ : 345 nm). Panašiu principu nedidelius pakeitimus tolesniuose tyrimuose atliko Neels ir kt. (1983) [144], kaip substratą naudodami hipuril-glycyl-gliciną ir 2,4,6-trinitrobenzeno sulfono rūgštį kaip spalvinį reagentą (λ : 415 nm).

Apibūdintieji metodai plačiai taikomi iki šių dienų. Visų šių metodų pagrindinė esmė – tai hipuro rūgšties išsiskyrimas hidrolizės metu, ji pavaizduota substrato – hipuril-His-Leu struktūrinės formulės sudėtyje žemiau (**1.6 pav.**):



1.6 pav. Hipuril-His-Leu struktūrinė formulė

Apibendrinimas. Šiame skyriuje apžvelgta mokslinė, etnofarmakologinė ir kita informacija apie *Dioscorea L.* genties ir *Astragalus L.* genties augalų rūšių skirtingų anatominių dalių fitocheminius ir biologinius tyrimus. Atskležiama *D. nipponica*, *D. caucasica* ir *A. glycyphyllos* augalų rūšių naudojimo tyrimų įvairovė. Aprašyti hidrolazės klasės fermentai, jų fiziologinis poveikis ir gamtinių inhibitorių kryptingas poveikis fiziologiškai svarbiems fermentams – α -amilazei, α -gliukozidazei, angiotenziną konvertuojančiam fermentui ir acetilcholinesterazei. Taip pat apžvelgti hidrolazės fermentų aktyvumo nustatymo metodai, išsiaiškinta jų metodologija. Akcentuojami tik gliukozidazėms (EC 3.2.1.-), acetilcholinesterazės (EC 3.1.1.7) ir angiotenziną konvertuojančio fermento inhibitoriaus (EC 3.4.15.1) aktyvumui nustatyti metodai. Kiti hidrolazės tyrimo metodai neapžvelgiami, nes šie metodai tolimesniame disertacijos darbe nenagrinėjami. Atlikta literatūros analizė nulemia tolimesnių tyrimų kryptį.

2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

2.1. Tyrimų objektai

Tyrimams pasirinktos skirtingų genčių rūšys: *Dioscorea* spp. *caucasica*, *nipponica* ir *Astragalus* spp. *glycyphyllos*. Šios rūšys auginamos Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodo vaistinių augalų kolekcijoje. Tirti lapų ėminiai surinkti žydėjimo pradžioje, o šakniastiebiai iškasti vegetacijos laikotarpiu. Surinkta žaliava, t. y. lapai, džiovinta kambario temperatūroje paskleidus plonu sluoksniu gerai vėdinamoje, nuo tiesioginių saulės spindulių apsaugotoje patalpoje. Nenulupti šakniastiebiai su šaknimis (lot. *Rhizoma cum radicibus Dioscorea*) supjaustyti 10–15 cm ilgio gabalėliais ir džiovinti džiovyklėje (Sencor food dehydrator, SFD 742 RD, Kinija) $50 \pm 0,5$ °C temperatūroje. Džiovinti lapai šviesiai žalios spalvos, silpno kvapo, šakniastiebiai – cilindriškos formos gabaliukai rudos spalvos paviršiumi, vidus gelsvai baltos spalvos, salstelėjusio skonio.

Visos džiovintos augalų dalys buvo sumaltos į smulkius miltelius su Reatsch ZM200 malūnu (*Reatch GmbH*, Haanas, Vokietija), kurio sietas su 0,5 mm dydžio akutėmis.

2.2. Reagentai

Natrio hidroksido granulės (NaOH, > 99 proc., *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, JAV); natrio monovandenilio dikarbonatas (NaHCO₃, gr.an., ≥ 99,5 proc., *Eurochemicals*, Vilnius, Lietuva); natrio chloridas (NaCl, gr.an., ≥ 99,5 proc., *Eurochemicals*, Vilnius, Lietuva); kalio divandenilio monofosfatas (KH₂PO₄, gr.an., *Eurochemicals*, Vilnius, Lietuva); dikalio vandenilio monofosfatas (K₂HPO₄, gr.an., *Eurochemicals*, Vilnius, Lietuva); dinatrio monofosfatas (Na₂HPO₄, *Eurochemicals*, Vilnius, Lietuva); natrio divandenilio monofosfatas (NaH₂PO₄, gr.an., *Eurochemicals*, Vilnius, Lietuva); kalio natrio tartratas tetrahidratas (C₄H₄KNaO₆·4H₂O, gr.an., ≥ 97 proc., *Eurochemicals*, Vilnius, Lietuva); vandenilio dioksoboratas (H₃BO₃, gr.an., ≥ 99,5 proc., *Eurochemicals*, Vilnius, Lietuva); natrio karbonatas bevandenis (Na₂CO₃, gr.an., ≥ 99,5 proc., *Eurochemicals*, Vilnius, Lietuva); *p*-Nitrofenolis (*p*NP: C₆H₅NO₃, gr.an., 99 proc., *Alfa Aesar*, Kandelis, Vokietija); *p*-Nitrofenil- α -*D*-gliukopiranozidas (*p*NPG: ≥ 99 proc., *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, JAV); 1M vandenilio chlorido tirpalas (HCl, *Merck KGaA*, Darmštatas, Vokietija); akarbozė (C₂₅H₄₃NO₁₈, *Merck KGaA*, Darmštatas, Vokietija); *N*-[3-(2-furil)akrioloil]-*L*-fenilalanine-glicil-glicinas (FAPGG: C₂₀H₂₁N₃O₆, gr.an., ≥ 99 proc., *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, JAV), 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoinė rūgštis) (DTNB, gr.an., ≥ 99 proc., *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, JAV); acetiltiocholino jodidas (ATChI: CH₃COSCH₂CH₂N(CH₃)₃I, gr.an., ≥ 98 proc., *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, JAV); Trizma bazė (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, JAV); krakmolas iš bulvių (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, JAV); 3,5-dinitrosalicilo rūgštis (DNS, gr.an., 98 proc., *Acros Organic*, Gelis, Belgija); kaptoprilio tabletės (C₉H₁₅NO₃S, *Salutas Pharma GmbH*, Barlebenas, Vokietija); donepezilio hidrochlorido tabletės (C₂₄H₂₉NO₃·HCl, *Accord Healthcare Limited*, Londonas, JK). Analitinio ir chromatografinio švarumo reagentai: neochlorogeno rūgštis, chlorogeno rūgštis,

rutinas, kvercitrinas (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, JAV). Gradientinio švarumo acetonitrilas (C_2H_3N , ≥ 99 proc., *Sigma-Aldrich*, Šnelldorferis, Vokietija); metanolis (CH_3OH , ≥ 99 proc., *Sigma-Aldrich*), etanolis (C_2H_5OH , 96,3 proc., *Stumbras*, Kaunas, Lietuva); metano rūgštis ($HCOOH$, *Sigma-Aldrich*, Šnelldorferis, Vokietija). Išgrynintas dejonizuotas vanduo (laidumas $2,3 \text{ mS cm}^{-1}$ ir varža $18,2 \text{ mU cm}$) ruoštas vandens valymo Millipore 185 sistema (*Millipore*, Bedfordas, MA, JAV). Tirpalų pH matavimai atlikti Agilent 3200P (*Agilent Technologijos, Inc.*, Šanchajus, Kinija) pH-metru $\pm 0,1$ vieneto tikslumu.

Fermentai: α -gliukozidazė (EC 3.2.1.20) gauta iš *Saccharomyces cerevisiae* mielių, liofilizuoti milteliai ≥ 10 veikimo vienetų/mg baltymo (*Sigma-Aldrich Chemie*, Saint Louis, MO, JAV), angiotenziną konvertuojantis fermentas gautas iš triušio plaučių, acetoniniai milteliai (L-0756, *Sigma-Aldrich Chemie*, Saint Louis, MO, JAV); acetilcholinesterazė (EC 3.1.17) gauta iš *Electrophorus electricus*, tipas VI-S; liofilizuoti milteliai, 200 – 1000 veikimo vienetų/mg baltymo (C3389, *Sigma-Aldrich Chemie*, Taufkirchenas, Vokietija), α -amilazė (EC 3.2.1.1) gauta iš *porcine pancreas* 1151 veikimo vienetų/mg baltymo (A6255, *Sigma-Aldrich Chemie*, Saint Louis, MO, JAV).

2.3. Liofilizuoto etanolinio ekstrakto paruošimas

Liofilizuoti ekstraktai ruošiami maceracijos metodu. Džiovinți susmulkinti miltelių pavidalo lapai / šakniastiebiai (20,0 gramų) ekstrahuojami 200 ml 70 proc. (v/v) etanoliu purtant per naktį mechanine purtykle (200 aps./min) kambario temperatūroje $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Gautas mėginys filtruojamas pro popierinį filtrą (Whatman® No.1, *Whatman International Ltd.*, Maidstonas, JK). Po to filtratas užpilamas 100 ml etanoliu (70 proc. v/v) ir vėl vykdoma maceracija 1 val. Gautas mėginys vėl filtruojamas. Filtratas ir praplovos supilami į apvaliadugnę kolbą. Sukamajame garintuve Büchi Rotavapor R-210 (*Büchi Labortechnik*, Flawil, Šveicarija), vandens vonelėje palaikant 40°C temperatūrą, esant sumažintam slėgiui (0,06 MPa), tirpalas nugarinamas. Gaunama tiršta konsistencija. Gautas koncentratas atvėsinaamas per naktį šaldytuve iki -4°C ir džiovinamas liofilizatoriuje (*Maxi Dry Lyo*, Jonan Allerod, Danija) esant -55°C temperatūrai.

Sausų ekstraktų gautas išėigas sudarė: kaukazinių dioskorėjų lapai – 17,86 proc., kaukazinių dioskorėjų šakniastiebiai – 15,65 proc.; niponinių dioskorėjų lapai – 24,76 proc., niponinių dioskorėjų šakniastiebiai – 16,24 proc., saldžialapės kulkšnės lapai – 26,3 proc. Sausi etanoliniai ekstraktai laikyti tamsaus stiklo buteliukuose.

2.4. Fermentinių reakcijų mišinių paruošimas

Fermentų aktyvumas nustatytas taikant šiuos metodus: α -gliukozidazės aktyvumas nustatytas chromogeniniu metodu naudojant pNPG substratą [134]; α -amilazės aktyvumas nustatytas kolorimetriniu metodu [145]; acetilcholinestrazės aktyvumas nustatytas Elmano metodu [139]; angiotenzino konvertuojančio fermento inhibitoriaus aktyvumas nustatytas pagal Vermerissen ir kt. (2002) [146], Holmquist ir kt. (1979) [142] ir Ronca-Testoni (1983) [143] aprašytas metodikas.

Keičiant šių metodų sąlygas, tačiau laikantis pagrindinių tyrimo metodų aspektų, biologiniai tyrimai buvo pritaikyti nustatant ekstraktų gebą slopinti fermentų aktyvumą *in vitro*.

2.4.1. Fermentinės reakcijos mišinio paruošimas α -gliukozidazės aktyvumui nustatyti

α -gliukozidazės aktyvumas nustatytas *in vitro* chromogeniniu metodu, kaip substratą naudojant *p*-nitrofenil- α -*D*-gliukopiranozidą (*p*NPG) [134]. Kiekvienos fermentinės reakcijos mišinio (1000 μ l) sudėties modelis susidėjo iš: 0,1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 fosfato buferinio tirpalo (pH $6,8 \pm 0,05$), skirtingos ekstraktų lapų koncentracijos: (1) 0,3125–200 μ g/ml, *Dioscorea nipponica* Makino ir / ar *Dioscorea caucasica* Lipsky folium; (2) 100–400 μ g/ml *Astragalus glycyphyllos* L. folium, 0,33 mM *p*NPG koncentracijos ir nekintančio (5 μ l) α -gliukozidazės tirpalo tūrio. Reakcijos mišinys inkubuotas 30 min. $37 \pm 0,2$ °C temperatūroje.

Metode panaudoti du atvejai α -gliukozidazės aktyvumui nustatyti. Pirmuoju atveju fermentinės reakcijos mišinys veikiamas 0,1M Na_2CO_3 reagentu, antruoju – fermentinės reakcijos mišinys nebuvo veikiamas 0,1M Na_2CO_3 reagentu.

Tiriamųjų tirpalų šviesos sugerties dydis matuotas Spectronic Genesys 8 spektrofotometru (*Thermo Spectronic*, Rochester, NY, JAV) 1 cm storio kiuvetėje 405 nm ilgio bangoje. Kontrolinis tirpalas buvo identiškas tiriamajam, tik vietoje slopiklio tirpalo naudotas 0,1M kalio fosfato buferinis tirpalas (pH $6,8 \pm 0,05$). Tyrimai buvo pakartoti tris kartus. α -gliukozidazės aktyvumo sumažėjimas procentais apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{aktyvumo sumažėjimas \%} = \frac{(A_{\text{kontrolė}} - A_{\text{slopiklis}})}{A_{\text{kontrolė}}} \times 100, \quad (1)$$

čia: $A_{\text{kontrolė}}$ – kontrolinio tirpalo šviesos sugertis;

$A_{\text{slopiklis}}$ – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis.

Tam, kad būtų įvertintos kinetinės konstantos (K_m , V_{max}), fermento (F) ir substrato (S) sąveikos modelis, susijęs su produkto (P) virsmu ($S \xrightarrow{E} P$), sudarytas taip, kaip tai buvo daroma procentinio α -gliukozidazės aktyvumo nustatymo atveju, tik kiekvienos fermentinės reakcijos mišinio sudėtis skyrėsi substrato kiekiu. Taip kiekvienos fermentinės reakcijos sistemos vyksmui substrato kiekis parinktas tokiais intervalais:

- (1) 0,1–0,33 mM *p*NPG: 25 μ g/ml niponinių dioskorėjų lapų ekstrakto;
- (2) 0,05–0,33 mM *p*NPG: 15 ir 25 μ g/ml kaukazinių dioskorėjų lapų ekstrakto;
- (3) 0,1–0,5 mM *p*NPG: 140, 200 μ g/ml saldžialapės kulkšnės lapų ekstrakto;
- (4) 0,075–0,33 mM *p*NPG: 500 μ g/ml niponinių dioskorėjų šakniastiebių ekstrakto;
- (5) 0,004–0,33 mM *p*NPG: 200 ir 500 μ g/ml kaukazinių dioskorėjų šakniastiebių ekstrakto.

Visos reakcijos inicijuotos pridėdant nekintantį (5µl) tūrį α-gliukozidazės tirpalo. Tolimesnė tyrimo eiga analogiška aukščiau tame pačiame poskyryje aprašytai eigai.

2.4.2. Fermentinės reakcijos mišinio paruošimas α-amilazės aktyvumui nustatyti

α-amilazės aktyvumas *in vitro* nustatytas kolorimetriniu metodu (Milerio reakcija), kaip substratą naudojant bulvių krakmolą [145]. Fermento tirpalas praskiedžiamas santykiu 1:1000 0,02 mM natrio fosfato buferiniu tirpalu (pH 6,9 ± 0,01), turinčiu 6,7 mM natrio chlorido. Kiekvienos fermentinės reakcijos mišinio sudėties modelis susidėjo iš: 0,02 mM natrio fosfato buferinio (pH 6,9 ± 0,01) tirpalo, turinčio 6,7 mM natrio chlorido, skirtingos ekstraktų lapų koncentracijos: (1) 40–480 µg/ml *Dioscorea caucasica* Lipsky *folium*, (2) 40–800 µg/ml *Dioscorea nipponica* Makino *folium*, (3) 80–800 µg/ml *Astragalus glycyphyllos* L. *folium* ir nekintančio tūrio (400 µl) α-amilazės (0,5 IU/ml) tirpalo. Reakcijos mišinys inkubuotas 25 ± 0,2 °C temperatūroje, 30 min. Po to, pridėjus 400 µl 1 proc. (m/v) bulvių krakmolo tirpalo (0,02 mM natrio fosfato buferis, pH 6,9 ± 0,5), reakcijos mišinys toliau inkubuotas dar 3 min. Tada fermentinė reakcija sustabdyta pridėjus 800 µl DNS tirpalo ir 10 minučių kaitinta vandens vonioje 85 ± 0,2 °C temperatūroje. Po to reakcijos mišinys buvo atšaldomas po tekančiu vandeniu ir praskiedžiamas 3 ml distiliuoto vandens. Tiriamųjų tirpalų šviesos sugertis matuota Spectronic Genesys 8 spektrofotometru (*Thermo Spectronic*, Rochester, NY, JAV) 1 cm storio kiuvetėje 540 nm ilgio bangoje.

Akarbozės tirpalas ir 0,02 mM natrio fosfato buferinis tirpalas (pH 6,9 ± 0,01) buvo naudojami atitinkamai kaip teigiama ir neigiama kontrolė. Slopliklio teigiama kontrolė akarbozės standartinė medžiaga paruošta kaip 1mg/ml tirpalas distiliuotame vandenyje. Tyrimai buvo pakartoti tris kartus, o α-amilazės aktyvumo sumažėjimas procentais apskaičiuotas pagal anksčiau nurodytą formulę (2.4.1. poskyris).

2.4.3. Fermentinės reakcijos mišinio paruošimas AChE aktyvumui nustatyti

Acetilcholinesterazės (AChE) aktyvumas *in vitro* nustatytas Elmano metodu, kaip substratą naudojant ATChI [139]. Kiekvienos fermentinės reakcijos mišinio sudėties modelis susidėjo iš: 50mmol/l Tris/HCl buferinio tirpalo (pH 8,0 ± 0,05), skirtingos ekstraktų lapų koncentracijos: (1) 25 – 100 µg/ml, *D. caucasica* Lipsky *folium*; (2) 25 – 80 µg/ml *D. nipponica* Makino *folium*, 0,05 mmol/l DTNB, 0,55U AChE nekintančio (10µl) tirpalo tūrio. Reakcijos mišinys inkubuotas 10 min., 20°C ± 0,2°C kambario temperatūroje. Po to pridėta 2,5 mM ATChI substrato tirpalo, kuris reaguodamas su Elmano reagentu sudarė geltonos spalvos DTNB-S kompleksą (C₇H₅NO₄S). Susidariusios tiolinės grupės kiekis matuotas Genesys 50 UV/Vis spektrofotometru (*GENESYS Instruments Limited*, Kembridžas, J.K) 1 cm storio kiuvetėje 412 nm ilgio bangoje.

Donepezilio hidrochlorido tirpalas ir 0,1 M Tris/HCl buferinis tirpalas (pH 8,0 ± 0,01) buvo naudojami atitinkamai kaip teigiama ir neigiama kontrolė. Tyrimai buvo pakartoti tris kartus, o AChE aktyvumo sumažėjimas procentais apskaičiuotas pagal

anksčiau nurodytą formulę (2.4.1. poskyris). Fermento specifinis aktyvumas¹⁰ nustatytas spektrofotometriškai esant 412 nm bangos ilgiui ir naudojant TNB molinės sugerties koeficientą $\varepsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [147] ir buvo išreikštas $\mu\text{mol SCh}/\text{min}/\text{mg}$ baltymo.

Tam, kad būtų įvertintos kinetinės konstantos (K_m , V_{max}), fermento (F) ir substrato (S) sąveikos modelis, susijęs su produkto (P) virsmu ($S \xrightarrow{F} P$), sudarytas taip, kaip tai buvo daroma procentinio AChE aktyvumo nustatymo atveju, tik kiekvienos fermentinės reakcijos mišinio sudėtis skyrėsi substrato kiekiu. Taigi kiekvienos fermentinės reakcijos sistemos vyksmui substrato kiekis parinktas tokiais intervalais: (1) 45–160 μM ATChI: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kaukaziųjų dioskorėjų lapų ekstrakto; (2) 41,25–110 μM ATChI: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ir 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ niponinių dioskorėjų lapų ekstrakto; (3) 0,04–0,24 mM, ATChI: 190 $\mu\text{g}/\text{ml}$ saldžialapės kulkšnės lapų ekstrakto. Tolimesnė tyrimo eiga analogiška aukščiau tame pačiame poskyryje aprašyti eiga.

2.4.4. Fermentinės reakcijos mišinio paruošimas AKF aktyvumui nustatyti

Angiotenziną konvertuojančio fermento aktyvumas *in vitro* nustatytas pagal Vermerissen ir kt. (2002) [146] Holmquist ir kt. (1979) [142] ir Ronca-Testoni (1983) [143] aprašytas metodikas kaip substratą naudojant *N*-[3-(2-furil)akriloil]-*L*-fenilalanine-glycyl-gliciną (FAPGG). Kiekvienos fermentinės reakcijos mišinio sudėties modelis susidėjo iš: 80 mM dinatrio tetraborato (pH $8,3 \pm 0,05$) buferinio tirpalo, turinčio 300 mmol/l natrio chlorido, 300 μl AKF tirpalo ir skirtingų lapų ekstrakto koncentracijų 250, 500, 1000, 1250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Reakcijos mišinys inkubuotas 3-5 min. kambario temperatūroje. Po to buvo pridama 800 μl 0,8 mmol/l FAPGG substrato tirpalo. Tiriamųjų tirpalų šviesos sugerties dydis matuojamas Biochrom Libra S4+ visible spektrofotometru (*Biochrom Ltd.*, Kembridžas, JK) 1 cm storio kiuvetėje esant 340 nm bangos ilgiui, skirtingais laiko intervalais: po 1 min. ir po 20 min. $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ temperatūroje. Kontrolinis tirpalas identiškas tiriamajam, tik vietoje slopinamojo tirpalo naudotas 80 mM dinatrio tetraborato buferinis tirpalas (pH $8,3 \pm 0,05$). Slopinklio teigiama kontrolė kaptoprilio vaistas paruoštas kaip 1mg/ml tirpalas distiliuotame vandenyje [148]. Tyrimai buvo pakartoti tris kartus. AKF aktyvumas ir jo slopinimas procentais (%) apskaičiuotas pagal formulę:

$$\% = 100 - \left(\left(\frac{\Delta A_{\text{slopiniklis}}}{\Delta A_{\text{kontrolė}}} \right) \times 100 \right), \quad (2)$$

čia: ΔA yra skirtumas tarp pradinės ir galutinės šviesos sugerties.

2.5. Kinetinių savybių įvertinimas

Fermentų kinetikoje pagrindiniai parametrai: Michaelio ir Menteno konstanta (K_m), didžiausias reakcijos greitis (V_{max}) ir inhibicijos konstanta (K_i) įvertinti pagal Lainuiverio ir Berko tiesių dvigubos atvirkštinės lygtį (4) ir Michaelio ir Menteno lygtį (3) [149, 150]:

¹⁰ Specifinis aktyvumas – tai fermento vienetų skaičius 1 mg baltymo ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, arba U/mg baltymo). Kučinskienė, 2008.

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}, \quad (3)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}, \quad (4)$$

čia: V – reakcijos greitis,
 K_m – Michaelio ir Menteno konstanta,
 V_{max} – didžiausias reakcijos greitis,
 $[S]$ – substrato koncentracija.

Ekstraktams būdingas slopinamojo poveikio tipas fermentams nustatytas pagal Lainuiverio ir Berko tiesių grafikus. Konkurencinio slopinimo atveju, didėjant slopiklio [I] koncentracijai, fermentinės reakcijos tiesė sukasi apie ordinatės ašies tašką $1/V_{max}$. Nekonkurencinio slopinimo atveju didėjant slopiklio [I] koncentracijai, tiesė sukasi apie abscisės ašį $-1/K_m$ [151, p.114]. Bekonkurencinio slopinimo atveju, didėjant slopiklio [I] koncentracijai, tiesės viena su kita nesusikerta ordinačių ašyje. Apibendrinti slopinimo modelio tipai (2.1 lent.) pateikti žemiau.

2.1 lentelė. Slopinimo tipo modelių paaiškinimai

Slopiklio tipas	Poveikis V_{max}	Poveikis K_m	Poveikis L-B ⁶ , nuolydžiui ¹¹	Susikirtimo vieta
Konkurencinis ¹²	↔	↑	↑	Ordinatės ašis
Bekonkurencinis ¹³	↓	↓	↔	-
Nekonkurencinis ¹⁴				
Paprastas	↓	↔	↑	Abscisės ašis
Mišrus: I tipas	↓	↑	↑	Kitas kvadratas
Mišrus: II tipas	↓	↓	↑	Trečias kvadratas

L-B⁶, Lainuiverio ir Berko grafikas; padidėjimas žymimas „↑“, sumažėjimas – „↓“, pokyčio nėra – „↔“.
 Lentelė adaptuota pagal Engel [152] su leidėjo leidimu.

Apskaičiuojant slopinimo konstantą (K_i) taikyta formulė:

$$K_{m(app)} = K_m (1 + [I]/K_i), \text{ jei konkurencinis slopinimas,} \quad (5)$$

$$V_{max(app)} = V_{max} (1 + [I]/K_i), \text{ jei nekonkurencinis slopinimas,} \quad (6)$$

čia: $K_{m(app)}$ ir K_m yra lygiagrečiai nustatytos substrato koncentracijos, užtikrinančios 50 proc. didžiausio jo greitį (V_{max}), esant inhibitoriui ir kai jo nėra,

$[I]$ – slopiklio koncentracija,

K_i – slopinimo konstanta.

¹¹ Originalus tekstas: „Effect on slope of L-B plot.“

¹² Originalus žodis: „competitive“.

¹³ Originalus žodis: „uncompetitive“.

¹⁴ Originalus žodis: „noncompetitive“.

2.6. Junginių identifikavimo sąlygos ultraefektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos (UESC-MS/MS) metodu

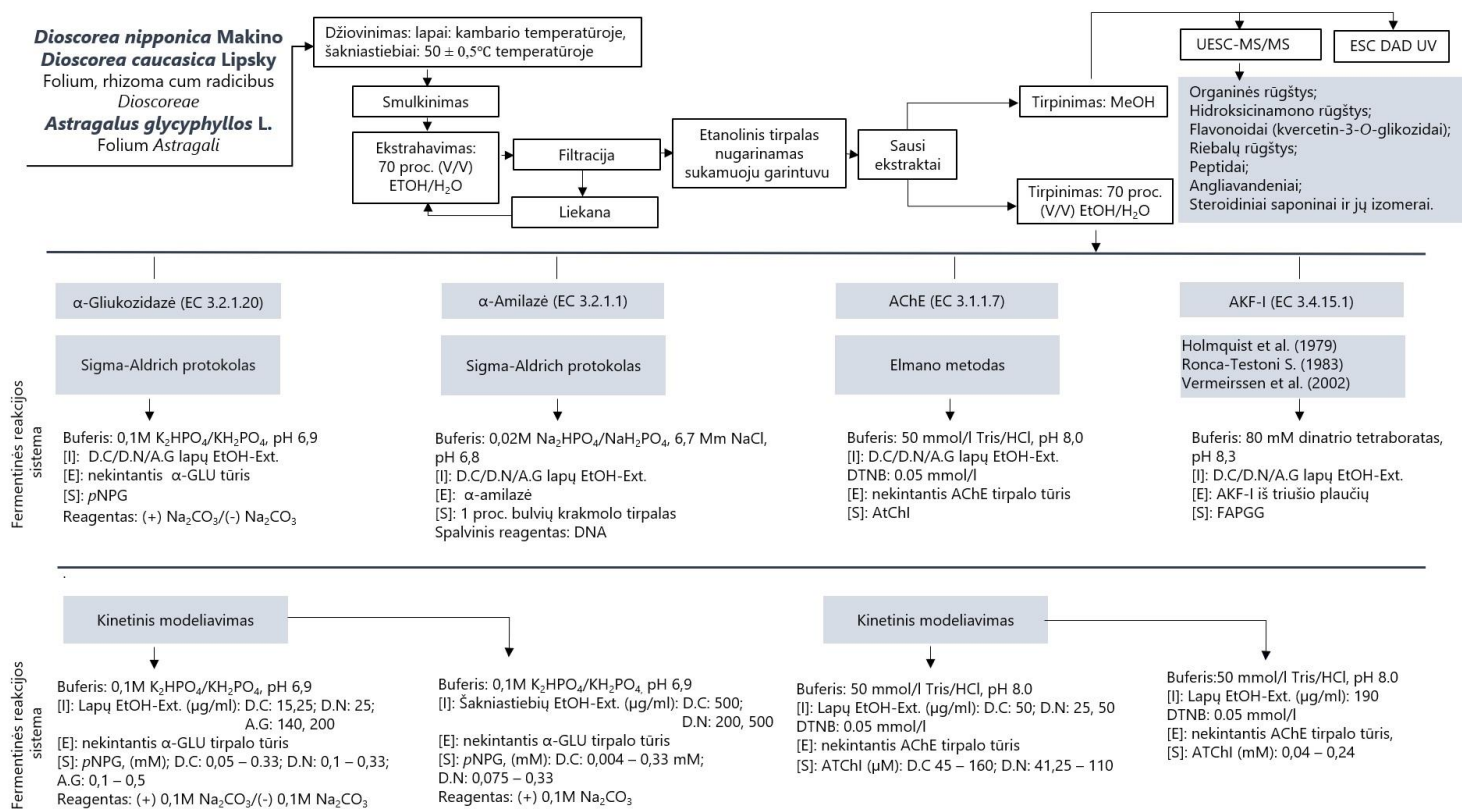
Siekiant apibūdinti ekstraktuose esamus junginių profilius, analizė buvo atlikta naudojant *Waters Acquity ultraefektyviosios skysčių chromatografijos (UESC-MS/MS)* sistemą (*Waters Corporation*, Milford, JAV), turinčią: eliuentų tiekimo sistemą, automatinį mėginių ėmimo įrenginį ir fotodiodų matricos detektorių [153]. Mėginio analitėms išskirstyti naudota ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1×100 mm; dalelių dydis 1,7 μm, *Waters*, JAV) chromatografinė kolonėlė, palaikant 40 °C temperatūrą. Mobiliją sudarė: 0,4 proc. (v/v) skruzdžių rūgšties vandeninis tirpalas (eliuentas A) ir acetonitrilo tirpalas (eliuentas B). Gradiento kitimas: 9- min 100 proc. B tirpiklis, 10- min. 100 proc. B tirpiklis. Eliuento tėkmės greitis 0,4 ml min⁻¹. Mėginio analizės trukmė 12 min., įvedamas tūris – 1 μl. Masių detekcija aptikta kvadrupolio skrydžio laiko (angl. *Quadrupole-Time of Flight*, Q-TOF) tandeminiu masių spektrometru, kuriame integruotas MaXis 4G (*Bruker Daltonics*, Vokietija) masės analizatorius. Duomenų analizė buvo atlikta naudojant DataAnalysis programinės įrangos 4.0 versiją (*Bruker Daltonics*).

Prietaisas buvo nustatytas šiais parametrais: jonizacijos šaltinis – elektropurkštuvinis jonizatorius (ang. *electro-spray ionisation*, ESI), veikiantis neigiamu režimu; kapiliaro įtampa – 4000 V; galinės plokštelės poslinkio įtampa: – 500V; išgarinimo dujų (N₂) temperatūra – 200 °C; išgarinimo dujų (N₂) tėkmės greitis – 1000 l/val.; išpurškimo dujų slėgis – 2,5 bar; MS/MS ribos, 80–1200 m/z; kolizijos energija – 25 V; purškimo įtampa – 5kV; spektro skenavimo greitis – 3Hz.

2.7. Junginių kiekio nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodu

Kiekybinė analizė buvo atlikta efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodu naudojant *Waters 2695 Alliance* sistemą (*Waters*, Milfordas, JAV) su diodų matricos detektoriumi Waters 996 ir 10 μl išvirkštimo kilpa. Mėginio analitėms išskirstyti naudota *Atlantis C18* (250 x 4,6 mm; dalelių dydis 5 μm, *Waters corporation*, JAV) chromatografinė kolonėlė, palaikant 25 °C temperatūrą. Mobiliją sudarė: 0,1 proc. (v/v) trifluoracto rūgšties vandeninis tirpalas (eliuentas A) ir acetonitrilo tirpalas (eliuentas B). Eliucijos gradiento kitimas: 0–8 min, 5 proc. B; 8–30 min, 10–20 proc. B; 20–30 min, 20–40 proc. B; 30–40 min, 40–60 proc. B; 40–45 min, 20–40 proc. B; 30–40 min, 40–60 proc. B; 40–45 min, 60–70 proc. B ir 45–50 min, 70–10 proc. B. Išvirkščiamas tūris – 10 μl filtruoto mėginio tirpalo. UV detektoriaus bangos ilgis – 320 nm chlorogeno ir neochlorogeno rūgščių kiekiams skaičiuoti; 360 nm – rutino ir izokvercitrino kiekiams skaičiuoti. Neochlorogeno rūgšties, chlorogeno rūgšties, rutino ir izokvercitrino nustatytas sulaikymo laikas (t_R) atitinkamai 9, 84, 12, 28, 23, 43 ir 25, 55 min.

Žemiau esančioje schemoje parodytas tyrimų proceso eiliškumas



2.1 pav. Tyrimo proceso eiliškumo schema

D.N – *Dioscorea nipponica* Makino; D.C – *Dioscorea caucasica* Lipsky; A.G – *Astragalus glycyphyllos* L., EtOH-Ext. – etanolinis ekstraktas; (+) – 0,1M Na₂CO₃, reakcija baigiama su Na₂CO₃ reagentu; (–) – 0,1M Na₂CO₃, reakcija baigiama be 0,1M Na₂CO₃ reagento

2.8. Statistiniai duomenų apdorojimo metodai

Statistinis gautų tyrimų rezultatų vertinimas buvo atliekamas naudojant ANOVA priedus Microsoft Excel 2016 programoje. Statistinei duomenų analizei atlikti naudota vienos krypties dispersinė analizė (ANOVA). Palyginant pritaikytas Fišerio mažiausio reikšmingumo skirtumo testas (angl. *least significant difference (LSD) test*). Rezultatai laikyti statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$. Visi tyrimai atlikti po tris kartus, o gauti tyrimų rezultatai pateikiami kaip vidutinės reikšmės \pm standartiniai nuokrypiai (SN) ir / ar standartinės paklaidos (SE).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Junginių nustatymas ultraefektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos (UESC-MS/MS) metodu

Dioscorea spp. *nipponica*, *caucasica* ir *Astragalus* spp. *glycyphyllos* etanolinio ekstrakto kokybė tirta ultraefektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UESC – Q-TOF MS/MS) naudojant Waters ultraefektyviosios skysčių chromatografijos (UESC) (Waters, Milford, JAV) ir masių spektrometrijos Bruker maXis (MS/MS) sistemą (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Prieš atliekant chromatografinę analizę visi tyrimuose naudoti sausi ekstraktai buvo ištirpinti metanolyje ir filtruojami pro 0,22 µm nailoninius membraninius švirkštų filtrus Rotilabo (*Carl Roth GmbH & Co. KG*, Karlsruhe, Vokietija).

Junginiai identifikuoti palyginus molekulinę formulę ir MS/MS fragmentus su junginiais METLIN, LIPIDMAPS duomenų bazėse bei duomenimis, rastais literatūros šaltiniuose.

3.1.1. Junginių profiliai *D. caucasica* Lipsky lapų ir šakniastiebiuose ekstraktuose

D. caucasica lapų ir šakniastiebių ekstraktuose junginiai nustatyti ESI(–) UESC-QTOF-MS/MS metodu. Pagal skirtingų augalo dalių ištyrimą junginius ir jų turinčius ekstraktus galima trumpai suskirstyti į dvi grupes, tai: (1) lapų etanolinis ekstraktas, kurio sudėtyje yra keturios organinės rūgštys (1–4), aštuonios hidroksicinamono rūgštys (10–17), septyni flavonoidai (18–24), vienas angliavandenis (6), dvi riebalų rūgštys (26–28) bei keletas kitų klasių junginių (31–34); (2) šakniastiebių etanolinis ekstraktas, kurio sudėtyje yra keturios organinės rūgštys (1–2, 4–5), keturi angliavandeniai (6–9), penkios riebalų rūgštys (25, 27–30), šeši steroidinių glikozidų izomerai (35–40) ir keletas kitų klasių junginių (38–39). Žemiau (3.1 lent.) parodyti išsamesni šių junginių duomenys.

3.1 lentelė. *D. caucasica* Lipsky, lapų ir šakniastiebių ekstraktuose UESC/Q-TOF-MS/MS metodu nustatyti junginiai

ID Nr.	<i>t_R</i> min.	m/z [M – H] ⁻			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	⁴ FDC	⁵ RDC	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(-ai)					
Organinės rūgštys									
1.	0,4	191,0561	191,0556	191[C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0,5	(-)-chino rūgštis	+		
	0,7 ²	191,0562			-0,6			+	MS
2.	0,5	133,0142	133,0137	133[C ₄ H ₅ O ₅] ⁻	-0,5	<i>D/L</i> -obuolių rūgštis/	+		[154]
	0,8 ²	133,0142			-0,5	hidroksigintaro rūgštis (obuolių rūgštis)		+	[155]
3.	0,5	173,0454	173,0450	173[C ₇ H ₉ O ₅] ⁻	-0,4	3,4,5-trihidroksi-1-cikloheksen-1-karboksirūgštis (šikimo rūgštis)	+		[156] [154]
4.	0,8	191,0196	191,0191	191[C ₆ H ₇ O ₇] ⁻	-0,4	2-hidroksi-1,2,3-propantrikarboksirūgštis	+		MS
	1,2 ²	191,0200			-0,8	(citrinų rūgštis / izocitrinų rūgštis)		+	MS
5.	1,8	255,0512	255,0505	255[C ₁₁ H ₁₁ O ₇] ⁻	-0,7	2,3-dihidroksi-2-[(4-hidroksifenil)metil]butandirūgštis (piscido rūgštis)		+	[157]
Angliavandeniai									
6.	0,6	179,0561	179,0555	179[C ₆ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0,6	Heksozė	+	+	
7.		341,1089	341,1083	341[C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁] ⁻	-0,6	Sacharozė		+	[158]
8.		683,2252	683,2246	683[C ₂₄ H ₄₃ O ₂₂] ⁻ [2M – H] ⁻	-0,6	Neatskirti cukrūs		+	[159]
9.	0,7	1025,3414	1025,3408	1025[C ₃₆ H ₆₃ O ₃₃] ⁻ [3M – H] ⁻	-0,6	Neatskirti cukrūs		+	[159]

3.1 lentelės tęsinys

ID Nr.	<i>t_R</i> min	m/z [M – H] ⁻			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	⁴ FDC	⁵ RDC	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(-ai)					
Hidroksicinamono rūgštys									
10.		707,1822	707,1823	707[C ₃₂ H ₃₅ O ₁₈] ⁻ [2M – H] ⁻	-0,1				
	1,5	353,0875	353,0872	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	-0,3	3- <i>O</i> -kafeoilchino rūgštis ¹			
		707,1822	707,1823	707[C ₃₂ H ₃₅ O ₁₈] ⁻ [2M – H] ⁻	-0,1			+	
11.		355,0664	355,0665	355[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀] ⁻	-0,1	Kavos rūgštis 3- <i>O</i> -gliukuronidas			[160]
12.	1,6	297,0612	297,0610	297[C ₁₃ H ₁₃ O ₈] ⁻	-0,2	Kafeoiltreoninė rūgštis		+	
		707,1827	707,1823	707[C ₃₂ H ₃₅ O ₁₈] ⁻ [2M – H] ⁻	-0,4			+	
13.		353,0876	353,0872	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	-0,4	5- <i>O</i> -kafeoilchino rūgštis ¹			
	1,7	191,0559	191,0556	191[C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0,5				
14.		337,0930	337,0923	337[C ₁₆ H ₁₇ O ₈] ⁻	-0,4	Kumaroilchino rūgštis		+	[156]
15.		353,0877	353,0872	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	-0,5	4- <i>O</i> -kafeoilchino rūgštis		+	[160, 161]
	1,9	191,0564		191[C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0,7			+	
16.	2,0	335,0771	335,0766	335[C ₁₆ H ₁₅ O ₈] ⁻	-0,5	Kafeoilšikimo rūgštis		+	[156]
17.	2,1	367,1031	367,1029	367[C ₁₇ H ₁₉ O ₉] ⁻	-0,2	Feruloilchino rūgštis		+	[156, 160]

3.1 lentelės tęsinys

ID Nr.	<i>t_R</i> min.	m/z [M – H] ⁻			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	⁴ FDC	⁵ RDC	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(-ai)					
Flavonoidai									
18.	2,3	609,1463	609,1455	609[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆] ⁻	-0,8	Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozidas (rutinas) ¹	+		
19.	2,4	463,0879	463,0876	463[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂] ⁻	-0,3	Kvercetin-3- <i>O</i> -gliukozidas (izokvercitrinas) ¹	+		
20.		505,0995	505,0982	505[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃] ⁻	-1,3	Kvercetin- <i>O</i> -acetilheksozidas	+		
21.	2,5	549,0883	549,0880	549[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅] ⁻	-0,3	Kvercetin-3- <i>O</i> -malonil (heksozidas)	+		[162]
22.	2,6	447,0930	447,0927	447[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁] ⁻	-0,3	Kvercetin-3- <i>O</i> -ramnozidas (kvercitrinas)	+		[163]
23.	2,7	533,0934	533,0931	533[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄] ⁻	-0,27	Kvercetin-3- <i>O</i> -malonil(ramnozidas)	+		MS
24.		489,1036	489,1033	489[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂] ⁻	-0,3	Kvercetin-3- <i>O</i> -acetil(ramnozidas)	+		
Riebalų rūgštys									
25.	4,6	329,2335	329,2328	329[C ₁₈ H ₃₃ O ₅] ⁻	-0,7	Trihidroksioktadeceno rūgštis	+		[164]
26.	5,8	293,2120	293,2117	293[C ₁₈ H ₂₉ O ₃] ⁻	-0,3	Hidroksioktadekatrieno rūgštis	+		[164]
27.	6,8	358,2600	358,2593	358[C ₁₉ H ₃₆ NO ₅] ⁻	-0,7	3-hidroksidodekanoilkarnitinas		+	LMFA07070032 ³
28.	6,9	295,2280	295,2273	295[C ₁₈ H ₃₁ O ₃] ⁻	-0,7	Hidroksioktadekadieno rūgštis	+		
	8,0	295,2281			-0,8			+	[164]
29.	8,4	271,2279	271,2273	271[C ₁₆ H ₃₁ O ₃] ⁻	-0,6	Hidroksiheksadekano rūgštis		+	[164]
30.	8,8	279,2330	279,2324	279[C ₁₈ H ₃₁ O ₂] ⁻	-0,6	9,12-oktadekadieno rūgštis (linolo rūgštis)		+	[164]

3.1 lentelės tęsinys

ID Nr.	t_R min.	m/z [M – H] ⁻			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	⁴ FDC	⁵ RDC	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(-ai)					
Kiti junginiai									
31.	0,3	225,0617	225,0610	225[C ₇ H ₁₃ O ₈] ⁻	-0,7	Gliukoheptono rūgštis	+		[165]
32.	0,9	290,0881	290,0875	290[C ₁₁ H ₁₆ NO ₈] ⁻	-0,6	<i>N</i> -acetil-2,3-dehidroksi-2-deoksineuramino rūgštis	+		
33.		128,0352	128,0347	128[C ₅ H ₆ NO ₃] ⁻	-0,5	(2 <i>S</i>)-5-oksopirolidin-2-karboksirūgštis (piroglutamo rūgštis)	+		[166]
34.	1,4	345,1188	345,1186	345[C ₁₅ H ₂₁ O ₉] ⁻	-0,2	[1 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>]-5-hidroksi-7-(hidroksimetil)-1,4 <i>a</i> ,5,7 <i>a</i> -tetrahidrociklopenta[<i>c</i>]piran-1-il-β- <i>D</i> -gliukopiranozidas (aukubinas)	+		MS
Steroidiniai saponinai / glikozidai									
35.	3,3	1109,5383	1109,5379	1109[C ₅₂ H ₈₅ O ₂₅] ⁻	-0,4	Steroidinis glikozidas	+		[167]
36.	3,7	1093,5431	1093,5431	1093[C ₅₂ H ₈₅ O ₂₄] ⁻	-0,0	Steroidinis glikozidas	+		[167]
37.	4,3	1075,5327	1075,5325	1075[C ₅₂ H ₈₃ O ₂₃] ⁻ [M – H-146] ⁻	-0,2	Steroidinis glikozidas (opfiopogonino darinys)	+		[167, 168]
38.	6,5	929,4754	929,4746	929[C ₄₆ H ₇₃ O ₁₉] ⁻	-0,1	Steroidinis glikozidas	+		MS
39.	6,6	913,4798	913,4797	913[C ₄₆ H ₇₃ O ₁₈] ⁻	-0,1	Steroidinis glikozidas	+		MS
40.	6,8	767,4228	767,4217	767[C ₄₀ H ₆₃ O ₁₄] ⁻	-1,1	Steroidinis saponinas (pentandrozidas B)	+		[167, 169]

3.1 lentelės tęsinys

ID Nr.	t_R min.	m/z [M – H] ⁻			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	⁴ FDC	⁵ RDC	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(-ai)					
Nežinomi junginiai									
41.	6,1	559,3117	559,3118	559[C ₂₈ H ₄₇ O ₁₁] ⁻	-0,1	Nežinomas junginys	+		MS
42.	6,6	483,2727	483,2719	483[C ₂₅ H ₃₅ N ₆ O ₄] ⁻	-0,8	Nežinomas peptidas	+		MS
43.	5,6	721,3652	721,3646	721[C ₃₄ H ₅₇ O ₁₆] ⁻	-0,6	Nežinomas junginys galaktolipidas	+		MS
44.	6,8	723,3809	723,3803	723[C ₃₄ H ₅₉ O ₁₆] ⁻	-0,6	Nežinomas junginys galaktolipidas		+	MS

¹junginiai, identifikuoti naudojant standartą; ²analizuojant šakniastiebių ekstraktuose esančius junginius, jų sulaikymo laikas (t_R) buvo šiek tiek pasislinkęs; ³LMFA, junginio numeris LIPIDMAPS duomenų bazėje; ⁴FDC, *folium Dioscoreae caucasicae*; ⁵RDC, *rhizoma Dioscoreae caucasicae*. Masės paklaida yra < 5 milijoninės dalys (ppm) tikslumu.

Kaukaziųjų dioskorėjų lapų ir šakniastiebių ekstraktuose nustatytos organinės rūgštys (–)chino (**1**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 191,0556), *D/L*-obuolių (**2**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 133,0137), citrinų / izocitrinų (**4**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 191,0191) skirtingais sulaikymo laikais (t_R) 0,4 ir 1,2 min. Pastarieji junginiai atitiko molekulinės formules (**3.1 lent.**). Šikimo rūgštis (**3**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 173,0450) sulaikymo laiku (t_R) 0,5 min. ir gliukoheptono rūgštis (**31**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 225,0610) sulaikymo laiku (t_R) 0,3 min. aptikta kaukaziųjų dioskorėjų lapų ekstraktuose, o piscido rūgštis (**5**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 255,0505) sulaikymo laiku (t_R) 1,8 min. aptikta šakniastiebių ekstraktuose. Ankstesniuose tyrimuose piscido rūgštis buvo nustatyta niponinių dioskorėjų šakniastiebiuose [157], o šikimo, obuolių ir treoninė rūgštys nustatytos *Dioscorea elephantipes*, *Dioscorea sylvatica* ir kitose rūšyse [154]. Gliukoheptono rūgštis kaukaziinės dioskorėjos lapuose aptikta pirmą kartą.

Kitas junginys (**30**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 290,0875) sulaikymo laiku (t_R) 0,9 min. atitiko sialo rūgšties (*N*-acetil-neuraminino rūgštis) darinio fragmento modelį, kuris buvo preliminariai identifikuotas kaip *N*-acetil-2,3-dehidroksi-2-deoksineuramino rūgštis. Ankstesniuose tyrimuose *Dioscorea* spp. nepavyko rasti nustatytos pastarosios rūgšties. Tuo pačiu sulaikymo laiku, kaip (**30**) junginio, aptiktas aminorūgšties fragmento modelis (**33**), kuris buvo identifikuotas kaip piroglutamato rūgštis (**33**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 128,0347) [166]. Šie junginiai buvo rasti tik dioskorėjos lapų ekstraktoje. Kitas deprotonuotas jonas (**34**) $[M - H]^-$ esant m/z 345,1186 (t_R 1,4 min.) sutapo su duomenų bazėje Metlin ir kitų autorių pateiktais spektrais ir atitiko iridoidinio glikozido aukubino charakteristiką [170]. Pastarasis glikozidas dažniausiai aptinkamas *Plantago* genties augalų rūšyse.

Yra žinoma, kad kafeoilchino rūgšties izomeras turi cheminę formulę $C_{16}H_{18}O_9$ ir monoizotopinę jono masę m/z 354,0950. Panašūs $[M - H]^-$ pirmtakų jonai, kurių m/z 353,0872 vertė, buvo būdingi (**10**), (**13**) ir (**15**) junginiams sulaikymo laikais atitinkamai (t_R) 1,5, 1,7 ir 1,9 min. Šis masių spektrų išsidėstymo kelias rodė, kad yra keli kafeoilchino rūgšties izomerai. Pirmasis junginys (**10**) buvo identifikuotas kaip 3-*O*-kafeoilchino rūgštis [160]. Antrasis junginys (**13**) buvo priskirtas 5-*O*-kafeoilchino rūgščiai. Pagal molekulinį joną, atitinkantį molekulinę formulę, ir pagal jos dimerą m/z 707,1823 $[2M - H]^-$ (t_R 1,7 min.) nesunku buvo išžvelgti charakteringus fragmentus m/z 191,0556 $[M - H]^-$ (t_R 1,7 min.), būdingus 5-*O*-kafeoilchino rūgščiai m/z 353,0872 $[M - H]^-$. Gauti molekuliniai spektrai sutapo su ankstesniais tyrimais [160], o 5-*O*-kafeoilchino rūgšties identiškumas patvirtintas etaloniniu standartu. Remiantis pirmtako jonu, m/z 297,0612 $[M - H]^-$ junginys (**12**) sulaikymo laiku (t_R) 1,6 min. preliminariai buvo identifikuotas kaip kafeoiltreono rūgštis. Kiti junginiai (**14**) ir (**15**), turintys $[M - H]^-$ m/z 337,0923 ir m/z 353,0872 molekulinis jonus ir fragmentus m/z 191,0556 $[M - H - 146]^-$ ir m/z 191,0556 $[M - H - 162]^-$, atitinkamai buvo priskirti hidroksicinamono grupės rūgštims: kumaroilchino ir 4-*O*-kafeoilchino rūgštims. Junginys (**16**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 335,0766) sulaikymo laiku $t_R = 2,0$ min. buvo identifikuotas kaip kafeoilšikimo rūgštis. Ankstesniuose tyrimuose ji buvo nustatyta sparnuotosios dioskorėjos (*D.alata*) lapuose [156], o junginys (**17**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 367,1029) pagal gautą sulaikymo laiką (t_R) 2 min. buvo priskirtas feruloilchino rūgščiai.

Junginiai **18-24** identifikuoti kaip flavonoidai, priklausantys kvercetino dariniams. Kvercetas (3,3',4',5,7-pentahidroksil-flavonas), atitinkantis molekulinę formulę $C_{15}H_{10}O_7$ (monoizotopinė masė m/z 302,04265) ir turintis charakteringą fragmento joną m/z 301 $[M - H]^-$, neabejotinai siejosi su aptiktais kvercetino dariniais, analizuojamais kaukazinės dioskorėjos lapų ekstraktuose. Tuo paaiškinama, kad aptiktų flavonoidų molekuliniais spektrams būdingi $[M - H (3-O\text{-glikozidas})]^-$ junginiai. Junginiai (**18**) ir (**19**), turintys m/z 609,1455 ($t_R = 2,3$ min.) ir m/z 463,0876 (t_R , 2,4 min.) molekulinis jonus, atitiko atitinkamai kvercetino 3-*O*-rutinozidą (rutiną) ir kvercetino 3-*O*-gliukozidą. Pastarųjų junginių identiškumas patvirtintas etaloniniais standartais. Junginys (**22**) ($[M - H]^-$, jonas m/z 447,0927) (t_R , 2,6 min.), sutapo su kitų autorių darbuose pateiktais kvercitrino spektrais [163] ir buvo identifikotas kaip kvercetin 3-*O*-ramnozidas (kvercitrinas). Aptikti junginiai: t_R 2,5 min: (**21**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 549,0880), (**20**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 505,982); t_R 2,7 min: (**23**), $[M - H]^-$ jonas m/z 533,0931), (**24**) $[M - H]^-$ jonas m/z 489,1033), siejasi su kvercetino dariniais, galinčiais priklausyti acetilintiems (malonilo) flavonoidams. Tai paaiškinama tuo, kad malonilgrupės junginių acetilo likučio (C_2H_2O) nuostolių atsiranda dėl CO_2 praradimo. Tai būdinga tiek (**20**) junginiui, turinčiam m/z 505,0982 $[M - H - 44]^-$, tiek (**24**) junginiui, turinčiam m/z 489,1036 $[M - H - 44]^-$. Junginių (**20**) ir (**21**) buvimą patvirtinto literatūroje pateiktas masių spektrų išsidėstymo kelias tiriant fenolinių junginių profilius skiautėlapio fikuso (*Ficus carica* L.) vaisiuose ir lapuose taikant QTOF-MS analizę [162]. Atsižvelgiant į tai, acetilinti (malonilo) flavonoidai identifikuoti kaip: (**20**) kvercetin-*O*-acetilheksozidas, (**21**) kvercetin 3-*O*-(6"-malonil)-gliukozidas (**23**) kvercetin-3-*O*-malonil(ramnozidas) (**24**) kvercetin-3-*O*-acetil(ramnozidas).

Angliavandenių buvo aptikta tik *D. caucasica* šakniastiebių ekstraktų mėginiuose, išskyrus neaiškios struktūros heksozę (**6**). Aptikta sacharozė (**7**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 341,1083) (t_R) 0,7 min. [158, 159] ir tuo pačiu sulaikymo laiku kiti du junginiai: (**8**) ($[2M - H]^-$ jonas, m/z 683,2246) ir (**9**) ($[3M - H]^-$ jonas, m/z 1025,3408), kurie atitiko deprotonuotų dimerų ir trimerų oligosacharidų jonų spektrines charakteristikas [159]. **3.1 lentelėje** jie apibūdinti kaip neatskirti cukrūs.

Gautuose masių spektruose aptikti m/z fragmentų (profilio) modeliai siejami su riebalų rūgštimis. Junginys (**30**) $[M - H]^-$ jonas m/z 279,2324 esant (t_R , 8,8 min.) atitiko linolo rūgštį (C18:2), kitas junginys (**28**) $[M - H]^-$ jonas m/z 295,2273 (t_R , 6,9 ir 8,0 min.) atitiko hidroksioktadekadieno rūgštį. Dar kiti junginiai rodė hidroksilintų riebalų rūgščių molekulių jonus: (**29**) ($[M - H]^-$ jonų m/z 271,2273) esant (t_R) 8,4 min. ir (**25**) ($[M - H]^-$ m/z 329,2328) esant (t_R) 4,6 min. atitiko atitinkamai hidroksiheksadekano rūgštį (**29**) ir trihidroksioktadeceno rūgštį (**25**). Hidroksioktadekatrieno rūgštis (**26**) $[M - H]^-$ jonas m/z 293,2117 buvo aptiktas tik lapų ekstrakte sulaikymo laiku (t_R) 5,8 min. Be to, junginio (**27**) $[M - H]^-$ jonas m/z 358,2593 esant (t_R) 6,8 min. rodė $C_{19}H_{36}NO_5$ molekulinę formulę, kuri atitinka riebalų rūgščių esterį. Toks riebalų rūgščių esteris būdingas karnitino dariniams. Remiantis literatūros duomenimis bei LIPID MAPS duomenų baze, šis junginys identifikotas kaip hidroksi-dodekanoilkarnitinas.

Gautuose masių spektruose nepavyko nustatyti tikslios hidroksilinimo vietos, tačiau pagal molekulinį joną, atitinkantį molekulinę formulę, nesunku išvelgti charakteringus fragmentus, būdingus riebalų rūgštims, o stebėtų riebalų rūgščių sulaikymo laikas (**3.1 lent.**) koreliuoja su literatūros duomenimis. Pažymėtina, kad riebalų rūgščių konjugatai su aminorūgštimis plačiai randami gyvūninės kilmės produktuose, tačiau augaluose jų yra ribotai.

Aptiktų junginių (**35**), (**36**), (**37**), (**38**) ir (**39**) tikslų struktūrų nepavyko išsiaiškinti, tačiau remiantis jų molekuliniais jonais $[M - H]^-$ m/z 1109,5379 (t_R , 3,3 min.), 1093,5431 (t_R , 3,7 min.), 1075,5325 (t_R , 4,3 min.), 929,4746 (t_R , 6,5 min.), 913,4797 (t_R , 6,6 min.), kurie atitinka $C_{52}H_{85}O_{25}$, $C_{52}H_{85}O_{24}$, $C_{52}H_{83}O_{23}$, $C_{46}H_{73}O_{19}$ ir $C_{46}H_{73}O_{18}$ molekulinės formules, neabejotinai priklauso steroidiniams glikozidams, kurių gausu įvairiose dioskorėjos rūšyse. Junginio (**40**) $[M - H]^-$ jono m/z spektriniai duomenys 767,4217 (t_R , 6,8 min.) taip pat rodo steroidinį saponino pentandrozidą B [167]. Be to, junginys (**44**) $[M - H]^-$ jonas m/z 723,3803, atitinkantis $C_{34}H_{59}O_{16}$ molekulinę formulę, aptiktas šakniastiebiuose sulaikymo laiku (t_R) 6,8 min., o junginys (**43**) $[M - H]^-$ jonas m/z 721,3646, atitinkantis $C_{34}H_{59}O_{16}$ molekulinę formulę, aptiktas lapuose sulaikymo laiku 5,6 min. Pastarieji junginiai greičiausiai priklauso galaktolipidams.

3.1.2. Junginių profiliai *D. nipponica* Makino lapų ir šakniastiebių ekstraktuose

D. nipponica lapų ir šakniastiebių ekstraktuose junginiai nustatyti ESI(-) UESC-QTOF-MS/MS metodu. Pagal skirtingų augalų dalių ištyrimą junginius ir jų turinčius ekstraktus galima trumpai suskirstyti į dvi grupes, tai: (1) lapų etanolinis ekstraktas, kurio sudėtyje yra šešios organinės rūgštys (**1–5**, **7**), aštuonios hidroksicinamono rūgštys (**14–21**), dešimt flavonoidų (**22–31**), trys angliavandeniai (**8–9,11**), vienas klasterio jonas (**13**), trys steroidinių glikozidų izomerai (**41,44, 48**) ir keletas kitų klasių junginių (**37–40**); (2) šakniastiebių etanolinis ekstraktas, kurio sudėtyje yra penkios organinės rūgštys (**1–2**, **4–6**), keturi angliavandeniai (**8**, **10–12**), vienas klasterio jonas, atitinkantis chino rūgšties heksozės dimerą (**13**), keturios riebalų rūgštys (**32–33**, **35–36**), aštuoni steroidinių glikozidų izomerai (**42–49**) ir keletas kitų klasių junginių (**38–39**). Žemiau (**3.2 lent.**) parodyti išsamesni šių junginių duomenys.

3.2 lentelė. *D.nipponica* Makino, lapų ir šakniastiebių ekstraktuose nustatyti junginiai UESC/Q-TOF-MS/MS metodu

ID Nr.	t_R min.	m/z [M – H] ⁻			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	⁵ FDN	⁶ RDN	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(-ai)					
Organinės rūgštys									
1.	0,4 0,7 ²	191,0563 191,0561	191,0556	191[C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0,7 -0,5	(–)-chino rūgštis	+		
2.	0,5 0,7 ²	133,0142 133,0142	133,0137	133[C ₄ H ₅ O ₅] ⁻	-0,7 -0,6	<i>D/L</i> -obuolių rūgštis / hidroksigintaro rūgštis (obuolių rūgštis)	+	+	[154]
3.	0,5	173,0454	173,0450	173[C ₇ H ₉ O ₅] ⁻	-0,7	3,4,5-trihidroksi-1-cikloheksen-1-karboksirūgštis (šikimo rūgštis)	+		[154]
4.	0,7 1,2 ²	191,0198 191,0198	191,0191	191[C ₆ H ₇ O ₇] ⁻	-0,7 -0,7	2-hidroksi-1,2,3-propantrikarboksirūgštis (Citrinų rūgštis / izocitrinų rūgštis)	+	+	MS MS
5.	1,0 1,4 ²	147,0299 147,0300	147,0294	147[C ₅ H ₇ O ₅] ⁻	-0,5 -0,6	Citramalinė rūgštis	+	+	
6.	1,8	255,0514	255,0505	255[C ₁₁ H ₁₁ O ₇] ⁻	-0,9	2,3-dihidroksi-2-[(4-hidroksifenil)metil]butandirūgštis (piscido rūgštis)		+	[157]
7.	2,8	187,0976	187,0970	187[C ₉ H ₁₅ O ₄] ⁻	-0,6	Nonano dirūgštis (azelaino rūgštis)	+		[171]
Angliavandeniai									
8.	0,3 0,6 ²	179,0561 179,0563	179,0556 179,0556	179[C ₆ H ₁₁ O ₆] ⁻ 179[C ₆ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0,5 -0,7	Heksozė	+	+	MS MS
9.	0,4	149,0456	149,0450	147[C ₅ H ₉ O ₅] ⁻	-0,6	Pentozė	+		MS

3.2 lentelės tęsinys

ID Nr.	t_R min.	m/z [M – H] ⁻			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	⁵ FDN	⁶ RDN	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(-ai)					
10.	0,4	387,1146	387,1139	387[C ₁₃ H ₂₃ O ₁₃] ⁻	-0,7	Nežinomas disacharidas (DJE= 2) ³	+		MS
	0,7 ²	387,1146			-0,8				
11.	0,7	341,1089	341,1083	341[C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁] ⁻	-0,6	Sacharozė	+		[158]
12.	0,7	683,2256	683,2246	683[C ₂₄ H ₄₃ O ₂₂] ⁻ [2M – H] ⁻	-0,1	Neatskirti cukrūs	+		[159]
Klasterio jonai									
13.	0,4	533,1722	533,1717	533[C ₁₉ H ₃₃ O ₁₇] ⁻	-0,5	Chino rūgštis + diheksozė (Hex ₂)	+		MS
	0,7 ²	533,1723			-0,6				
Hidroksicinamono rūgštys									
14.		707,1829	707,1823	707[C ₃₂ H ₃₅ O ₁₈] ⁻ [2M – H] ⁻	-0,6	3- <i>O</i> -kafeoilchino rūgštis ¹	+		[160]
	1,5	353,0879	353,0873	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	-0,6				
15.	1,6	355,0672	355,0665	355[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀] ⁻	-0,7	Kofeino rūgštis <i>O</i> -gliukuronidas	+		[160]
16.	1,6	297,0621	297,0610	297[C ₁₃ H ₁₃ O ₈] ⁻	-1,1	Kafeoiltreoninė rūgštis	+		[160]
		707,1828	707,1823	707[C ₃₂ H ₃₅ O ₁₈] ⁻ [2M – H] ⁻	-0,5				
17.	1,7	353,0880	353,0873	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	-0,7	5- <i>O</i> -kafeoilchino rūgštis ¹	+		MS
		191,0562	191,0556	191[C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0,6				

3.2 lentelės tęsinys

ID Nr.	t_R min.	m/z [M – H] ⁻			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	⁵ FDN	⁶ RDN	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(-ai)					
18.	337,0929	337,0923	337[C ₁₆ H ₁₇ O ₈] ⁻ [M – H – 146] ⁻	-0,6	Kumaroilchino rūgštis	+		MS	
19.	353,0877	353,0873	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	-0,4	4- <i>O</i> -kafeoilchino rūgštis	+			
	1,9	191,0564	191[C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0,8		+			
20.	2,0	335,0771	335[C ₁₆ H ₁₅ O ₈] ⁻	-0,5	Kafeoilšikimo rūgštis	+		[156]	
21.	2,1	367,1031	367[C ₁₇ H ₁₉ O ₉] ⁻	-0,2	Feruloilchino rūgštis	+		[160,156]	
Flavonoidai									
22.	1,8	577,1354	577[C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂] ⁻	-0,8	Proantocianidino dimeras (B-tipo)	+		[127, 172]	
23.	1,9	289,0719	289[C ₁₅ H ₁₃ O ₆] ⁻	-0,7		+			
	2,1	289,0723	289[C ₁₅ H ₁₃ O ₆] ⁻	-1,09	Katechinas		+	[158]	
24.	2,3	609,1461	609[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆] ⁻	-0,5	Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozidas (rutinas) ¹	+		MS	
25.	2,4	477,0676	477[C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃] ⁻	-0,7	Kvercetin-3- <i>O</i> -gliukuronidas	+		[173]	
26.	2,4	463,0891	463[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂] ⁻	-1,5	Kvercetin-3- <i>O</i> -gliukozidas (izokvercitrinas) ¹	+		MS	
27.	505,0995	505,0982	505[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃] ⁻	-1,3	Kvercetin-3- <i>O</i> -acetilheksozidas	+			
28.	2,6	549,0883	549[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅] ⁻	-0,3	Kvercetin-3- <i>O</i> -malonil (heksozidas)	+		[162]	
29.	2,7	447,0941	447[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁] ⁻	-0,3	Kvercetin-3- <i>O</i> -ramnozidas (kvercitrinas)	+		[163]	
30.	533,0934	533,0931	533[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄] ⁻	-0,3	Kvercetin-3- <i>O</i> -malonil(ramnozidas)	+		MS	
31.	2,8	489,1036	489[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂] ⁻	-0,3	Kvercetin-3- <i>O</i> -acetil(ramnozidas)	+			

3.2 lentelės tęsinys

ID Nr.	t_R min.	m/z [M – H] ⁻			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	⁵ FDN	⁶ RDN	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(-ai)					
Riebalų rūgštys									
32.	3,8 4,3	327,2181 327,2180	327,2172	327[C ₁₈ H ₃₁ O ₅] ⁻	-0,9 -0,8	Hidroperoksi-epoksi-oktadeceno rūgštis	+		[164]
33.		329,2337 329,2332	329,2328	329[C ₁₈ H ₃₃ O ₅] ⁻	-0,9 -0,4	Trihidroksioktadeceno rūgštis		+	[164]
34.	5,8	293,2122	293,2117	293[C ₁₈ H ₂₉ O ₃] ⁻	-0,5	Hidroksioktadekatrieno rūgštis		+	[164]
35.	6,3 7,0	295,2280 295,2281	295,2273	295[C ₁₈ H ₃₁ O ₃] ⁻	-0,7 -0,8	Hidroksioktadekadieno rūgštis		+	[164]
36.	6,8	358,2601	358,2593	358[C ₁₉ H ₃₆ NO ₅] ⁻	-0,8	3-hidroksidodekanoilkarnitinas		+	LMFA07070032 ⁴
Kiti junginiai									
37.	0,3	225,0617	225,0610	225[C ₇ H ₁₃ O ₈] ⁻	-0,7	Gliukoheptono rūgštis		+	[165]
38.	0,9 1,3	290,0881 290,0882	290,0875 290,0875	290[C ₁₁ H ₁₆ NO ₈] ⁻ 290[C ₁₁ H ₁₆ NO ₈] ⁻	-0,6 -0,7	<i>N</i> -acetil-2,3-dehidroksi-2-deoksineuramino rūgštis		+	MS
39.	0,9 1,3	128,0354 128,0354	128,0347 128,0347	128[C ₅ H ₆ NO ₃] ⁻ 128[C ₅ H ₆ NO ₃] ⁻	-0,7 -0,7	(2 <i>S</i>)-5-oksopirolidin-2-karboksirūgštis (piroglutamato rūgštis)		+	
40.	1,4	345,1188	345,1186	345[C ₁₅ H ₂₁ O ₉] ⁻	-0,2	[1 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>]-5-hidroksi-7-(hidroksimetil)-1,4 <i>a</i> ,5,7 <i>a</i> -tetrahidrociklopenta[<i>c</i>]piran-1- <i>il</i> -β- <i>D</i> -gliukopiranozidas (aukubinas)		+	

3.2 lentelės tęsinys

ID Nr.	t_R min.	m/z [M – H] ⁻			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	⁵ FDN	⁶ RDN	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(-ai)					
Saponinų izomerai									
41.	3,2	947,4856	947,4852	947[C ₄₆ H ₇₅ O ₂₀] ⁻	-0,4	Steroidinis glikozidas	+		MS
42.	3,3	1125,5336	1125,5329	1125[C ₅₂ H ₈₅ O ₂₆] ⁻	-0,7	Steroidinis glikozidas		+	[168]
43.		1109,5390	1109,5379	1109[C ₅₂ H ₈₅ O ₂₅] ⁻ [M – H – 162] ⁻	-1,1	Steroidinis glikozidas (Opfiopogonino dariniai)		+	
44.	3,4	945,4693	945,4695	945[C ₄₆ H ₇₃ O ₂₀] ⁻	-0,2	Steroidinis glikozidas	+		[167]
	5,6	945,4701	945,4695	945[C ₄₆ H ₇₃ O ₂₀] ⁻	-0,6			+	
45.	6,2	1091,5283	1091,5274	1091[C ₅₂ H ₈₃ O ₂₄] ⁻	-0,9	Steroidinis glikozidas (Opfiopogonino dariniai)		+	[167,168]
46.	6,5	929,4751	929,4746	929[C ₄₆ H ₇₃ O ₁₉] ⁻	-0,5	Steroidinis glikozidas		+	[167]
47.	6,8	899,4644	899,4640	899[C ₄₅ H ₇₁ O ₁₈] ⁻	-0,4	Steroidinis glikozidas		+	[174]
48.	5,9	767,4216	767,4218	767[C ₄₀ H ₆₃ O ₁₄] ⁻	-0,2	Steroidinis glikozidas (pentandrozidas B)	+		[167]
	6,9	767,4227		767[C ₄₀ H ₆₃ O ₁₄] ⁻	-0,9			+	[169]
Peptidai									
49.	3,3	585,2678	585,2673	585[C ₂₈ H ₃₇ N ₆ O ₈] ⁻	-0,5	Tetrapeptidas		+	
50.	4,1	570,2792	570,2788	570[C ₂₆ H ₃₆ N ₉ O ₆] ⁻	-0,4	Tetrapeptidas		+	MS
51.	3,5	658,2956	658,2949	658[C ₂₉ H ₄₀ N ₉ O ₉] ⁻	-0,7	Pentapeptidas		+	
Nežinomi junginiai									
52.	2,8	429,1764	429,1760	429[C ₂₀ H ₂₉ O ₁₀] ⁻	-0,4	Nežinomas junginys (<i>O</i> -glikozil junginys)	+		MS

3.2 lentelės tęsinys

ID Nr.	t_R min.	m/z [M – H] ⁻			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	⁵ FDN	⁶ RDN	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(-ai)					
53.	3,1	635,2926	635,2915	658[C ₂₉ H ₄₇ O ₁₅] ⁻	-1,1	Nežinomas junginys (acilsacharozė)	+		MS
	3,5	635,2927		658[C ₂₉ H ₄₇ O ₁₅] ⁻	-1,2				
54.	3,4	495,2341	495,2324	495[C ₃₆ H ₃₁ O ₂] ⁻	-1,7	Nežinomas junginys	+		MS
55.	4,3	449,2753	449,2751	449[C ₂₂ H ₄₁ O ₉] ⁻	-0,2	Nežinomas junginys		+	MS
56.	5,5	721,3650	721,3646	721[C ₃₄ H ₅₇ O ₁₆] ⁻	-0,4	Nežinomas galaktolipidas	+		MS

¹junginiai, identifikuoti naudojant standartą; ²analizuojant šakniastiebių ekstraktuose esančius junginius jų sulaikymo laikas (t_R) buvo šiek tiek pasislinkęs; ³DJE, dvigubos jungties ekvivalentas (angl. *double bond equivalent*, DBE); ⁴LMFA, junginio numeris LIPIDMAPS duomenų bazėje; ⁵FDN, *folium Dioscoreae nipponicae*; ⁶RDN, *rhizoma Dioscoreae nipponicae*. Didžiausia leistina masės paklaida yra < 5 milijoninės dalys (ppm) tikslumu.

Niponinės dioskorėjos lapų ir šakniastiebių ekstraktuose nustatytos organinės rūgštys: (-)-chino (**1**) ($[M - H]^-$, m/z 191,0556), *D/L*-obuolių (**2**) ($[M - H]^-$, m/z 133,0137), citrinų / izocitrinų (**4**) ($[M - H]^-$, m/z 191,0191) citramalinė (**5**) ($[M - H]^-$, m/z 147,0294) skirtingais sulaikymo laikais (t_R) 0,4 ir 1,2 min. Piscido rūgštis (**6**) ($[M - H]^-$, m/z 255,0505) sulaikymo laiku (t_R) 1,8 min. nustatyta tik šakniastiebių ekstraktuose, o šikimo (**3**) ($[M - H]^-$, m/z 173,0450) ir azelaino (**7**) ($[M - H]^-$, m/z 187,0970) rūgštys sulaikymo laikais (t_R) 0,5 ir 2,8 min. nustatytos tik lapų ekstraktuose. Ankstesniuose tyrimuose šikimo ir obuolių rūgštys nustatytos *D. elephantipes*, *D. sylvatica*, *D. mexicana* [154] lapuose, azelaino rūgštis – *D. alata*, *D. bulbifera* [171] šakniastiebiuose, o piscido rūgštis *D. nipponica* šakniastiebiuose [157].

Angliavandeniams būdingi molekuliniai jonai aptikti tiek lapų, tiek šakniastiebių ekstraktuose. Sacharozei būdingas molekulinis jonas (**11**) ($[M - H]^-$, m/z 341,1089) [158, 159] sulaikymo laiku (t_R) 0,7 min. ir kitas junginio jonas (**12**) ($[2M - H]^-$, m/z 683,2252) tuo pačiu sulaikymo laiku gerai atitiko deprotonuoto dimero oligosacharido jono spektrines charakteristikas ir buvo priskirtas neatskirtiems cukrams. Panašus angliavandeniams būdingas junginys (**10**) ($[M - H]^-$, m/z 387,1139) pagal sulaikymo laiką (t_R) 0,4 min. aptiktas tiek lapų, tiek šakniastiebių ekstraktuose. Šis nežinomas (**10**) disacharidas galėjo susidaryti iš įvairių heksozių. Taip pat yra žinoma, kad klasterių jonų junginiai gamtoje egzistuoja kaip maišytų grupių (klasterių) su kitomis molekulėmis mišiniai. Būtent junginio jono (**13**) ($[M - H]^-$, m/z 533,1717) (t_R , 0,4 min. lapų; t_R , 0,7 min. šakniastiebių) masių spektras aiškiai rodė chino rūgšties esterio ir heksozės mišinį ($[chinos\ rūgštis + Hex_2-H]^-$). Taip pat MS spektras junginio (**37**) ($[M - H]^-$, m/z 225,0610) gerai atitiko gliukoheptono rūgšties formulę $C_7H_{13}O_8$ [165], o kitas MS spektras – (**39**), ($[M - H]^-$, m/z 128,0347) atitiko piroglutamato rūgšties formulę $C_5H_6NO_3$; pirmasis junginys buvo aptiktas tik lapų ekstrakte, o antrasis – abiejuose ekstraktuose (**3.2 lent.**).

Sialo rūgšties dariniams priklausanti *N*-acetil-2,3-dehidroksi-2-deoksineuramino rūgštis (**38**) ($[M - H]^-$, m/z 290,0875) (t_R , 0,9 min.; lapų; t_R , 1,3 min. šakniastiebių) sutapo su molekulinio masės spektru Metlin duomenų bazėje. Kito junginio molekulinis jonas (**40**) ($[M - H]^-$, m/z 345,1186) gerai atitiko iridoidinio glikozido masių spektrą ir buvo preliminariai identifikuotas kaip aukubinas. Šis iridoidiniam glikozidams priklausantis junginys dažniausiai aptinkamas *Plantago* genties augalų skirtingose augalų dalyse ir yra atsakingas už gynybines funkcijas [170].

Skirtingų kafeoilchino rūgšties izomerų cheminė formulė yra $C_{16}H_{18}O_9$, o monoizotopinė masė 354,0950. Tyrimo metu kafeoilchino rūgšties pirmtako molekulinis jonas $[M - H]^-$ m/z 353,0876 buvo būdingas junginių izomerams (**14**), (**17**) ir (**19**), atsiradusiems skirtingais sulaikymo laikais, atitinkamai 1,5, 1,7 ir 1,9 min. Pagal molekulinį joną (**14**) ($[M - H]^-$, m/z 353,0873), atitinkantį molekulinę formulę $C_{16}H_{17}O_9$, ir šalia esantį dimerą (m/z 707,1823) (t_R , 1,5 min.) nesunku buvo įžvelgti 3-*O*-kafeoilchino rūgšties buvimą. Panašus spektrų išsidėstymas būdingas 1,7 min. sulaikymo laiku. Taip chromatogramoje išsidėčiusios intensyviausios molekulinio jono m/z smailės: 707,1823, $[2M - H]^-$; 353,0873, $[M - H]^-$ ir 191,0556

[M – H]⁻ patvirtino (17) 5-*O*-kafeoilchino rūgšties buvimą. Šių rūgšių buvimas sutapo su kitų autorių darbuose pateiktais kafeoilchino rūgšties izomerų spektrais [160]. Taip pat identiškas patvirtintas autentišku standartu. Remiantis gerai tinkančiomis molekulinėmis formulėmis ir MS spektrais, junginio jonas (16) ([M – H]⁻, m/z 297,0610) sulaikymo laiku (*t_R*) 1,6 min. preliminariai buvo identifikuotas kaip kafeoiltreono rūgštis, o junginio jonas (15) ([M – H]⁻, m/z 355,0665) kaip kavos rūgšties *O*-gliukuronidas [160]. Kitas junginys (18), kurio sulaikymo laikas (*t_R*) 1,9 min. ir m/z 337,0923, nustatytas kaip kumaroilchino rūgštis atsižvelgiant į aiškiai matomą (146 Da) cukrinės dalies atskilimą. Junginių jonai (20) ([M – H]⁻, m/z 335,0766) ir (21) ([M – H]⁻, m/z 367,1029) rodė atitinkamai tipiškus kafeoilšikimo ir feruloilchino rūgščių masių spektrus [160, 156].

Įvairių kvercetino izomerų cheminė formulė yra C₁₅H₁₀O₇ (3,3',4',5,7-pentahidroksil-flavonas), o monoizotopinė masė yra 302,04265. Niponinės dioskorėjos lapų ekstraktuose dominavo [M – H (3-*O*-glikozidas)]⁻ flavonoidų izomerai, kaip parodyta 3.2 lentelėje.

Junginiai (24) ir (26) m/z 609,1456 ir 463,0876 buvo identifikuoti atitinkamai kaip kvercetin-3-*O*-rutinozidas (rutinas) ir kvercetin-3-*O*-gliukozidas (izokvercitrinas); jų identiškas patvirtintas etaloniniais standartais. Kitas kvercetino-glikozido darinys (29), kurio sulaikymo laikas (*t_R*) 1,9 min. ir m/z 447,0924, buvo identifikuotas kaip kvercetin-3-*O*-ramnozidas (kvercitrinas). Pastarojo identiškas sutapo su kitų mokslininkų pateiktais masių spektrų duomenimis [163]. Taip pat literatūroje [173] pateikti masių spektrai m/z (477,0669) sutampa su gautais junginio jono (25) ([M – H]⁻, m/z 447,0669) spektrais. Pastarasis junginys identifikuotas kaip kvercetin-3-*O*-gliukuronidas. Junginiai (27) ir (28) rodė prekursorių jonus [M – H]⁻ m/z 549,0880 ir 505,0982 atitinkamai. Pastarieji buvo identifikuoti atitinkamai kaip kvercetin-3-*O*-malonilgliukozidas ir kvercetin-3-*O*-acetilgliukozidas. Šių junginių buvimą patvirtina literatūroje pateikti masių spektriniai duomenys [162]. Panašus masių spektro kelias būdingas ir kitiems aptiktiems junginiams: molekuliniai jonai (30) ([M – H]⁻, m/z 533,0931) ir (31) [M – H]⁻, m/z 489,1033), atitinkantys molekulinės formules C₂₄H₂₁O₁₄ ir C₂₃H₂₁O₁₂, leido preliminariai identifikuoti atitinkamai kvercetin-3-*O*-malonilramnozidą ir kvercetin-3-*O*-acetilramnozidą. Junginio jonas (22) ([M – H]⁻, m/z 577,1346) buvo identifikuotas kaip procianido dimeras [172]. Atsižvelgiant į tai, šio oligomero gauti duomenys patvirtino, kad junginio jonas (23) ([M – H]⁻, m/z 289,0712) yra siejamas su katechinu. Ankstesniuose tyrimuose katechinas buvo aptiktas daugelyje Dioskorėjos genties rūšių: *D. bulbifera*, [158,175], *D. hirtiflora* [175], *D. hamiltonii* [29], o procianidai ankstesniuose tyrimuose buvo nustatyti *D. cirrhosa* [127] ir *D. alata* [176] rūšyse.

Ilgos grandinės riebalų rūgštys ir jų hidroksilinti dariniai yra įprasti įvairioms augalinės kilmės medžiagoms, įskaitant dioskorėjų šakniastiebius [164, 177]. Tirtuose MS spektruose junginio jonas (35) ([M – H]⁻, m/z 295,2273) atitiko hidroksioktadekadieno rūgštis. Kiti dariniai turėjo hidroksilintų riebalų rūgščių struktūras: jonas (32) [M – H]⁻, m/z 327,2172) atitiko hidroperoksi-epoksi-oktadeceno rūgštį; molekulinis jonas (33) ([M – H]⁻, m/z 329,2328) atitiko

trihidroksioktadeceno rūgštį. Hidroksioktadekatrieno rūgštis atitiko molekulinį joną (**34**) ($[M - H]^-$, m/z 293,2117), tačiau buvo aptikta tik niponinės dioskorėjos lapų ekstraktuose. Pažymėtina, kad MS/MS duomenys nepateikia pakankamai informacijos apie tikslią hidroksigrupių padėtį riebalų rūgščių grandinėje. Be to, junginio jonas (**36**) ($[M - H]^-$, m/z 358,2593) atitiko $C_{19}H_{36}NO_5$ molekulinę formulę, kuri buvo siejama su riebalų rūgščių esteriu. Pastarasis buvo priskirtas karnitino dariniui, būtent kaip hidroksidodekanoilkarnitinas (C12-OH). Verta paminėti, kad riebalų rūgščių konjugatai su aminorūgštimis plačiai randami gyvūninės kilmės maisto produktuose, tačiau gana retai aptinkami augaluose.

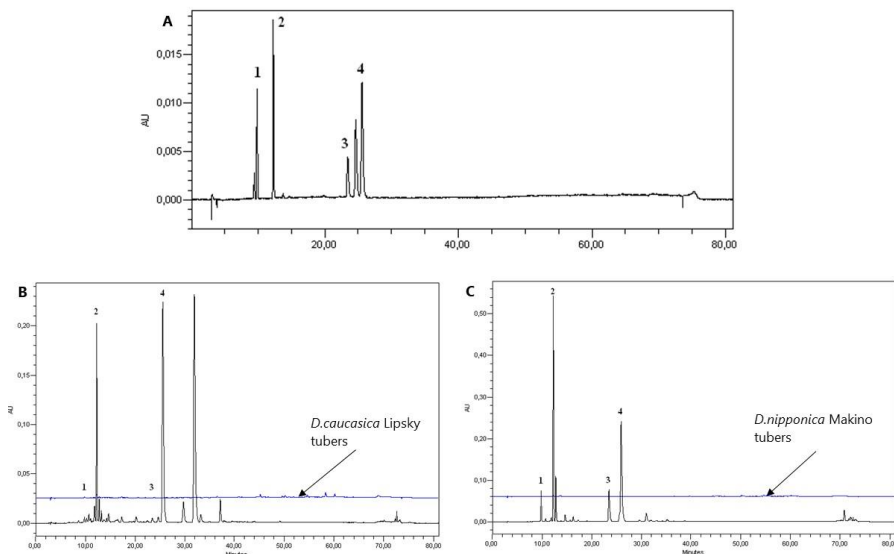
Niponinių dioskorėjų šakniastiebių mėginiuose aptikta steroidinių glikozidų (saponinų), tačiau lapų mėginiuose pavyko aptikti tik tai kelis. Ankstesniuose tyrimuose nustatyti steroidiniai saponinai taip pat dominavo dioskorėjų šakniastiebiuose [174]. QTOF/MS duomenų nepakanka tikslioms junginių struktūroms išsiaiškinti; būtų reikalingas jų gryninimas ir išsamūs spektriniai duomenys, įskaitant įvairias BMR, FTIR modifikacijas; tačiau toks darbas nepateko į mūsų tyrimo sritį. Nepaisant to, junginiai (**41**), (**45**) ir (**47**), atitinkamai turintys $[M - H]^-$ m/z 947,4852, 1091,5274 ir 899,4640 molekulinis jonus, atitiko $C_{46}H_{75}O_{20}$, $C_{52}H_{83}O_{24}$ ir $C_{45}H_{71}O_{18}$ molekulinės formules, neabejotinai priklausančias steroidiniams glikozidams, kurių gausu dioskorėjos genties rūšių šakniastiebiuose [174, 178] ir kai kuriuose kituose augaluose [168, 167]. MS spektre junginio jonas (**48**) ($[M - H]^-$, m/z 767,4218) atitiko $C_{40}H_{63}O_{14}$ molekulinę formulę, kuri atitinka steroidinio saponino pentandrozido B [167] buvimą. Hamed ir kt. (2004) [169] aptiko junginio – pentandrozido B joną ($[M - H]^-$ m/z 767) ragužių (*Tribulus*) genties augalo rūšyje *Tribulus pentandrus*.

Junginio jono (**46**) ($[M - H]^-$, m/z 929,4746) molekulinė formulė $C_{46}H_{73}O_{19}$, skyrėsi vienu papildomu deguonies atomu nuo junginio jono (**44**) ($[M - H]^-$, m/z 945,4695) molekulinės formulės $C_{46}H_{73}O_{20}$, o tai rodo, kad abiejų junginių tapatybės gali priklausyti steroidiniams saponinams. Panašūs molekulinį formulių skirtumai pastebimi tarp junginių: molekuliniai jonai: (**42**) ($[M - H]^-$, m/z 1125,5329, $C_{52}H_{85}O_{26}$) ir (**43**) ($[M - H]^-$, m/z 1109,5379, $C_{52}H_{85}O_{25}$). Pastarieji junginiai taip pat gali priklausyti steroidiniams saponinams – opfiopogonino dariniams [168]. Lapų ekstrakte aptiktas junginys (**56**) ($[M - H]^-$, m/z 721,3646), atitinkantis formulę $C_{34}H_{57}O_{16}$, įvardintas kaip nežinomas galaktolipidas.

Junginiai (**49**), (**50**) ir (**51**), atitinkamai turintys $[M - H]^-$ m/z 585,2673, 570,2788 ir 658,2949 molekulinis jonus, atitiko $C_{28}H_{37}N_6O_8$, $C_{26}H_{36}N_6O_6$ ir $C_{29}H_{40}N_9O_9$ molekulinės formules, priklausančias peptidams. Remiantis Metlin duomenų baze, (**49**) ir (**50**) junginiai identifikuoti kaip tetrapeptidai, o (**51**) identifikuotas kaip pentapeptidas. Įrodomosios informacijos apie peptidus, išgaunamus iš niponinės dioskorėjos augalo dalių, nėra daug. Iki šiol gerai žinomas peptidas yra ciklo-(Leu-Tyr), nustatytas niponinės dioskorėjos šakniastiebiuose [41], vėliau – kitose dioskorėjų rūšyse [166].

3.1.3. Junginių kiekiai *Dioscorea* spp. ekstraktuose

Atlikti papildomi tyrimai, siekiant nustatyti junginių kiekius *Dioscorea* spp. *nipponica*, *caucasica* ekstraktuose. Tyrimams pasirinktos tik tos standartinės medžiagos, kurių geba slopinti fermentų aktyvumą yra įrodyta. Pastarųjų kiekiai nustatyti efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodu (žr. sk. 2.7).



3.1 pav. *D. caucasica* Lipsky (B) ir *D. nipponica* Makino (C) lapų ir šakniastiebių etanolinio ekstrakto chromatografiniai profiliai, vaizduojantys keletą fenolinių junginių. (A) etaloninių tirpalų chromatograma: (1) neochlorogeno rūgštis, (2) chlorogeno rūgštis, (3) rutinas, (4) izokvercitrinas

Kaukazinės dioskorėjos (*Dioscorea caucasica* Lipsky) lapų ekstrakto mėginiuose nustatyti junginių kiekiai: neochlorogeno rūgšties, chlorogeno rūgšties, rutino ir izokvercitrino atitinkamai 5,887, 116,57, 4,021 ir 187,194 $\mu\text{g/ml}$. Niponinių dioskorėjų (*Dioscorea nipponica* Makino) lapų ekstrakto mėginiuose nustatytas neochlorogeno rūgšties, chlorogeno rūgšties, rutino ir izokvercitrino kiekis buvo atitinkamai 72,828, 323,425, 75,206 ir 187,121 $\mu\text{g/ml}$. Tirtų rūšių lapų ekstraktuose izokvercitrino kiekis buvo labai panašus ir svyravo nuo 187,194 iki 187,121 $\mu\text{g/ml}$, tačiau sukauptas rutino kiekis niponinių dioskorėjų ekstrakto lapuose buvo atitinkamai 75,206 $\mu\text{g/ml}$ ir 4,021 $\mu\text{g/ml}$ didesnis (> 50 proc.) nei kaukazinių dioskorėjų ekstrakto lapuose. Taip pat pastebėti dideli hidroksicinamono rūgščių sukaupti kiekio skirtumai tarp tirtų dioskorėjos rūšių ir jos augalo dalių. Chlorogeno ir neochlorogeno rūgščių sukaupti kiekiai niponinių dioskorėjų ekstrakto lapuose buvo atitinkamai 323,425 $\mu\text{g/ml}$ ir 72,828 $\mu\text{g/ml}$ didesni nei kaukazinių dioskorėjų lapų ekstrakto. Kaukazinės dioskorėjos lapuose chlorogeno rūgšties sukauptas kiekis buvo 116,57 $\mu\text{g/ml}$, o neochlorogeno rūgšties – 5,887 $\mu\text{g/ml}$. Mažiausi šių rūgščių kiekiai nustatyti šakniastiebių ekstraktuose. Chlorogeno ir neochlorogeno rūgščių

sukaupiti kiekiai kaukaziųjų dioskorėjų ekstrakto šakniastiebiuose buvo 1,869 µg/ml ir 0,687 µg/ml atitinkamai didesni nei niponinių dioskorėjų šakniastiebių ekstrakto. Niponinės dioskorėjos šakniastiebių ekstrakto chlorogeno rūgšties sukauptas kiekis 1,107 µg/ml, o neochlorogeno rūgšties – 0,181 µg/ml.

Chromatografinis profilis taip pat parodė keletą kitų neidentifikuotų smailių (3.1 pav., B), rodančių augalų medžiagų cheminį kintamumą. Manoma, kad didelis smailių intensyvumas parodė, kad *D. caucasica* lapuose dominuoja flavonoidai, priklausantys kvercetino dariniams.

3.1.4. Junginių profiliai *A. glycyphyllos* L. lapų ekstraktuose

A. glycyphyllos lapų ekstraktuose junginiai nustatyti ESI(–) UESC-QTOF-MS/MS metodu. *A. glycyphyllos* lapų ekstrakto sudėtyje nustatytos: organinės rūgštys (1–3); angliavandeniai (4–6); uridinas (8); hidroksicinamono rūgštys (9–10); cikloartano glikozidai (11–13). Žemiau parodyti (3.3 lent.) išsamesni šių junginių duomenys.

3.3 lentelė. *A. glycyphyllos* L. lapų ekstraktuose nustatyti junginiai UESC/Q-TOF-MS/MS metodu

ID Nr.	<i>t_R</i> , min.	m/z [M– H] [–]			Masių paklaida (ppm)	Identifikuoti junginiai	Literatūra
		Aptiktas	Apskaičiuotas	Aptiktas jonas(ai)			
1.	0,5	133,0142	133,0137	133[C ₄ H ₅ O ₅] [–]	-0,5	<i>D/L</i> -obuolių rūgštis	MS
2.	1,4	117,0191	117,0187	117[C ₄ H ₅ O ₄] [–]	-0,4	Butano dirūgštis (gintaro rūgštis)	MS
3.	2,8	187,0978	187,0970	187[C ₉ H ₁₅ O ₄] [–]	-0,8	Nonano dirūgštis (azelaino rūgštis)	MS
5.	0,5	149,0456	149,0450	149[C ₅ H ₉ O ₅] [–]	-0,6	Pentozė	
6.		341,1082	341,1083	341[C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁] [–]	-0,1	Sacharozė	[179]
7.		387,1145	387,1139	387[C ₁₃ H ₂₃ O ₁₃] [–]	-0,6	Nežinomas disacharidas (DJE = 2) ¹	MS
8.	0,9	243,0623	243,06171	243[C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₆] [–]	-0,6	Uridinas	MS
9.	2,1	337,0934	337,0923	337[C ₁₆ H ₁₇ O ₈] [–]	-1,1	Kumaroilchino rūgštis	MS
10.	2,2	367,1039	367,1029	367[C ₁₇ H ₁₉ O ₉] [–]	-1,0	Feruloilchino rūgštis	[160]
11.	4,2	699,4322	699,4319	699[C ₃₇ H ₆₃ O ₁₂] [–]	-0,3	Cikloartano glikozidas	[180]
12.	4,6	695,4008	695,4006	695[C ₃₇ H ₅₉ O ₁₂] [–]	-0,2	Cikloartano glikozidas	[180]
13.	5,4	691,4060	691,4057	691[C ₃₈ H ₅₉ O ₁₁] [–]	-0,3	Cikloartano glikozidas	[180]

¹DJE, dvigubos jungties ekvivalentas (angl. *double bond equivalent*, DBE)

Saldžialapės kulkšnės lapuose nustatytos organinės rūgštys: *D/L*-obuolių (**1**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 133,0137), gintaro (**2**) ($[M - H]^-$ jonas m/z 117,0187), azelaino (**3**), ($[M - H]^-$ jonas m/z 187,0970) sulaikymo laiko (t_R) intervaluose nuo 0,5 iki 2,8 min. Kiti molekuliniai jonai (**5**) ($[M - H]^-$, m/z 149,0456) (**6**) ($[M - H]^-$, m/z 341,1083) ir nežinomas disacharidas (**7**) ($[M - H]^-$, m/z 387,1139), kurių sulaikymo laikas (t_R) 0,5 min., identifikuoti atitinkamai kaip (**5**) pentozė, (**6**) sacharozė ir (**7**) nežinomas disacharidas. Žinant, kad šioje rūšyje daugelio monosacharidų kiekius nustatė Lysiuk ir kt. (2015) [179], nesunku buvo šiuos junginius priskirti angliavandenių klasei būdingiems junginiams. Taip pat MS spektras junginio (**9**) ($[M - H]^-$, m/z 337,0923) atitiko kumaroilchino rūgšties formulę $C_{16}H_{17}O_8$, o kitas spektras junginio (**10**) ($[M - H]^-$, m/z 367,109) – feruloilchino formulę $C_{17}H_{19}O_9$. Dar vienas junginio jonas (**8**) ($[M - H]^-$, m/z 243,0623) atitiko $C_9H_{11}N_2O_6$ molekulinę formulę, kuri atitinka uridino buvimą. Ankstesniuose tyrimuose uridinas nustatytas plėvėtosios kulkšnės, *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus*(Bge.) Hsiao šaknų etanoliniame ekstrakte [181].

Dar kitų junginių (**11**), (**12**) ir (**13**) tikslių struktūrų nepavyko išsiaiškinti, tačiau, remiantis jų molekuliniais jonais $[M - H]^-$ m/z 699,4319 (t_R , 4,2 min.), 695,4006 (t_R , 4,6 min.) ir 691,40574 (t_R , 5,4 min.), kurie atitinka $C_{37}H_{63}O_{12}$, $C_{37}H_{59}O_{12}$ ir $C_{38}H_{59}O_{11}$ molekulinės formules, priklauso cikloartano glikozidams, kurių gausu *Astragalus* L. genties augalų rūšyse [180].

3.2. Fermentų aktyvumo nustatymas

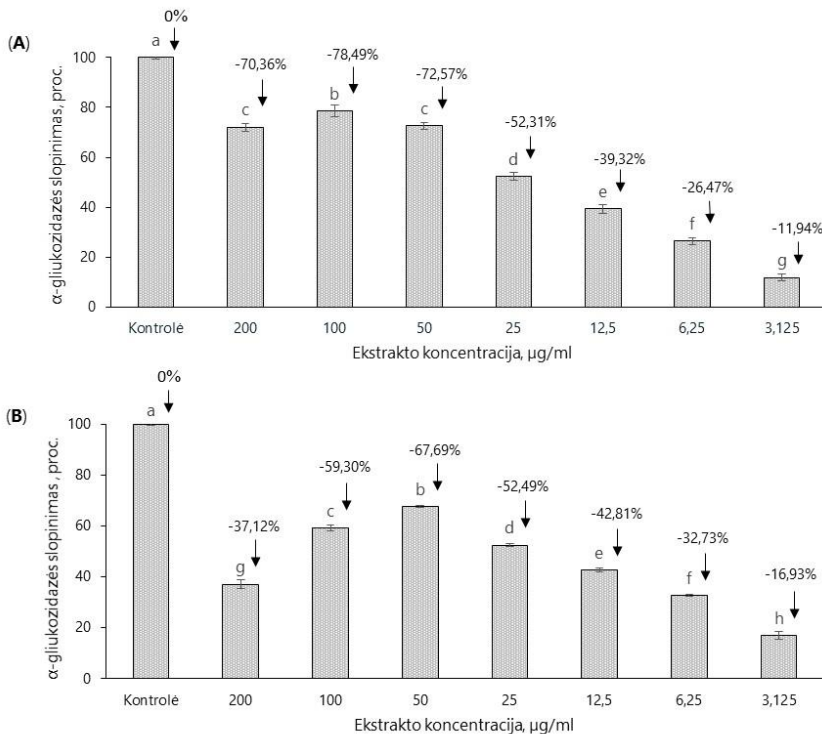
3.2.1. α -gliukozidazės aktyvumo nustatymas *in vitro*

Kaip žinoma, α -gliukozidazė iš mielių (*Saccharomyces cerevisiae*) I tipo priklauso GH13 šeimai, kurios specifškumas daugiausia nukreiptas į (1→4)- α -gliukozidinių ryšių egzohidrolizę [182]. Šio fermento aktyvumo nustatymo ir slopinimo įvertinimo tyrimuose kaip substratas dažniausiai naudojamas *p*-nitrofenil- α -*D*-gliukopiranozidas. Hidrolizės reakcijos metu ($T=37^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 6,8$) α -gliukozidazė katalizuoja substrato *p*NPG vrtimą α -*D*-gliukoze ir *para*-nitrofenoliu (*p*Np), o susidaręs geltonos spalvos *p*Np produktas matuojamas spektrofotometru 1cm storio kiuvetėje esant $\lambda = 405$ nm bangos ilgiui [134].

Tam, kad fermento ir substrato sąveikos modelis būtų optimalus hidrolizės metu, fermentinės reakcijos sistema buvo sumodeliuota atsižvelgiant į Sigma-Aldrich [134] protokole aprašytas tyrimo sąlygas. Pagal taikytiną metodiką parinktas tinkamas fermento / substrato / slopinklio sąveikos modelis ir įvertinta ekstraktų inhibicinė geba.

3.2.1.1. Kaukazinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio α -gliukozidazės fermentui įvertinimas

Kaukazinės dioskorėjos etanolinių ekstraktų geba slopinti fermentą nustatyta dviejose sumodeliuotose fermentinės reakcijos sistemose *in vitro*.



3.2 pav. Kaukazinės dioskorėjos (*D. caucasica*) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -gliukozidazės aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose *in vitro* (A, B)

Paveikslo (A) dalis – reakcija baigiama be 0,1 M Na₂CO₃ reagento; paveikslo (B) dalis – reakcija baigiama su 0,1 M Na₂CO₃ reagentu. Reikšmingas skirtumas tarp sumodeliuotų fermentinių reakcijų sistemų pagal Fišerio LSD testą ($p < 0,05$) po vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA pažymėtas skirtingomis raidėmis virš stulpelių. Ekstrakto slopinimo geba pažymėta neigiamu ženklu procentine išraiška virš stulpelių, fermento-substrato mišinys be inhibitoriaus pažymėtas 0 proc. virš stulpelio.

Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės \pm SN.

Paveiksle aukščiau (3.2 pav., (A) ir (B) dalys) matomas nuo didėjančios ekstrakto koncentracijos priklausomas α -gliukozidazės aktyvumo sumažėjimas visose sumodeliuotose fermentinės reakcijos sistemose. Didinant ekstraktų koncentraciją nuo $\geq 3,125$ $\mu\text{g/ml}$ iki < 200 $\mu\text{g/ml}$, atitinkamai mažėjo fermento aktyvumas: (1) reakciją baigiant be 0,1 M Na₂CO₃: nuo $\geq 11,94 \pm 1,22$ proc. iki $< 70,36 \pm 1,52$ proc., palyginti su kontrole, (2) reakciją baigiant su 0,1 M Na₂CO₃: $\geq 16,93 \pm 1,43$ iki $< 37,12$ proc. $\pm 1,8$, palyginti su kontrole (3.2 pav., (A) ir (B) dalys; 3.4 lent.).

Toks α -gliukozidazės aktyvumo sumažėjimo pokytis lygintas tarp fermentinių reakcijų mišinių, turinčių skirtingas ekstrakto koncentracijas. Šio paveikslo (A) dalyje matomas α -gliukozidazės aktyvumo sumažėjimas nuo $\geq 11,94 \pm 1,22$ iki $< 78,49 \pm 2,39$ proc., didinant ekstrakto koncentraciją nuo $\geq 3,125$ iki < 100 $\mu\text{g/ml}$. Didinant ekstrakto koncentraciją iki > 200 $\mu\text{g/ml}$, fermento aktyvumas sumažėjo, tačiau 100 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracija turėjo stipresnę slopinamąją poveikį α -gliukozidazės aktyvumui. Pastebėta, kad fermentą slopinanti 200 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracija statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo 50 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijos. Šis rezultatas rodo, kad tyrimo metu didžiausias fermento slopinimo poveikis pasiektas esant 100 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijai. Kiek kitoks to paties paveikslo (B) dalyje pavaizduotas fermento aktyvumo sumažėjimas. Didinant ekstrakto koncentracijas nuo $\geq 3,125$ $\mu\text{g/ml}$ iki < 50 $\mu\text{g/ml}$, α -gliukozidazės aktyvumas atitinkamai sumažėjo nuo $\geq 16,93 \pm 1,43$ proc. iki $< 67,69 \pm 0,26$ proc. Didinant ekstrakto koncentraciją nuo ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$ iki < 200 $\mu\text{g/ml}$, α -gliukozidazės aktyvumas sumažėjo atitinkamai nuo $\geq 59,30 \pm 1,1$ proc. iki $37,12 \pm 1,8$ proc. Vis dėlto didesnis fermento aktyvumo sumažėjimas kartu su ekstrakto koncentracijos padidėjimu nustatytas esant 100 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijai nei 200 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijai. Turimi duomenys rodo, kad didžiausias fermento slopinamasis poveikis pasiektas esant 50 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijai, o mažiausias – 200 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijai.

Lyginant α -gliukozidazės aktyvumo sumažėjimo pokyčius tarp dviejų tyrime taikytų metodų atveju, pastebėtas statistiškai reikšmingas skirtingų ekstrakto koncentracijų slopinimo gebos skirtumas ($p < 0,05$), išskyrus 25 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentraciją, *in vitro* metuose (3.2 pav., (A), (B); 3.4 lent.). Tyrime naudojant ekstrakto koncentracijas nuo $\geq 6,25$ – 12,5 $\mu\text{g/ml}$ ir > 50 $\mu\text{g/ml}$, vidutinis procentinis fermento aktyvumo pokyčio skirtumas tarp taikytų metodų atitinkamai buvo $-6,260$ – $-3,490$ proc. ir 4,880 proc. Didinant ekstrakto koncentraciją nuo ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$ ir > 200 $\mu\text{g/ml}$, išryškėjo itin statistiškai reikšmingas vidutinis procentinis fermento aktyvumo pokyčio skirtumas tarp taikytų metodų – 19,19 proc. ir 33,24 proc. Kaip ir minėta, iš visų tyrime pasirinktų ekstrakto koncentracijų tik viena (25 $\mu\text{g/ml}$) turėjo statistiškai nereikšmingus vidutinio procentinio fermento aktyvumo pokyčio skirtumus, kurie tarp taikytų metodų buvo $-0,180$ proc. ($P = 0,8639$) (3.4 lent.).

3.4 lentelė. α -gliukozidazės aktyvumo pokyčio skirtumas tarp taikytų dviejų biologinių tyrimų

<i>D. caucasica</i> lapų etanolinio ekstrakto konc., $\mu\text{g/ml}$	Fermentinės reakcijos sistema		Procentinis skirtumas	<i>p</i> -reikšmė
	Su 0,1 M Na_2CO_3	Be 0,1 M Na_2CO_3		
3,125	16,93 \pm 1,43	11,94 \pm 1,22	-4,990	P = 0,01
6,25	32,73 \pm 0,54	26,47 \pm 1,43	-6,260	P = 0,0021
12,5	42,81 \pm 0,67	39,32 \pm 1,75	-3,490	P = 0,0321
25	52,49 \pm 0,47	52,31 \pm 1,64	-0,180	P = 0,8639
50	67,69 \pm 0,26	72,57 \pm 1,52	4,880	P = 0,0054
100	59,30 \pm 1,1	78,49 \pm 2,39	19,19	P = 0,0002
200	37,12 \pm 1,8	70,36 \pm 1,52	33,24	P < 0,0001

Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės \pm SN. Skirtumų statistinis reikšmingumas įvertintas suporuotų dviejų mėginių *t*-testu.

Skirtingą atsaką į slopinimą galėjo lemti ekstraktų sudėtyje vyraujantys junginiai ir jų koncentracijos, natrio karbonato atsako ryšys ir kitos priežastys, kurių tikslių paaiškinimų mokslinėje literatūroje nepavyko rasti.

Tačiau, nepaisant gautų reikšmingų skirtumų tarp dviejų tyrime taikytų metodų, kaukazių dioskorėjų lapų ekstraktai slopino α -gliukozidazės fermentą labai mažomis koncentracijomis. Ankstesnėse studijose Guo ir kt. tirti purpurinės dioskorėjos (*Dioscorea alata* L.) rūšies šakniastiebių minkštimo ir žievielių etanoliniai ekstraktai taip pat veiksmingai slopino α -gliukozidazės fermentą [183]. Pastarieji ekstraktai sumažino α -gliukozidazės aktyvumą, kai IC_{50} siekė 0,76 \pm 0,08 mg/ml (šakniastiebių minkštimo ekstraktas) ir 0,73 \pm 0,05 mg/ml (šakniastiebių žievės ekstraktas). Suprantama, kad palyginti rezultatų su gautais skirtingų *Dioscorea* L. genties rūšių augalų ekstraktais negalima, tačiau vertinant kaukazių dioskorėjų veiksmingumą α -gliukozidazės fermentui galima pastebėti, kad dioskorėjų etanoliniai ekstraktai ir jų sudėtyje dominuojantys junginiai galėjo nulemti šio fermento aktyvumą.

Atsižvelgiant į tai, kad yra įrodytas hidroksicinamono rūgščių, kvercetino darinių (kvercitrino ir izokvercitrino) slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui, galima daryti išvadą, kad ekstraktų sudėtyje esantys šių skirtingų struktūrų junginiai turėjo įtakos α -gliukozidazės aktyvumo sumažėjimui. Taip pat negalima atmesti ir kitų ekstraktuose nenumatytų junginių indėlio.

3.2.1.1.1. Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas

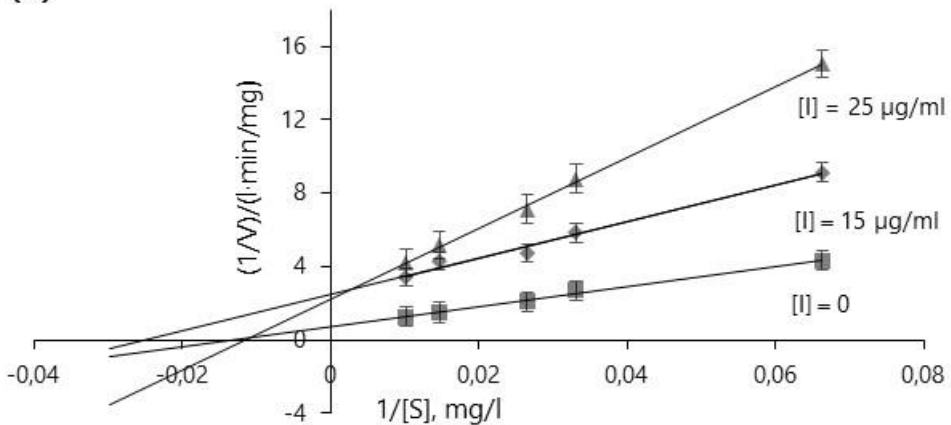
D. caucasica, etanolinių ekstraktų geba slopinti fermentą nustatyta dviejose sumodeliuotose fermentinės reakcijos sistemose.

Norint nustatyti slopinimo konstantų vertes, buvo matuojama fermentinės reakcijos greičio priklausomybė nuo substrato koncentracijos, kai yra ir kai nėra slopiklio. Lainuiverio-Berko grafikas buvo taikomas nustatant fermentinės reakcijos greičio $1/V$ priklausomybę nuo substrato $1/[p\text{NPG}]$, apskaičiuojant kinetinių

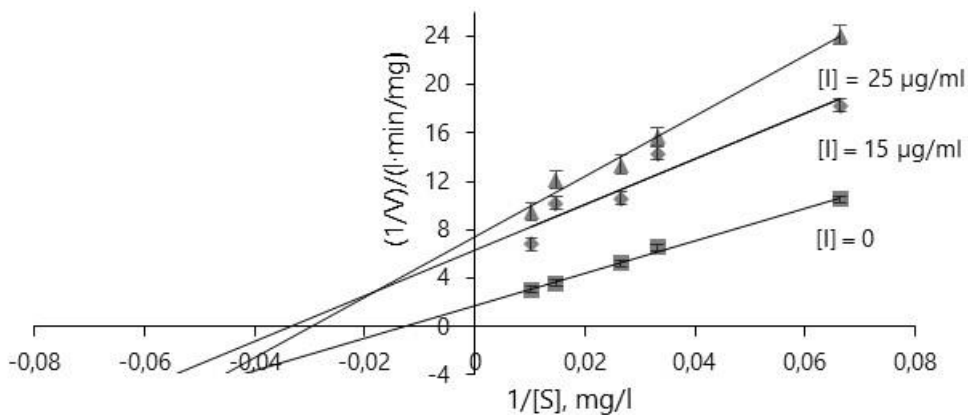
konstantų vertes (V_{\max} , K_m), nustatant tariamąjį slopinamojo poveikio α -gliukozidazei tipą.

Pagal Lainuiverio ir Berko tiesių grafiką, reakcijos greičio pokytis $1/V$ versus $1/[pNPG]$, išreikštas tokiomis lygtimis: (1) kai reakcijos mišinyje nėra slopiklio: $y = 55,052x + 0,7009$, $r^2 = 0,9935$; (2) pridodant 15 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos lapų etanolinio ekstrakto / slopiklio: $y = 99,316x + 2,482$, $r^2 = 0,9852$; pridodant 25 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos lapų etanolinio ekstrakto / slopiklio: $y = 193,4x + 2,2253$ $r^2 = 0,9989$ (**3.3 pav., A**) ir (1) reakcijos mišinyje nėra slopiklio $y = 30,698x + 0,9772$, $r^2 = 0,9292$; (2) pridodant 200 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos šakniastiebių etanolinio ekstrakto / slopiklio: $y = 69,91x + 1,0085$ $r^2 = 0,9833$; pridodant 500 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos šakniastiebių etanolinio ekstrakto / slopiklio: $y = 80,37x + 0,967$ $r^2 = 0,966$ (**3.4 pav.**) Panašiai buvo sudarytas dvigubas abipusis grafikas (Lainuiverio ir Berko grafikas), kai fermentinė reakcija buvo sustabdyta 0,1M Na_2CO_3 reagentu (**3.3 pav., B**). Pagal Lainuiverio ir Berko tiesių grafiką, reakcijos greičio pokytis $1/V$ versus $1/[pNPG]$ išreikštas tokiomis matematinėmis lygtimis: (1) kai reakcijos mišinyje nėra slopiklio $y = 134,64x + 1,7083$, $r^2 = 0,9943$; (2) pridodant 15 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos lapų etanolinio ekstrakto / slopiklio: $y = 188,35x + 6,3407$, $r^2 = 0,9072$; pridodant 25 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos lapų etanolinio ekstrakto / slopiklio: $y = 249,6x + 7,4252$ $r^2 = 0,9862$. Lainuiverio ir Berko grafiko tiesių matematinis modelis (**3.3 pav., (A)** ir **(B)**) dalys rodo fermentinės reakcijos greičio priklausomybę nuo substrato koncentracijos, kai pridodama ir kai nepridodama slopiklio.

(A)



(B)



3.3 pav. Kaukazinės dioskorėjos (*D. caucasica* Lipsky) lapų etanolinio ekstrakto sukeltas tariamasis nekonkurencinis (mišraus tipo) slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui

Lainuiverio ir Berko tiesių grafiko matematinis modelis, sudarytas pagal skirtingas *p*NPG koncentracijas (0,05–0,33 mM) (A, B). (A), reakcija baigiama be 0,1 M Na_2CO_3 reagento.

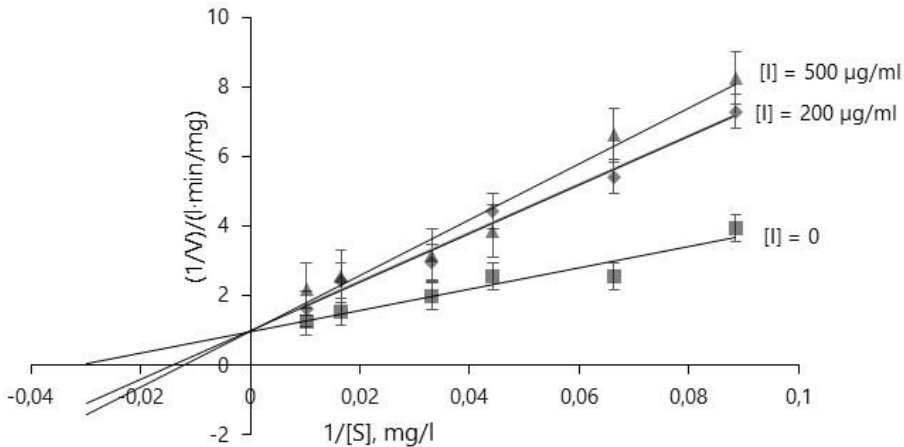
(B), reakcija baigiama su 0,1 M Na_2CO_3 reagentu ■¹, fermento ir substrato sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*; ♦², fermento, substrato ir inhibitoriaus (15 µg/ml) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*; ▲³ fermento, substrato ir inhibitoriaus (25 µg/ml) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės \pm SN.

Kaukazinės dioskorėjos lapų ekstraktai turėjo tariamąjį nekonkurencinį (mišraus tipo) slopinamąjį poveikį α -gliukozidazės fermentui (3.3 pav., (A) ir (B) dalys). Tyrimo metu II fermentinės reakcijos sistemoje (3.5 lent.) esant 15 µg/ml ir 25 µg/ml ekstrakto koncentracijoms $V_{max(app)}$ ir $K_{m(app)}$ reikšmės atitinkamai sumažėjo $0,157 \pm 0,03$ mg/min./ml, $0,134 \pm 0,004$ mg/min./ml ir $29,76 \pm 1,54$ mg/l, $33,61 \pm 0,75$ mg/l. Priešingai, I fermentinės reakcijos sistemoje esant 15 µg/ml ekstrakto koncentracijai $V_{max(app)}$, $K_{m(app)}$ reikšmės atitinkamai sumažėjo $0,402 \pm 0,041$ mg/min./ml ir $39,984$ mg/l, tačiau esant 25 µg/ml ekstrakto koncentracijai $V_{max(app)}$ reikšmė sumažėjo $0,449 \pm 0,026$ mg/min./ml, o $K_{m(app)}$ reikšmė šiek tiek padidėjo iki $86,91$ mg/l. Gautos kinetinių konstantų vertės parodė tariamąjį nekonkurencinį slopinamąjį poveikį α -gliukozidazės fermentui, nepaisant reikšmingų kinetinių konstantų ($V_{max(app)}$, $K_{m(app)}$) reikšmių skirtumų tarp fermentinių reakcijų sistemų. Ne konkurencinį (maišyto tipo) slopinimą patvirtina ir tai, kad Lainuiverio ir Berko tiesių grafike (3.3 pav.) $1/V$ versus $1/[S]$ tiesės, kertančios koordinatinių ašis, susikerta trečiajame kvadrante.

Kaip matyti iš rezultatų (3.5 lent.), α -gliukozidazės katalizinis efektyvumas (KE) skirtingose fermentinių reakcijų sistemose sumažėjo taip: I fermentinėje reakcijoje nuo 0,007 ([I] = 0) iki 0,005 ([I] = 15 µg/ml) ir 0,004 ([I] = 25 µg/ml); fermentinėje reakcijoje II nuo 0,018 ([I] = 0) iki 0,01 ([I] = 15 µg/ml) ir

0,005 ([I] = 25 $\mu\text{g/ml}$). Sumažėjęs katalizės greitis, kartu sumažėjusi susidariusio produkto koncentracija patvirtino ekstraktų gebą slopinti α -gliukozidazės fermentą.

Žemiau parodytas (3.4 pav.) Lainuiverio ir Berko tiesių grafiko matematinis modelis, kuris rodo kaukaziinių dioskorėjų šakniastiebių ekstrakto sukeltą tariamąjį konkurencinį slopinamąjį poveikį α -gliukozidazės fermentui.



3.4 pav. Kaukazinės dioskorėjos (*D. caucasica* Lipsky) šakniastiebių ekstrakto sukeltas tariamasis konkurencinis slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui

Lainuiverio ir Berko grafiko matematinis modelis, sudarytas pagal skirtingas *p*NPG koncentracijas (0,004 – 0,33 mM *p*NPG). \blacksquare ¹, fermento ir substrato sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. \blacklozenge ², fermento, substrato ir inhibitoriaus (200 $\mu\text{g/ml}$) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. \blacktriangle ³, fermento, substrato ir inhibitoriaus (500 $\mu\text{g/ml}$) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės \pm SN.

Kaukazinės dioskorėjos šakniastiebių ekstraktas turėjo konkurencinį inhibicijos tipą, kurio K_i vertė buvo 165,97 iki 304,32 $\mu\text{g/ml}$ esant atitinkamai 200 $\mu\text{g/ml}$ ir 500 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijoms. Didinant ekstrakto koncentraciją, $K_{m(app)}$ reikšmės palaipsniui didėjo nuo $69,34 \pm 0,31$ iki $83,33$ mg/ml , o $V_{max(app)} - 0,99 \pm 0,22$ ir $1,034 \pm 0,38$ mg/l min. , beveik nekito (3.5 lent.). Kaip žinoma, padidėjusi K_m vertė ir nesikeičianti V_{max} rodo konkurencinio slopinimo tipą [152].

3.5 lentelė. Kinetinių parametų analizės įverčiai

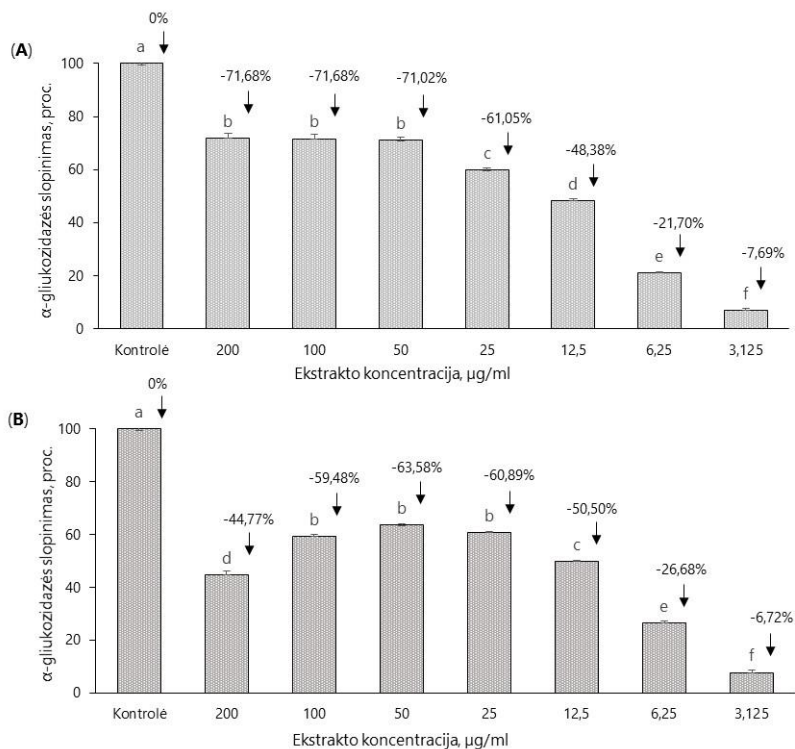
Modelinės fermentinės reakcijos sistemos sąveikos modelis	Kinetinių parametų reikšmės	Kinetiniai parametrai		Slopinimo tipas
		Fermentinės reakcijos sistema I ¹	Fermentinės reakcijos sistema II ²	
I	II	III	IV	V
Slopiklis: <i>D. caucasica</i> Lipsky lapų ekstraktas				
Fermento / substrato sąveikos modelis	K_m , mg/l	78,55 ± 0,11	80,873 ± 0,26	
	V_{max} , mg/l·min.	1,43 ± 0,183	0,597 ± 0,07	
	KE	0,018	0,007	
Fermento / substrato / slopiklio sąveikos modelis. Ekstrakto koncentracija 15 µg/ml	$K_{m(app)}$, mg/l	39,984 ± 0,31	29,761 ± 1,54	Mišrus
	$V_{max(app)}$, mg/l·min.	0,402 ± 0,041	0,157 ± 0,03	
	K_i , µg/ml	5,86	5,35	
	KE	0,01	0,005	
Fermento / substrato / slopiklio sąveikos modelis. Ekstrakto koncentracija 25 µg/ml	$K_{m(app)}$, mg/l	86,91 ± 0,16	33,615 ± 0,75	Mišrus
	$V_{max(app)}$, mg/l·min.	0,449 ± 0,026	0,134 ± 0,004	
	K_i , µg/ml	11,44	7,23	
	KE	0,005	0,004	
Slopiklis: <i>D. caucasica</i> Lipsky šakniastiebių ekstraktas				
Fermento / substrato sąveikos modelis	K_m , mg/l	-	31,446 ± 0,28	
	V_{max} , mg/l·min.	-	1,023 ± 0,23	
Fermento / substrato / slopiklio sąveikos modelis. Ekstrakto koncentracija 200 µg/ml	KE	-	0,032	Konkurencinis
	$K_{m(app)}$, mg/l	-	69,34 ± 0,31	
	$V_{max(app)}$, mg/l·min.	-	0,991 ± 0,22	
	K_i , µg/ml	-	165,97	
	KE	-	0,014	
Fermento / substrato / slopiklio sąveikos modelis. Ekstrakto koncentracija 500 µg/ml	$K_{m(app)}$, mg/l	-	83,125 ± 0,51	Konkurencinis
	$V_{max(app)}$, mg/l·min.	-	1,034 ± 0,38	
	K_i	-	304,32	
	KE	-	0,011	

Fermentinės reakcijos sistema I¹ – reakcija baigiama be 0,1 M Na₂CO₃ reagento; fermentinės reakcijos sistema II² – reakcija baigiama su 0,1 M Na₂CO₃ reagentu.

3.2.1.2. Niponinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio α -gliukozidazės fermentui įvertinimas

Analogiškai tirti ir niponinės dioskorėjos ekstraktai. Tiriant niponinės dioskorėjos etanolinių ekstraktų (3,125–200 µg/ml) slopinimo gebą α -gliukozidazės fermentui žemiau pateiktose diagramose (3.5 pav.) matomas statistiškai reikšmingas

skirtumas ($p < 0,05$) visose sumodeliuotose fermentinės reakcijos sistemose, palyginti su kontrole.



3.5 pav. Niponinės dioskorėjos (*D. nipponica*) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -gliukozidazės aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose *in vitro* (A, B)

Paveikslo (A) dalis – reakcija baigiama be 0,1 M Na₂CO₃ reagento; paveikslo (B) dalis – reakcija baigiama su 0,1 M Na₂CO₃ reagentu. Reikšmingas skirtumas tarp sumodeliuotų fermentinių reakcijų sistemų pagal Fišerio LSD testą ($p < 0,05$) po vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA pažymėtas skirtingomis raidėmis virš stulpelių. Ekstrakto slopinimo geba pažymėta neigiamu ženklu procentine išraiška virš stulpelių, fermento-substrato mišinys be inhibitoriaus pažymėtas 0 proc. virš stulpelio.

Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės \pm SN.

Didinant ekstraktų koncentracijas nuo $\geq 3,125$ µg/ml iki < 200 µg/ml, atitinkamai mažėjo fermento aktyvumas visose sumodeliuotose fermentinės reakcijos sistemose (3.5 pav., (A) ir (B) dalys), palyginti su kontrole.

Diagramos (3.5 pav.) A dalyje matomas atitinkamas α -gliukozidazės aktyvumo sumažėjimas nuo $\geq 7,69 \pm 1,55$ proc. iki $< 61,05 \pm 1,52$ proc., didinant ekstrakto koncentracijas nuo $\geq 3,125$ iki < 25 µg/ml, palyginti su kontrole. Tačiau, didinant ekstrakto koncentraciją nuo ≥ 50 µg/ml iki < 200 µg/ml, fermento aktyvumas nekito ir svyravo atitinkamai nuo 71,02 iki 71,68 proc. Šis rezultatas rodo, kad fermento aktyvumas buvo paveiktas ekstrakto. Kiek kitoks, nei diagramos (A) dalyje pavaizduotas fermento aktyvumo sumažėjimas matomas diagramos (B) dalyje. Didinant ekstrakto koncentracijas nuo $\geq 3,125$ µg/ml iki $< 12,5$ µg/ml α -gliukozidazės

aktyvumas mažėjo atitinkamai nuo $\geq 6,72 \pm 1,41$ proc. iki $< 50,50 \pm 3,29$ proc., palyginti su kontrole. Toliau didinant ekstrakto koncentraciją nuo ≥ 25 $\mu\text{g/ml}$ iki < 100 $\mu\text{g/ml}$, α -gliukozidazės aktyvumo sumažėjimas beveik nekito ir svyravo atitinkamai nuo $\geq 60,89 \pm 1,88$ proc. iki $< 59,48 \pm 0,76$ proc., palyginti su kontrole. Tačiau, didinant ekstrakto koncentraciją ≤ 200 $\mu\text{g/ml}$, α -gliukozidazės aktyvumas sumažėjo $44,77 \pm 1,98$ proc., palyginti su kontrole, bet ne taip, kaip tikėtasi.

Lyginant α -gliukozidazės aktyvumo sumažėjimo pokyčius tarp dviejų tyrime taikytų metodų, statistiškai reikšmingas procentinis skirtumas nustatytas didinant ekstrakto koncentraciją nuo ≥ 50 $\mu\text{g/ml}$ iki < 200 $\mu\text{g/ml}$ *in vitro* metoduose. Gauti rezultatai pateikiami **3.6 lentelėje**. Pastarųjų koncentracijų vidutinis procentinis fermento aktyvumo pokyčio skirtumas tarp taikytų metodų buvo atitinkamai 7,44 proc., 12,20 proc. ir 26,91 proc. O mažesnės ekstrakto koncentracijos statistiškai reikšmingai nesiskyrė: $< 3,125$ $\mu\text{g/ml}$: 0,96 proc. ($P = 0,4719$); 6,25 $\mu\text{g/ml}$: -4,980 proc. ($P = 0,129$); 12,5 $\mu\text{g/ml}$: -2,12 proc. ($P = 0,4054$) > 25 $\mu\text{g/ml}$: -0,16 proc. ($P = 0,9143$).

3.6 lentelė. α -gliukozidazės aktyvumo pokyčio skirtumas tarp taikytų dviejų biologinių tyrimų

<i>D. nipponica</i> lapų etanolinio ekstrakto konc., $\mu\text{g/ml}$	Fermentinės reakcijos modelinė sistema		Procentinis skirtumas	<i>p</i> reikšmė
	Su 0,1 M Na_2CO_3	Be 0,1 M Na_2CO_3		
3,125	$6,72 \pm 1,41$	$7,68 \pm 1,55$	0,960	$P = 0,4719$
6,25	$26,68 \pm 2,99$	$21,70 \pm 3,39$	-4,980	$P = 0,129$
12,5	$50,50 \pm 3,29$	$48,38 \pm 2,19$	-2,120	$P = 0,4054$
25	$60,89 \pm 1,88$	$61,05 \pm 1,52$	-0,16	$P = 0,9143$
50	$63,58 \pm 1,96$	$71,02 \pm 1,69$	7,44	$P = 0,0076$
100	$59,48 \pm 0,76$	$71,68 \pm 1,16$	12,20	$P = 0,0001$
200	$44,77 \pm 1,98$	$71,68 \pm 0,68$	26,91	$P < 0,0001$

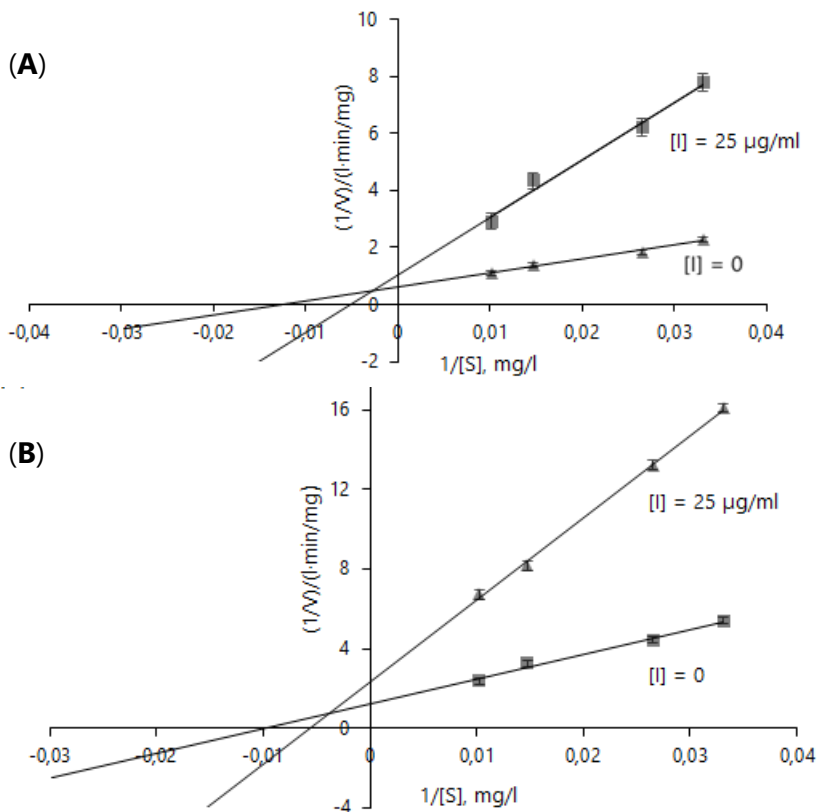
Skirtumų statistinis reikšmingumas įvertintas suporuotų dviejų mėginių *t*-testu. Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės \pm SN.

Atsižvelgiant į tai galima manyti, kad fermentinių reakcijų mišinių sudėtyje esantis 0,1M Na_2CO_3 reagentas galėjo smarkiai pakeisti fermento aktyvumą *in vitro*, kaip ir prieš tai atliktame tyrime su kaukazinės dioskorėjos lapų ekstraktais. Taip pat visiškai suprantamas slopinimo atsakas fermento aktyvumo atveju. Tai parodyta **3.6 lentelėje**. Reikšmingi slopinimo skirtumai tarp reakcijos sistemų ypač ryškėja didinant ekstrakto koncentraciją. Literatūroje nepavyko aptikti informacijos apie galimus fermento aktyvumo įvertinimo *in vitro* pasikeitimus tiriant augalinės kilmės preparatų sukeltą α -gliukozidazės slopinimą šiuo metodu. Taip pat nėra daug atliktų tyrimų reakciją pabaigiant be Na_2CO_3 reagento. Trifonova ir kt. (2021) [135], Stoilova ir kt. (2017) [136] tyrė augalinių ekstraktų veiksmingumą slopinant α -gliukozidazės fermentą klasikiniu chromogeniniu metodu, nenaudodamos Na_2CO_3 reagento. Šios įžvalgos gali būti labai naudingos atliekant panašius tyrimus su augaliniais ekstraktais ar augalinės kilmės produktais.

3.2.1.2.1. Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas

Analogiškai Lainuiverio ir Berko tiesių grafikas buvo taikomas nustatant fermentinės reakcijos greičio $1/V$ priklausomybę nuo substrato $1/[pNPG]$, apskaičiuojant kinetinių konstantų vertes (V_{max} , K_m), nustatant tariamąjį slopinamojo poveikio α -gliukozidazei tipą.

Pagal Lainuiverio ir Berko matematinę grafiką, reakcijos greičio pokytis $1/V$ versus $1/[pNPG]$ išreikštas tokiomis fermentinės reakcijos lygtimis: (1) be slopiklio reakcijos mišinyje: $y = 49,172x + 0,5981$, $r^2 = 0,9853$; pridant 25 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos lapų etanolinio ekstrakto / slopiklio: $y = 200,95x + 1,0672$, $r^2 = 0,9872$ (**3.6 pav., A**); (2) be slopiklio reakcijos mišinyje: $y = 114,08x + 0,5349$, $r^2 = 0,975$, pridant 500 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos šakniastiebių etanolinio ekstrakto / slopiklio: $y = 188,05x + 1,0962$, $r^2 = 0,9813$ (**3.7 pav.**) Panašiai buvo sudarytas dvigubas abipusis grafikas, kai fermentinė reakcija buvo sustabdyta naudojant 0,1M Na_2CO_3 (**3.6 pav., B**). Buvo išreikštos šios matematinės lygtys: (1) be slopiklio reakcijos mišinyje $y = 125,15x + 1,2148$, $r^2 = 0,9887$; pridant 25 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos etanolinio lapų ekstrakto / slopiklio: $y = 412,31x + 2,328$, $r^2 = 0,9982$.



3.6 pav. Niponinės dioskorėjos (*D. nipponica* Makino) lapų etanolinio ekstrakto sukeltas tariamasis nekonkurencinis (mišraus tipo) slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui

Lainuiverio ir Berko tiesių grafiko matematinis modelis, sudarytas pagal skirtingas *p*NPG koncentracijas (0,1 – 0,33 mM) (**A**, **B**). **A**: reakcija baigiama be 0,1 M Na₂CO₃ reagento. ▲¹, fermento ir substrato sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. ■², fermento, substrato ir inhibitoriaus (25 μg/ml) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. **B**: reakcija baigiama su 0,1 M Na₂CO₃ reagentu. ■¹, fermento ir substrato sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. ▲², fermento, substrato ir inhibitoriaus (25 μg/ml) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės ± SD.

Inhibitorius (25 μg/ml lapų ekstraktas) pakeitė fermentinės reakcijos greičio lygtį – padidino K_m konstantą ir sumažino maksimalų reakcijos greitį, palyginti su kontrole (**3.7 lent.**). Fermentinės reakcijos mišinio sudėties modelis be natrio karbonato (**3.6 pav., A**) smarkiai nepakeitė K_m konstantų, tačiau maksimalus reakcijos greitis statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi modelinėse fermentinės reakcijos sistemose, lyginant jas tarpusavyje (**3.7 lent.**). Tokie kinetiniai parametrai, kaip V_{max} mažėjimas ir K_m konstantos didėjimas [152], būdingi nekonkurenciniam inhibavimo tipui. Taip pat nekonkurencinį (maišyto tipo) slopinimą patvirtino ir tai, kad Lainuiverio ir Berko tiesių grafike $1/V$ versus $1/[S]$ tiesės sukosi apie abscisės ašį – $1/K_m$ [151 p. 114]. Šis slopinimo profilis rodė, kad inhibitorius jungiasi ir su laisvuju fermentu (E), ir su fermento substrato (ES) kompleksu [150].

3.7 lentelė. Kinetinių parametru analizės įverčiai

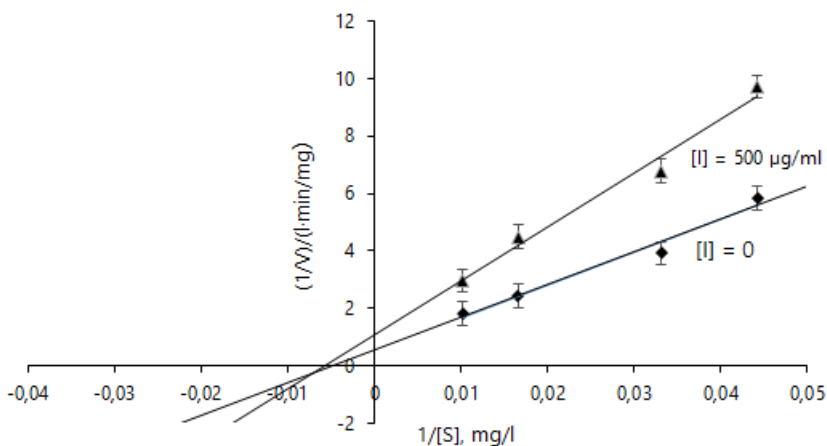
Slopiklio koncentracija, μg/ml	$K_{m(app)}$, mg/l	$V_{max(app)}$, mg/l·min.	K_i , μg/ml	Slopinimo tipas
25 (D.N lapų ekstraktas)	188,29 ± 5,8	0,94 ± 0,35	31,87	
	177,11 ± 0,7*	0,43 ± 0,06*	27,23*	Mišrus
Kontrolė ¹	82,21 ± 4,5	1,67 ± 0,28		
	103,02 ± 1,3*	0,82 ± 0,13*		
500 (D.N šakniastiebių ekstraktas)	171,54 ± 8,25	0,912 ± 0,45	476,5	Mišrus
	Kontrolė ¹	213,67 ± 12,92	1,869 ± 0,38	

¹ K_m ir V_{max} – fermentinės reakcijos sistema be slopiklio.

² $K_{m(app)}$ ir $V_{max(app)}$ – identiški kinetiniai parametrai, kaip K_m ir V_{max} , tik fermentinės reakcijos sistema su slopikliu. Duomenys pateikti kaip vidurkiai ± SN.

*Simbolis – fermentinės reakcijos sistema baigiama su 0,1M Na₂CO₃.

Panašiai kaip ir lapų, niponinių dioskorėjų šakniastiebių ekstraktas (**3.7 pav.**) pasižymėjo mišriu nekonkurenciniu slopinamuoju poveikiu α-gliukozidazės fermentui. Tai galima paaiškinti mažėjančiomis $K_{m(app)}$ ir $V_{max(app)}$ kinetinių konstantų vertėmis, palyginti su kontrole. Taip pat Lainuiverio ir Berko tiesių grafike $1/V$ versus $1/[S]$ tiesės, kertančios koordinačių ašis ir susikertančios trečiajame kvadrante, patvirtino mišraus tipo slopinimą [150, 152].



3.7 pav. Niponinės dioskorėjos (*D. nipponica* Makino) šakniastiebių etanolinio ekstrakto sukeltas tariamasis nekonkurencinis (mišraus tipo) slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui

Lainuivierio ir Berko tiesių grafiko matematinis modelis, sudarytas pagal skirtingas *p*NPG koncentracijas (0,075 – 0,33 mM). \blacklozenge^1 , fermento ir substrato sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. \blacktriangle^2 , fermento, substrato ir inhibitoriaus (500 µg/ml) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės \pm SN.

Apibendrinant tyrimo rezultatus galima daryti išvadą, kad tirti dioskorėjų ekstraktai geba slopinti α -gliukozidazės fermentą labai mažomis koncentracijomis. Tokią ekstraktų inhibicinę gebą galima susieti su hidroksicinamono rūgštimis, kvercetino dariniais (kvercitrinu ir izokvercitrinu), kurie dominavo ekstraktų sudėtyje, o jų inhibicinis poveikis seniai įrodytas mokslo.

Taikant nedidelius biologinio tyrimo pakeitimus pastebėta, kad 0,1M Na₂CO₃ reagentas gali smarkiai pakeisti fermento aktyvumo rodmenis *in vitro*, ypač didesnės ekstrakto koncentracijos. Tyrimo metu nustatyta, kad kaukazinių ir niponinių dioskorėjų lapų ekstraktai (200 µg/ml) > 50 proc. slopino α -gliukozidazės fermentą, šaknų ekstraktai (500 µg/ml) pastarąjį fermentą slopino silpnai: 36,79 \pm 2,93 proc. kaukazinės ir 40,79 \pm 2,71 proc. niponinės dioskorėjos ekstraktai.

3.2.1.3. Saldžialapės kulkšnės ekstraktų slopinamojo poveikio α -gliukozidazės fermentui įvertinimas

Sausi etanoliniai kulkšnės lapų ekstraktai buvo tirpinami metanolyje. Kaip matyti iš žemiau pateiktos **3.8 lent.**, visos ekstrakto koncentracijos (100 iki 400 µg/ml) pasižymėjo slopinamuoju poveikiu α -gliukozidazės fermentui.

3.8 lentelė. Saldžialapės kulkšnės (*A. glycyphyllos* L.) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -gliukozidazės aktyvumui

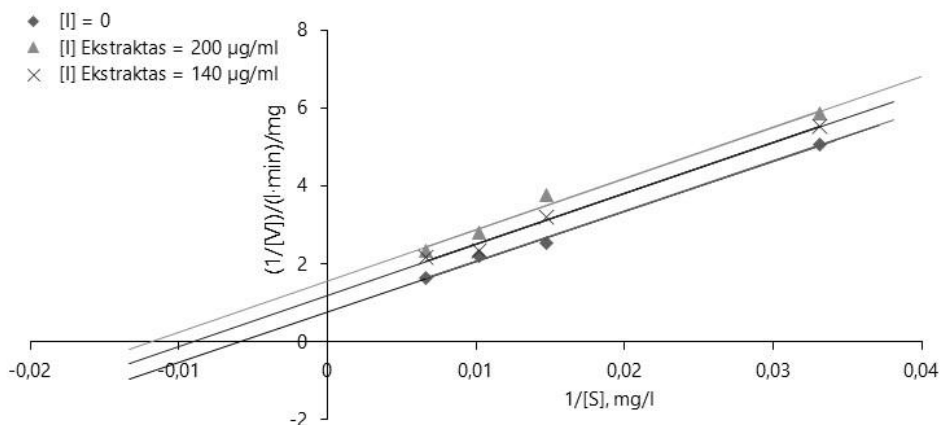
Tirpiklis	Slopiklio koncentracija, $\mu\text{g/ml}$	Inhibavimas, proc.
Metanolis / vanduo (70/30 v/v)	100	$29,12^a \pm 0,39$
	120	$34,21^b \pm 0,16$
	160	$38,67^c \pm 4,06$
	200	$43,40^d \pm 0,17$
	360	$51,04^e \pm 0,57$
	400	$54,33^f \pm 0,7$

Pateiktas vidutinės trijų matavimų \pm standartinis nuokrypis (SN). Skirtingos raidės rodo reikšmingą skirtumą tarp fermentinių reakcijų sistemų pagal Fišerio LSD testą ($p < 0,05$) po vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA.

Tyrimo metu nustatyta, kad α -gliukozidazės fermento aktyvumas priklausė nuo saldžialapės kulkšnės ekstrakto koncentracijos. Didinant ekstrakto koncentraciją nuo $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ iki $< 400 \mu\text{g/ml}$, α -gliukozidazės aktyvumas mažėjo palaipsniui nuo $\geq 29,12 \pm 0,39$ iki $< 54,33 \pm 0,7$ proc., palyginti su kontrole. Tai rodo, kad reakcijos mišinys palaipsniui buvo įsotinamas ekstraktu. *In vitro* tyrimo metu gauti duomenys rodo, kad saldžialapės kulkšnės lapų ekstraktas esant $360 \mu\text{g/ml}$ slopino fermentą $51,04 \pm 3,27$ proc.

3.2.1.3.1. Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas

Saldžialapės kulkšnės lapų ekstraktas pasižymėjo tariamuoju nekonkurenciniu slopinamuoju poveikiu α -gliukozidazės fermentui. Tai galima matyti kinetiniame Lainuiverio ir Berko tiesių grafike (**3.8 pav.**), kuriame vaizduojamas fermento ir substrato bei fermento, substrato ir ekstrakto sąveikos modelis.



3.8 pav. Saldžialapės kulkšnės (*A. glycyphyllos L.*) lapų ekstrakto sukeltas tariamasis bekonkurencinis slopinamasis poveikis α -gliukozidazės fermentui

Lainuiverio ir Berko tiesių grafiko matematinis modelis, sudarytas pagal skirtingas *p*NPG koncentracijas (0,1–0,5 mM *p*NPG). \blacklozenge^1 , fermento ir substrato sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. \blacktriangle^2 , fermento, substrato ir inhibitoriaus (200 μ g/ml) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. \times^3 , fermento, substrato ir inhibitoriaus (140 μ g/ml) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės \pm SN.

Tyrimo metu didinant ekstrakto koncentracijas (**3.9 lent.**), kinetinių parametru reikšmės atitinkamai mažėjo: $K_{m(app)}$: < 140 μ g/ml: $109,09 \pm 22,40$; > 200 μ g/ml: $84,09 \pm 8,75$; $V_{max(app)}$: < 140 μ g/ml: $0,639 \pm 0,02$ mg/min./ml; > 200 μ g/ml: $0,834 \pm 0,03$ mg/min./ml, palyginti su kontrole. Kinetinių parametru reikšmių mažėjimas ir nesukertančios tiesės ordinačių ašyje būdingas tariamajam bekonkurenciniam slopinimui. Pastarasis slopinimo profilis rodo, kad slopiklis jungiasi tik su fermento-substrato (ES) kompleksu, sudarydamas neaktyvų fermento-substrato-inhibitoriaus (ESI) kompleksą.

3.9 lentelė. Kinetinių parametru analizės įverčiai

Slopiklio koncentracija, mg/ml	$K_{m(app)}$, mg/l	$V_{max(app)}$, mg/l·min.	K_i , mg/ml	Slopinimo tipas
0,14	$109,09 \pm 22,4$	$0,834 \pm 0,03$	0,25	
0,2	$84,09 \pm 8,75$	$0,639 \pm 0,02$	0,195	Bekonkutencinis
Kontrolė ¹	$166,97 \pm 26,14$	$1,294 \pm 0,06$		

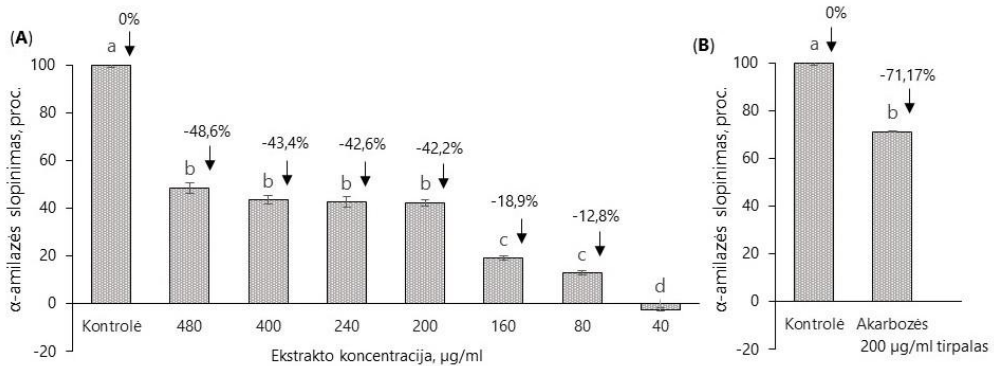
¹ K_m ir V_{max} – fermentinės reakcijos sistema be slopiklio.

² $K_{m(app)}$ ir $V_{max(app)}$ – identiški kinetiniai parametrai, kaip K_m ir V_{max} , tik fermentinės reakcijos sistema su slopikliu. Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SN.

3.2.2. α -amilazės aktyvumo nustatymas *in vitro*

Kaip aprašyta anksčiau, α -amilazė (EC 3.2.1.1; 1,4-alfa-*D*-gliukangliukohidrolazė) yra pagrindinis hidrolazės klasės fermentas, skaidantis α -1,4-glikozidinius krakmolingų polisacharidų vidinius ryšius ir taip gamindamas linijinės struktūros maltooligosacharidus. Šio fermento aktyvumo nustatymo ir slopinimo įvertinimo tyrimuose kaip substratas dažniausiai naudojamas krakmolas. Hidrolizės reakcijos metu α -amilazė katalizuoja substrato (krakmolo), virtimą į redukuotą cukrų formą (dažniausiai į *D*-gliukozę). Norint nustatyti α -amilazės aktyvumą, buvo pritaikytas kolorimetrinis metodas, aprašytas Sigma-Aldrich protokole [145]. Po hidrolizės fermentinės reakcijos mišiniui reaguojant su 3,5-dinitrosalicilo rūgšties tirpalu, susidaro 3-amino-5-salicilo rūgštis. Susidaręs rudos / oranžinės-raudonos spalvos DNSA produktas matuojamas 1 cm storio kiuvetėje esant $\lambda = 540$ bangos ilgiui.

3.2.2.1. Kaukazinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio α -amilazės fermentui įvertinimas



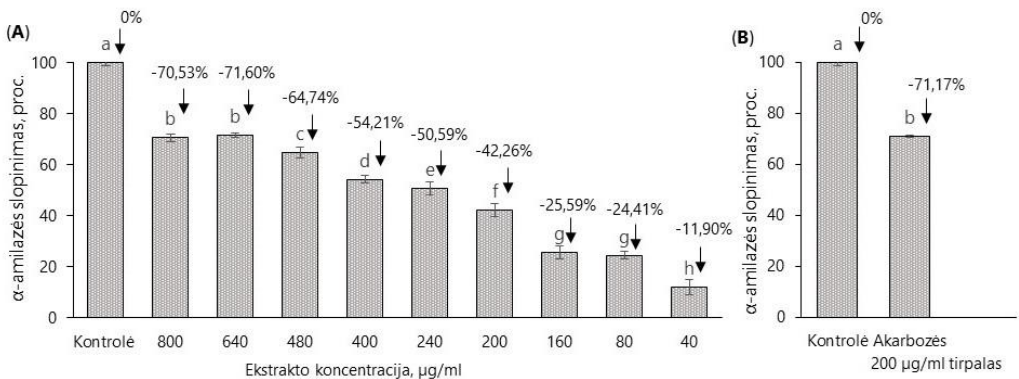
3.9 pav. Kaukazinės dioskorėjos (*D. caucasica*) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -amilazės aktyvumui (A) ir akarbozės vandeninio tirpalo poveikis α -amilazės aktyvumui (B) fermentinės reakcijos sistemose *in vitro*

Stulpelinės diagramos (A) stulpelių eilėje, kurioje paskutinis stulpelis yra žemiau horizontalios linijos, rodo, kad 40 $\mu\text{g/ml}$ lapų ekstrakto koncentracija negeba slopinti fermento aktyvumo. Reikšmingas skirtumas tarp sumodeliuotų fermentinių reakcijų sistemų pagal Fišerio LSD testą ($p < 0,05$) po vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA pažymėtas skirtingomis raidėmis virš stulpelių. Ekstrakto slopinimo geba pažymėta neigiamu ženklu procentine išraiška virš stulpelių, fermento-substrato mišinys be inhibitoriaus pažymėtas 0 proc. virš stulpelio. Pateiktos vidutinės trijų matavimų \pm standartinės paklaidos (angl. *standard error mean*, SE).

Veikiant fermentui ir slopikliui, papildomai galima reguliuoti fermentinės reakcijos eigą. **3.9 pav.** (taip pat prieš tai pateiktuose slopinimo tyrimuose) galima matyti nuo slopiklio koncentracijos priklausomą fermento aktyvumą. Didinant ekstraktų koncentracijas nuo ≥ 40 $\mu\text{g/ml}$ iki < 480 $\mu\text{g/ml}$, atidinkamai mažėjo fermento aktyvumas visose sumodeliuotose fermentinės reakcijos sistemose (**3.9 pav.**), palyginti su kontrole, išskyrus 40 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentraciją *in vitro* tyrimuose. Tačiau, lyginant α -amilazės aktyvumo pokytį tarp fermentinių reakcijų

mišinių, turinčių skirtingas ekstrakto koncentracijas, fermento aktyvumas procentiškai atitinkamai sumažėjo nuo $\geq 12,8 \pm 0,9$ proc. iki $< 42,2 \pm 1,3$ proc., didinant ekstrakto koncentraciją – nuo $\geq 80 \mu\text{g/ml}$ iki $< 200 \mu\text{g/ml}$. Didinant ekstrakto koncentraciją nuo $\geq 200 \mu\text{g/ml}$ iki $< 480 \mu\text{g/ml}$, α -amilazės aktyvumas smarkiai nekito ir svyravo nuo $42,6 \pm 2,3$ proc. iki $48,6 \pm 2,2$ proc. Toks laipsniškas fermento aktyvumo sumažėjimas gali rodyti slopiklio pakankamą įsisotinimą tyrimo metu. Rezultatai dar parodo, kad akarbozės vandeninis tirpalas sumažino fermento aktyvumą $\sim 71,17 \pm 0,4$ proc. esant $200 \mu\text{g/ml}$ koncentracijai. Iš šių duomenų galima daryti išvadą, kad *D. caucasica* lapų ekstraktas veiksmingas slopinant α -amilazės fermentą, tačiau statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) mažiau nei akarbozės vandeninis tirpalas.

3.2.2.2. Niponinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio α -amilazės fermentui įvertinimas



3.10 pav. Niponinės dioskorėjos (*D. nipponica*) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -amilazės aktyvumui (A) ir akarbozės vandeninio tirpalo poveikis α -amilazės aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose *in vitro* (B)

Reikšmingas skirtumas tarp sumodeliuotų fermentinių reakcijų sistemų pagal Fišerio LSD testą ($p < 0,05$) po vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA pažymėtas skirtingomis raidėmis virš stulpelių. Ekstrakto slopinimo geba pažymėta neigiamu ženklų procentine išraiška virš stulpelių, fermento-substrato mišinys be inhibitoriaus pažymėtas 0 proc. virš stulpelio. Pateiktos vidutinės trijų matavimų \pm standartinės paklaidos (angl. *standard error mean*, SE).

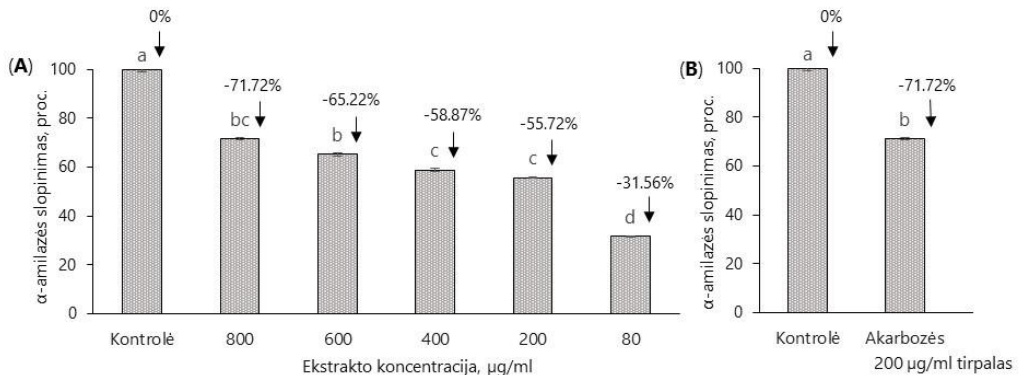
Analogiškai (3.10 pav.), kaip kaukazinės dioskorėjos lapų ekstrakto tyrimuose, matomas nuo didėjančios ekstrakto koncentracijos priklausomas α -amilazės aktyvumo pokytis visuose sumodeliuotuose fermentinių reakcijų mišiniuose. Didinant ekstraktų koncentraciją atitinkamai mažėjo fermento aktyvumas: $< 40 \mu\text{g/ml}$: $11,9 \pm 2,94$ proc.; $80 \mu\text{g/ml}$: $24,41 \pm 1,49$ proc.; $160 \mu\text{g/ml}$: $25,59 \pm 2,73$; $200 \mu\text{g/ml}$: $42,26 \pm 2,72$ proc.; $240 \mu\text{g/ml}$: $50,59 \pm 2,52$ proc.; $400 \mu\text{g/ml}$: $54,21 \pm 1,48$ proc.; $480 \mu\text{g/ml}$: $64,74 \pm 1,0$ proc.; $640 \mu\text{g/ml}$: $71,6 \pm 1,0$ proc.; $> 800 \mu\text{g/ml}$: $70,53 \pm 1,37$ proc.

Fermento aktyvumo pokytis sumodeliuotose reakcijos sistemose statistiškai reikšmingai skyrėsi ($p < 0,05$), kai ekstrakto koncentracijos buvo

didinamos: nuo ≥ 40 $\mu\text{g/ml}$ iki < 800 $\mu\text{g/ml}$, palyginti su kontrole; nuo $\geq 40 - 80$ $\mu\text{g/ml}$ ir $\geq 160 - 640$ $\mu\text{g/ml}$, lyginant tarp fermentinių reakcijų mišinių. Tačiau fermento aktyvumo sumažėjimo pokytis statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$) tarp fermentinių reakcijų mišinių didinant ekstrakto koncentracijas: nuo ≥ 80 $\mu\text{g/ml}$ iki < 160 $\mu\text{g/ml}$ ir nuo ≥ 640 $\mu\text{g/ml}$ iki < 800 $\mu\text{g/ml}$. Enzimologiniu požiūriu fermentinės reakcijos sistema palaipsniui įsisotino slopiklį, gebantį sumažinti fermento aktyvumą > 50 proc. *In vitro* tyrimo metu gauti duomenys rodo, kad niponinių dioskorėjų lapų ekstraktas sumažino α -amilazės aktyvumą, kai IC_{50} siekė 437,96 $\mu\text{g/ml}$. Iš šių duomenų galime daryti išvadą, kad *D. nipponica* lapų ekstraktas buvo stiprus α -amilazės inhibitorius, bet ne reikšmingai stipresnis nei akarbozės vandeninis tirpalas. Pastarasis sumažino fermento aktyvumą $\sim 71,17 \pm 0,4$ proc. esant 200 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijai.

3.2.2.3. Saldžialapės kulkšnės ekstraktų slopinamojo poveikio α -amilazės fermentui įvertinimas

Saldžialapės kulkšnės ekstraktų slopinimo gebos α -amilazės fermentui įvertinimas taip pat buvo tiriamas pritaikant Milerio reakciją [145].



3.11 pav. Saldžialapės kulkšnės (*A. glycyphyllos*) lapų etanolinio ekstrakto poveikis α -amilazės aktyvumui (A) ir akarbozės vandeninio tirpalo poveikis α -amilazės aktyvumui (B) fermentinės reakcijos sistemose *in vitro*

Reikšmingas skirtumas tarp sumodeliuotų fermentinių reakcijų sistemų pagal Fišerio LSD testą ($p < 0,05$) po vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA pažymėtas skirtingomis raidėmis virš stulpelių. Ekstrakto slopinimo geba pažymėta neigiamu ženklu procentine išraiška virš stulpelių, fermento-substrato mišinys be inhibitoriaus pažymėtas 0 proc. virš stulpelio. Pateiktos vidutinės trijų matavimų \pm standartinės paklaidos (angl. *standard error mean*, SE).

Paveiksle aukščiau (3.11 pav.) matomas nuo didėjančios ekstrakto koncentracijos priklausomas α -amilazės aktyvumo sumažėjimas visuose sumodeliuotuose fermentinės reakcijos mišiniuose. Didinant ekstraktų koncentracijas atitinkamai mažėjo fermento aktyvumas: < 80 $\mu\text{g/ml}$: $31,56 \pm 0,18$ proc.; 200 $\mu\text{g/ml}$: $55,72 \pm 0,78$ proc.; 400 $\mu\text{g/ml}$: $58,87 \pm 0,55$ proc.; 600 $\mu\text{g/ml}$: $65,22 \pm 0,50$ proc.; > 800 $\mu\text{g/ml}$: $71,72 \pm 0,48$ proc. Didžiausias fermento aktyvumo sumažėjimas nustatytas esant 800 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijai. Fermento aktyvumo pokytis

sumodeliuotose reakcijos sistemose statistiškai reikšmingai skyrėsi ($p < 0,05$), kai ekstrakto koncentracijos buvo didinamos: nuo $\geq 80 \mu\text{g/ml}$ iki $< 800 \mu\text{g/ml}$, palyginti su kontrole; nuo $\geq 80\text{--}200 \mu\text{g/ml}$, nuo $\geq 400\text{--}600 \mu\text{g/ml}$ ir tarp $400 \mu\text{g/ml}$ ir $800 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijų, lyginant tarp fermentinių reakcijų mišinių. Tačiau fermento aktyvumo sumažėjimo pokytis statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$) tarp fermentinių reakcijų mišinių didinant ekstrakto koncentracijas: nuo $\geq 200 \mu\text{g/ml}$ iki $< 400 \mu\text{g/ml}$ ir nuo $\geq 600 \mu\text{g/ml}$ iki $< 800 \mu\text{g/ml}$.

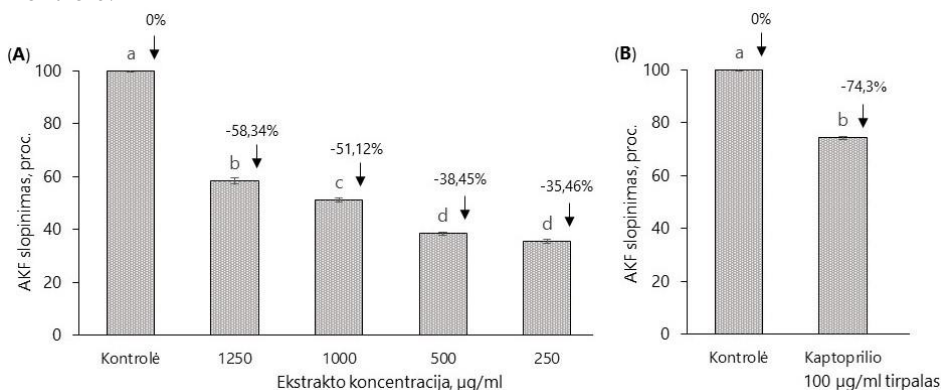
3.2.3. Angiotenziną konvertuojančio fermento aktyvumo nustatymas *in vitro*

Angiotenziną konvertuojantis fermentas (EC 3.4.15.1) yra glikoproteininis fermentas, daugiausia gaminamas inkstų epitelinėse ląstelėse. Angiotenziną I-konvertuojančio fermento molekulė sudaryta iš dviejų homologinių domenų (N ir C domenai), kiekviename turinti aktyvų centrą [184]. Įrodyta, kad vaistai, skirti angiotenzino konvertuojančio fermento aktyvumui slopinti, jungiasi prie Zn^{2+} jono, esančio AKF fermento aktyviame centre [184, 185]. Tam, kad gamtiniai junginiai ir jų turintys augaliniai ruošiniai galėtų slopinti fermentą, jie taip pat turi jungtis prie AKF molekulės aktyvaus centro. Tačiau tokia sąveika su jonine vieta priklauso nuo gamtinių junginių slopinamųjų savybių ir jų buvimo įvairiose augalo dalyse.

Atsižvelgiant į tai, kokie aptikti junginiai dominavo *Dioscorea* spp., *Astragalus* spp. rūšyse (**3 skyr. 3.1, 3.2, 3.3 lent.**), tolimesniuose tyrimuose spektrofotometriniu metodu buvo įvertintas ekstraktų poveikis AKF aktyvumui [142, 143, 146]. Kaip teigiama kontrolė pasirinktas vaistinis preparatas kaptoprilis, kuris paruoštas kaip 1mg/ml tirpalas distiliuotame vandenyje [148].

3.2.3.1. Kaukazinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio AKF fermentui įvertinimas

Tiriant kaukazinės dioskorėjos etanolinių ekstraktų ($250\text{--}1250 \mu\text{g/ml}$) slopinimo gebą AKF fermentui (**3.12 pav.**) matomas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) visose sumodeliuotose fermentinės reakcijos sistemose, palyginti su kontrole.

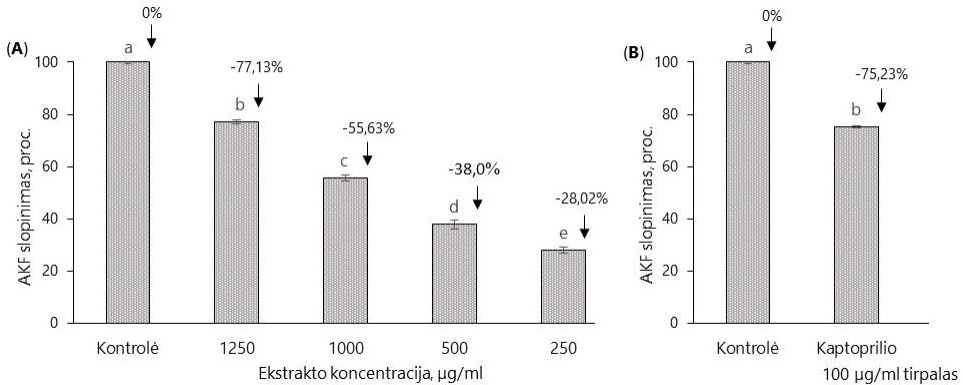


3.12 pav. Kaukazinės dioskorėjos (*D. caucasica*) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AKF aktyvumui (A) ir kaptoprilio vandeninio tirpalo poveikis AKF aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose *in vitro* (B)

Reikšmingas skirtumas tarp sumodeliuotų fermentinių reakcijų sistemų pagal Fišerio LSD testą ($p < 0,05$) po vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA pažymėtas skirtingomis raidėmis virš stulpelių. Ekstrakto slopinimo geba pažymėta neigiamu ženklu procentine išraiška virš stulpelių, fermento-substrato mišinys be inhibitoriaus pažymėtas 0 proc. virš stulpelio. Pateiktos vidutinės trijų matavimų \pm standartinės paklaidos (angl. *standard error mean*, SE).

Didinant ekstraktų koncentracijas, atitinkamai mažėjo fermento aktyvumas: $< 250 \mu\text{g/ml}$: $35,46 \pm 0,76$ proc.; $500 \mu\text{g/ml}$: $38,45 \pm 0,52$ proc.; $1000 \mu\text{g/ml}$: $51,12 \pm 0,81$ proc.; $> 1250 \mu\text{g/ml}$: $58,34 \pm 1,01$ proc. atitinkamai mažėjo fermento aktyvumas, palyginti su kontrole. Tačiau lyginant AKF aktyvumo pokytį tarp fermentinių reakcijų mišinių, turinčių skirtingas ekstrakto koncentracijas, fermento aktyvumas statistiškai reikšmingai sumažėjo nuo $\geq 38,45 \pm 0,52$ proc. iki $< 58,34 \pm 1,01$ proc., didinant ekstrakto koncentraciją atitinkamai nuo $\geq 500 \mu\text{g/ml}$ iki $< 1250 \mu\text{g/ml}$. Reakcijos mišinius veikiant 250 ir $500 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijomis, statistiškai reikšmingo AKF aktyvumo mažėjimo skirtumo nebuvo.

3.2.3.2. Niponinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio AKF fermentui įvertinimas



3.13 pav. Niponinės dioskorėjos (*D. nipponica*) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AKF aktyvumui (A) ir kaptoprilio vandeninio tirpalo poveikis AKF aktyvumui (B) fermentinės reakcijos sistemose *in vitro*

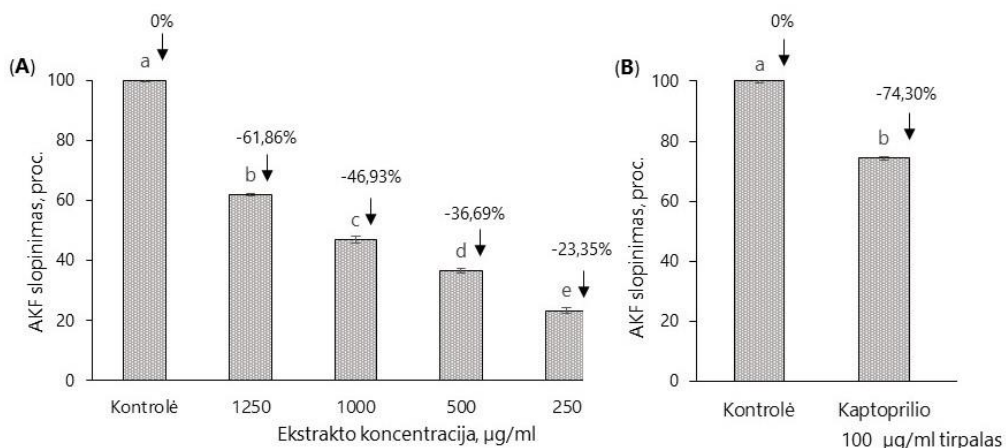
Reikšmingas skirtumas tarp sumodeliuotų fermentinių reakcijų sistemų pagal Fišerio LSD testą ($p < 0,05$) po vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA pažymėtas skirtingomis raidėmis virš stulpelių. Ekstrakto slopinimo geba pažymėta neigiamu ženklu procentine išraiška virš stulpelių, fermento-substrato mišinys be inhibitoriaus pažymėtas 0 proc. virš stulpelių. Pateiktos vidutinės trijų matavimų \pm standartinės paklaidos (angl. *standard error mean*, SE).

Diagramoje aukščiau (3.13 pav.) matomas nuo didėjančios ekstrakto koncentracijos priklausomas AKF aktyvumo sumažėjimas visuose sumodeliuotuose fermentinės reakcijos mišiniuose. Gauti rezultatai parodė, kad, didinant ekstraktų koncentracijas: $< 250 \mu\text{g/ml}$: $28,02 \pm 1,17$ proc.; $500 \mu\text{g/ml}$: $38,0 \pm 1,74$ proc.; $1000 \mu\text{g/ml}$: $55,63 \pm 1,3$ proc.; $> 1250 \mu\text{g/ml}$: $77,13 \pm 0,78$ proc., atitinkamai mažėjo fermento aktyvumas. AKF aktyvumo sumažėjimo pokytis statistiškai reikšmingai

skyrėsi ($p < 0,05$), palyginti su kontrole, ir tarp fermentinių reakcijų mišinių didinant ekstrakto koncentraciją: nuo $\geq 250 \mu\text{g/ml}$ iki $< 1250 \mu\text{g/ml}$.

Yra įrodyta, kad kvercetino dariniai, taninai, peptidai geba slopinti AKF aktyvumą [126, 128, 46]. Atsižvelgiant į tai, kad šių klasių junginių aptikta augaliniuose ruošiniuose, galima daryti išvadą, kad būtent jie turėjo įtakos AKF aktyvumo sumažėjimui *in vitro*.

3.2.3.3. Saldžialapės kulkšnės ekstraktų slopinamojo poveikio AKF fermentui įvertinimas



3.14 pav. Saldžialapės kulkšnės (*A. glycyphyllos* L.) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AKF aktyvumui (A) ir kaptoprilio vandeninio tirpalo poveikis AKF aktyvumui (B) fermentinės reakcijos sistemose *in vitro*

Reikšmingas skirtumas tarp sumodeliuotų fermentinių reakcijų sistemų pagal Fišerio LSD testą ($p < 0,05$) po vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA pažymėtas skirtingomis raidėmis virš stulpelių.

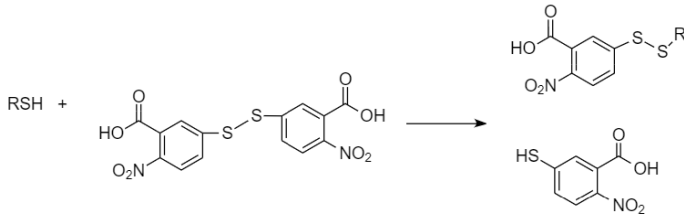
Ekstrakto slopinimo geba pažymėta neigiamu ženklų procentine išraiška virš stulpelių, fermento-substrato mišinys be inhibitoriaus pažymėtas 0 proc. virš stulpelio. Pateiktos vidutinės trijų matavimų \pm standartinės paklaidos (angl. *standard error mean*, SE).

Diagramoje aukščiau (3.14 pav.) matomas nuo didėjančios ekstrakto koncentracijos priklausomas AKF aktyvumas visuose sumodeliuotuose fermentinės reakcijos mišiniuose. Gauti rezultatai parodė, kad, didinant ekstraktų koncentracijas: $< 250 \mu\text{g/ml}$: $23,35 \pm 0,35$ proc.; $500 \mu\text{g/ml}$: $36,69 \pm 1,18$ proc.; $1000 \mu\text{g/ml}$: $46,93 \pm 0,72$; $> 1250 \mu\text{g/ml}$: $61,86 \pm 1,08$ proc., atitinkamai mažėjo fermento aktyvumas. Fermento aktyvumas, sumodeliuotose fermentinės reakcijos sistemose statistiškai reikšmingai skyrėsi (3.14 pav., (A)), kai ekstrakto koncentracijos $\geq 250 \mu\text{g/ml}$ iki $< 1250 \mu\text{g/ml}$, palyginti su kontrole, ir lyginant tarpusavyje.

3.2.4. Acetilcholinesterazės aktyvumo nustatymas *in vitro*

Acetilcholinesterazė (EC 3.1.1.7) yra polimerinis glikoproteinis fermentas, daugiausia gaminamas periferinėse ir centrinėse ryšio vietose.

Yra žinoma, kad acetilcholinesterazė (EC 3.1.1.7) katalizuoja acetiltiocholino vartimą tiocholinu (SCh) fermentinės hidrolizės metu. Norint nustatyti augalinių ekstraktų slopinimo gebą, AChE fermentui buvo pritaikytas Elmano metodas [139]. Reakcijos metu išsiskyręs tiocholinis (SCh) reaguoja su Elmano reagentu (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoinė rūgštis)), ir taip susidaro geltonos spalvos chromoforas (2-nitro-5-tiobenzoinė rūgštis; $C_7H_5NO_4S$) (**3.15 pav.**), kurio kiekis nustatomas matuojant tirpalo šviesos sugertį esant $\lambda = 412$ nm bangos ilgiui [139].



3.15 pav. Chromoforo susidarymas reaguojant su Elmano reagentu

3.2.4.1. Kaukazinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio AChE fermentui įvertinimas

Norint iširti galimą *D. caucasica* lapų ekstraktų slopinamąjį poveikį AChE katalizei, sausi kaukazių dioskorėjų lapų milteliai buvo tirpinami etanolyje (70 proc., C_2H_5OH). Veikiant inhibitoriams (25–100 $\mu g/ml$) visi fermentinės reakcijos mišiniai pasižymėjo AChE aktyvumo sumažėjimu. Gauti rezultatai parodyti **3.10 lentelėje**. Galima pastebėti, kad 25 $\mu g/ml$ koncentracijos slopiklis nedaug (>30 proc.) tačiau statistiškai reikšmingai sumažino fermento aktyvumą, palyginti su kontrole. Didinant slopiklio koncentraciją iki 40 $\mu g/ml$, buvo pasiektas fermento aktyvumo sumažėjimas 40,58 proc., palyginti su kontrole. Tačiau, didinant slopiklio koncentraciją nuo ≥ 50 $\mu g/ml$ iki < 100 $\mu g/ml$, buvo pasiektas atitinkamai nedidelis AChE aktyvumo sumažėjimas $\geq 43,48$ iki $< 45,85$ proc., palyginti su kontrole. Pažymėtina, kad, didinant ekstrakto koncentraciją nuo ≥ 80 $\mu g/ml$ iki < 100 $\mu g/ml$, fermento aktyvumas nekito ir svyravo atitinkamai nuo 45,31 iki 45,85 proc. Todėl galima daryti išvadą, kad didžiausias fermento aktyvumo sumažėjimas pasiektas esant 80 $\mu g/ml$ ekstrakto koncentracijai.

Kaukazinės dioskorėjos lapų ekstraktų slopinamasis poveikis AChE fermentui buvo lyginamas su 16 $\mu g/ml$ koncentracijos donepezilio hidrochlorido tirpalu. Teigiama kontrolė rodė stipresnę inhibiciją AChE (> 50 proc.) nei *D. caucasica* lapų ekstraktai.

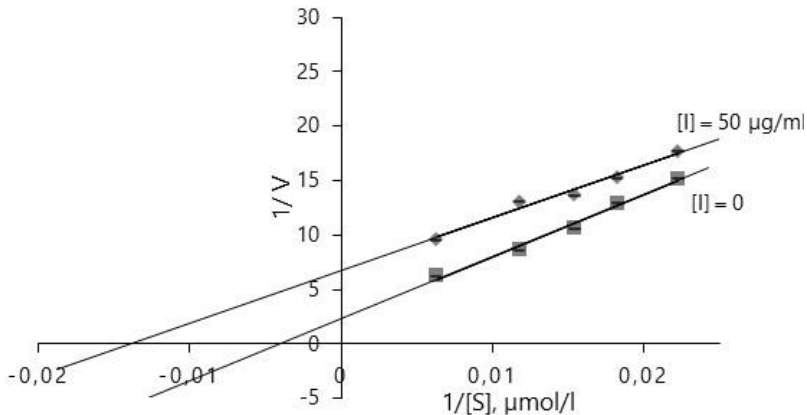
3.10 lentelė. Kaukazinės dioskorėjos (*D. caucasica* Lipsky) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AChE aktyvumui

[I], µg/ml	Specifinis aktyvumas, µM/min/mg baltymo	AChE inhibavimas, proc.
25	0,1 ± 0,002 ^b	27,55
40	0,082 ± 0,002 ^c	40,58
50	0,078 ± 0,002 ^d	43,48
80	0,076 ± 0,002 ^e	45,31
100	0,074 ± 0,002 ^e	45,85
Kontrolė	0,138 ± 0,001 ^a	-

Duomenys pateikti kaip vidurkiai ± SE. Reikšmingas skirtumas tarp sumodeliuotų fermentinių reakcijų sistemų pagal Fišerio LSD testą ($p < 0,05$) po vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA pažymėtas skirtingomis raidėmis.

3.2.4.1.1. Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas

Kinetikos tyrimai buvo atlikti stebint fermento aktyvumą esant skirtingoms acetilcholino jodido koncentracijoms nuo 45 iki 160 µmol/l. Pagal Lainuiverio ir Berko tiesių grafiką, reakcijos greičio pokytis $1/V$ versus $1/[ATChI]$, išreikštas tokiomis lygtimis: (1) reakcijos mišinio sudėtis be slopiklio: $y = 569,49 + 2,3524x$, $r^2 = 0,9874$; (2) pridėdant 50 µg/ml koncentracijos lapų etanolinio ekstrakto / slopiklio: $y = 483,75 + 6,7466x$, $r^2 = 0,9755$.



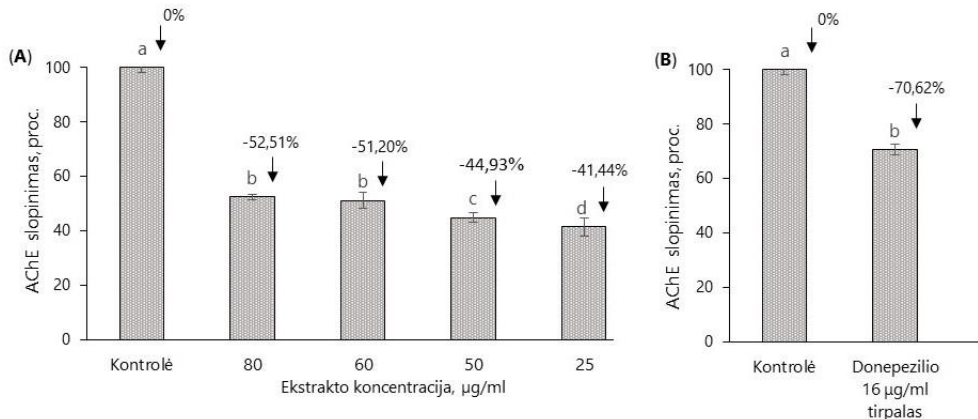
3.16 pav. Kaukazinės dioskorėjos (*D. caucasica* Lipsky) lapų ekstrakto sukeltas tariamasis bekonkurencinis slopinamasis poveikis AChE fermentui

Lainuiverio ir Berko tiesių grafiko matematinis modelis, sudarytas pagal skirtingas ATChI koncentracijas (45–160 µmol/l ATChI). ■¹, fermento ir substrato sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. ♦², fermento, substrato ir inhibitoriaus (50µg/ml) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės ± SN.

D. caucasica lapų ekstraktas pasižymėjo tariamuoju bekonkurenciniu slopinamuoju poveikiu AChE (**3.16 pav.**) fermentui. Pagal Lainuiverio ir Berko tiesių grafiką, fermentinės reakcijos sistemoje be slopiklio V_{max} , K_m vertės buvo atitinkamai $0,425 \pm 0,11 \mu\text{M}/\text{mg}$ baltymo/min. ir $242,08 \pm 15,76 \mu\text{mol}/\text{l}$, o fermentinės reakcijos sistemoje su $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ koncentracijos slopikliu $V_{max(app)}$, $K_m(app)$ vertės buvo daug mažesnės, atitinkamai $0,148 \pm 0,015 \mu\text{M}/\text{min.}/\text{mg}$ baltymo ir $71,56 \pm 6,55 \mu\text{mol}/\text{l}$. Šis slopinimo modelis rodo, kad inhibitorius jungiasi tik su fermento ir substrato kompleksu [150]. *D. caucasica* ekstrakto slopinamasis poveikis AChE fermentui buvo lyginamas su donepezilio hidrochlorido vandeniniu tirpalu. Teigiamo kontrolė fermento aktyvumą sumažino $\sim 70,62 \pm 2$ proc. esant $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ koncentracijai.

3.2.4.2. Niponinės dioskorėjos ekstraktų slopinamojo poveikio AChE fermentui įvertinimas

Atsižvelgiant į nustatytus junginius kaukazinės dioskorėjos ekstraktuose ir gautą slopinimo gebą, AChE aktyvumo nustatymo tyrimams pasirinktos slopiklio koncentracijos nuo $\geq 25 \mu\text{g}/\text{ml}$ iki $80 \mu\text{g}/\text{ml}$.



3.17 pav. Niponinės dioskorėjos (*D. nipponica*) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AChE aktyvumui (A) ir donepezilio hidrochlorido vandeninio tirpalo poveikis AChE aktyvumui fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro* (B)

Reikšmingas skirtumas tarp sumodeliuotų fermentinių reakcijų sistemų pagal Fišerio LSD testą ($p < 0,05$) po vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA pažymėtas skirtingomis raidėmis virš stulpelių. Ekstrakto slopinimo geba pažymėta neigiamu ženklu procentine išraiška virš stulpelių, fermento-substrato mišinys be inhibitoriaus pažymėtas 0 proc. virš stulpelių. Pateiktos vidutinės trijų matavimų \pm standartinės paklaidos (angl. *standard error mean*, SE).

Kaip matyti **3.17 pav.**, fermentinės sistemos reakcijos mišinius veikiant skirtingų koncentracijų slopikliams, galima reguliuoti fermentinės reakcijos eigą. Didinant ekstrakto koncentracijas atitinkamai mažėjo fermento aktyvumas: $< 25 \mu\text{g}/\text{ml}$: $41,44 \pm 3,2$ proc.; $50 \mu\text{g}/\text{ml}$: $44,93 \pm 1,9$ proc.; $> 60 \mu\text{g}/\text{ml}$: $51,20 \pm 2,9$ proc., palyginti su kontrole, ir lyginant tarp reakcijos sistemų. Tačiau didinant ekstrakto koncentraciją iki $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ fermento sumažėjimo pokytis nuo prieš tai buvusios $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ ekstrakto koncentracijos statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$), ir

nustatytas $52,51 \pm 0,9$ proc. fermento aktyvumo sumažėjimas. Kartu suprantama, kad ir specifinis fermento aktyvumas nuosekliai mažėjo tokia seka: $25 \mu\text{g/ml}$: $0,078 \pm 0,019 \mu\text{mol/mg baltymo/min.}$ $>50 \mu\text{g/ml}$: $0,074 \pm 0,023 \mu\text{mol/mg baltymo/min.}$ $> 60 \mu\text{g/ml}$: $0,066 \pm 0,044 \mu\text{mol/mg protein/min}$ $> 80 \mu\text{g/ml}$: $0,064 \pm 0,014 \mu\text{mol/mg protein/min.}$ Enzimologiniu požiūriu, fermentinės reakcijos sistema palaipsniui įsisotino slopiklį, gebantį sumažinti fermento aktyvumą.

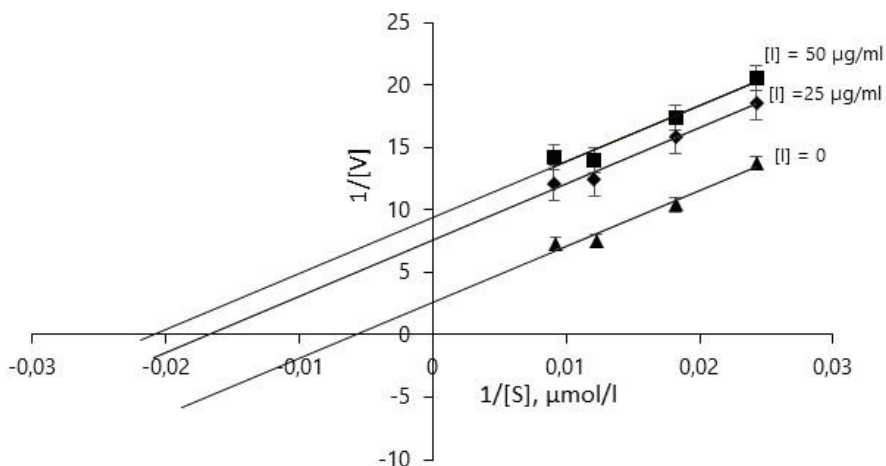
D. nipponica skirtingų koncentracijų lapų ekstraktas slopino AChE aktyvumą silpniau nei donepezilio hidroklorido $16 \mu\text{g/ml}$ vandeninis tirpalas. Pastarasis fermento aktyvumą sumažino $\sim 70,62 \pm 2,0$ proc. Iš šių duomenų galime daryti išvadą, kad *D. nipponica* lapų ekstraktas turėjo inhibicinį poveikį AChE fermentui, bet daug mažesnę nei donepezilio hidroklorido vandeninis tirpalas.

Atsižvelgiant į tirtų dioskorėjų lapų ekstraktų gebą slopinti fermentą pastebėta, kad *D. nipponica* lapų ekstrakto sukeltas slopinimas buvo nedaug pranašesnis nei *D. caucasica* lapų ekstrakto. Nors literatūroje labiau atkreipiamas dėmesys į alkaloidų klasei priklausančius junginius, gebančius sumažinti AChE aktyvumą, tačiau įrodyta, kad ekstraktų sudėtyje aptikti junginiai galėjo daryti įtaką fermento aktyvumo sumažėjimui. Šis darbas parodo, kad dioskorėjų lapuose vyraujantys junginiai vis dar neatrasti ar pakankamai neištirti ir galintys sumažinti AChE aktyvumą.

Duomenų apie dioskorėjos rūšių ir jų augalinių ruošinių slopinamojo poveikio AChE fermentui savybes nepavyko rasti. Tačiau Tenfen ir kt. (2019) [186] metais atliktame tyrime buvo nustatyta, kad *Eugenia* genties lapų ekstraktų slopinamasis poveikis AChE buvo susijęs su izokvercitrino, kvercetino, katechino, epikatechino ir miricitrino junginiais ir jų kiekiais. Keletas šių junginių buvo taip pat nustatyta kaukazinės ir niponinės dioskorėjos lapų ekstraktuose, todėl galima daryti išvadą, kad šie junginiai, esantys ekstrakto sudėtyje, turėjo reikšmingą įtaką fermento aktyvumo mažinimui.

3.2.4.2.1. Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas

AChE slopinimo reakcijos kinetika buvo modeliuojama esant substrato koncentracijos diapazonui nuo $41,25$ iki $110 \mu\text{mol/l}$. Pagal Lainuiverio ir Berko grafiką, reakcijos greičio pokytis $1/V$ versus $1/[\text{ATChI}]$, išreikštas tokiomis lygtimis: (1) reakcijos mišinio sudėtis be slopiklio: $y = 447,92x + 2,577$, $r^2 = 0,9671$; (2) pridėdant $25 \mu\text{g/ml}$ koncentracijos lapų etanolinio ekstrakto / slopiklio: $y = 451,863 + 7,5815$, $r^2 = 0,97955$; pridėdant $50 \mu\text{g/ml}$ koncentracijos lapų etanolinio ekstrakto/slopiklio: $y = 447,02 + 9,4292$, $r^2 = 0,9541$.



3.18 pav. Niponinės dioskorėjos (*D. nipponica* Makino) lapų ekstrakto sukeltas tariamasis bekonkurencinis slopinamasis poveikis AChE fermentui

Lainuiverio-Berko tiesių grafiko matematinis modelis, sudarytas pagal skirtingas ATChI koncentracijas (41,25 – 110 µmol/l ATChI). ▲¹, fermento ir substrato sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. ♦², fermento, substrato ir inhibitoriaus (25µg/ml) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. ■³, fermento, substrato ir inhibitoriaus (50 µg/ml) sąveika modelinėje fermentinės reakcijos sistemoje *in vitro*. Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės ± SN.

$V_{max(app)}$ vertė padidinus ekstrakto koncentraciją nuo 25 iki 50 µg/ml sumažėjo nuo $0,132 \pm 0,01$ iki $0,106 \pm 0,01$ µmol/mg baltymo/min. $K_{m(app)}$ reikšmė taip pat sumažėjo nuo $59,60 \pm 0,06$ iki $47,407$ µmol/l (**3.11 lent.**). Tai rodo, kad slopiklis gali prisijungti tik prie fermento ir substrato komplekso [150, 187]. Tokį elgesį galima paaikškinti *Le Chatlier's* principu, teigiančiu, kad dėl slopiklio poveikio pusiausvyrą pasislenka, kad susidarytų daugiau fermentų ir substratų kompleksų, ir susidaro mažesnis K_m , o tai rodo didesnę surišimo afinitetą [187].

3.11 lentelė. Kinetinių parametrų analizės įverčiai

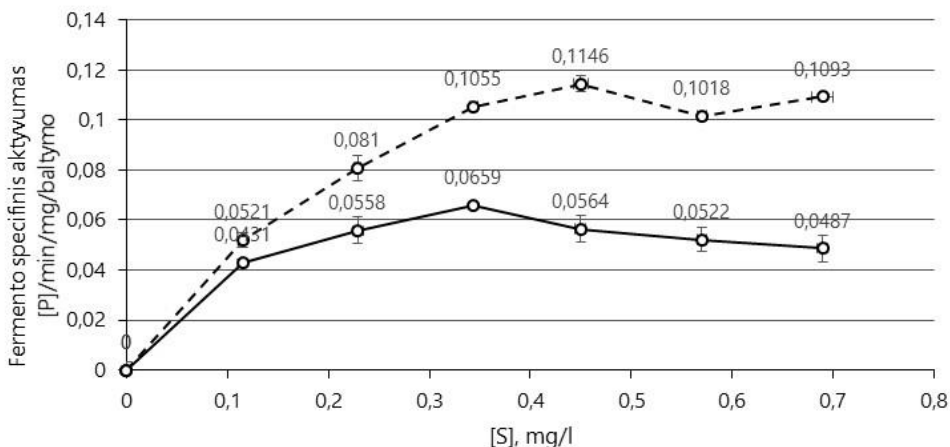
Slopiklio koncentracija, µg/ml	$K_{m(app)}$, µmol/l	$V_{max(app)}$, µmol/mg baltymo/min.	Slopinimo tipas
25	$59,60 \pm 0,063$	$0,132 \pm 0,014$	
50	$47,407 \pm 1,47$	$0,106 \pm 0,013$	Bekonkutencinis
Kontrolė ¹	$173,79 \pm 0,67$	$0,387 \pm 0,17$	

¹ K_m ir V_{max} – fermentinės reakcijos sistema be slopiklio.

² $K_{m(app)}$ ir $V_{max(app)}$ – identiški kinetiniai parametrai, kaip K_m ir V_{max} , tik fermentinės reakcijos sistema su slopikliu. Duomenys pateikti kaip vidurkiai ± SN.

3.2.4.3. Fermentinių reakcijų kinetinis modeliavimas tiriant *A.glycyphyllos* L. lapų ekstrakto slopinamojo poveikio gebą AChE fermentui

Tiriant AChE ir saldžialapės kulkšnės (*A. glycyphyllos* L.) lapų ekstrakto sąveikos modelį, fermentinės reakcijos mišinys su skirtingu substrato koncentracijos lygiu: 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,2 ir 0,24 mM buvo veikiamas 190 µg/ml koncentracijos lapų ekstrakto (3.19 pav.).



3.19 pav. Saldžialapės kulkšnės (*A. glycyphyllos* L.) lapų etanolinio ekstrakto poveikis AChE aktyvumui fermentinės reakcijos sistemose *in vitro*, turinčiose skirtingas substratų koncentracijas (0,12 mM – 0,24 mM). Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės ± SN.

Kaip parodyta 3.19 pav. pav., AChE palaipsniui pasiekė maksimalaus aktyvumo plokštumą esant 0,12 mM – 0,24 mM substrato koncentracijai, kuri palaipsniui mažėjo pridėjus 190 µg/ml *A. glycyphyllos* ekstrakto. Priklausomai nuo ekstrakto, substrato ir fermento sąveikos modelio fermentinės reakcijos sistemoje AChE aktyvumas kito tokia tvarka: $55,41 \pm 0,82$ proc. (0,24 mM substrato) > $48,65 \pm 0,6$ proc. (0,2 mM substrato) > $50,73 \pm 0,73$ proc. (0,16 mM substrato) > $36,1 \pm 0,2$ proc. (0,12 mM substrato) > $31,15 \pm 0,65$ proc. (0,08 mM substrato), $17,24 \pm 0,2$ proc. (0,04 mM substrato). Reakcijos greitis (V_{max}) ir substrato pusės prisotinimo koncentracija (K_m) buvo apskaičiuoti naudojant Michaelio ir Menteno lygtį. Nustatyta, kad kinetinio modeliavimo metu 190 µg/ml saldžialapės kulkšnės (*A. glycyphyllos* L.) lapų ekstraktas statistiškai reikšmingai sumažino $V_{max(app)}$ ir $K_{m(app)}$ reikšmes ($0,0589 \pm 0,001$ µmol/mg baltymo/min ir $0,009470 \pm 0,003$ µmol/l), palyginti su V_{max} ir K_m vertėmis, kai nebuvo ekstrakto ($0,1436 \pm 0,001$ µmol/mg baltymo/min ir $0,05817 \pm 0,002$ µmol/l). Mažėjančios $V_{max(app)}$, $K_{m(app)}$ reikšmės rodo bekonkurencinio slopinimo tipą, o tai reiškia, kad inhibitorius / ekstraktas gali jungtis tik su fermento substrato (ES) kompleksu [150, 187].

Optimalus hidrolizės metu naudojamo fermento ir substrato sąveikos modelis, po to – fermento, substrato ir ekstrakto sąveikos modelis parodė, kad 0,16 mM substrato koncentracijos užteko 50 proc. inhibicijai pasiekti. Be optimalių saveikų, verta paminėti, kad tarp fermentinės sistemos ir cheminių junginių vyksmo vyrauja

nuolatinis ryšys. Todėl ekstraktas ir jo sudėtyje esantys junginiai taip pat turėjo įtakos tokiai inhibicijai pasiekti.

Biologinio aktyvumo tyrimų rezultatai patvirtino mokslinėje literatūroje paskelbtus duomenis [69, 70, 121], kad augaliniai ruošiniai, pagaminti iš daugelio *Astragalus* genties augalų rūšių, geba slopinti AChE fermentą. Ar saldžialapės kulkšnės augaliniai ruošiniai geba slopinti AChE fermentą, duomenų rasti nepavyko. Ankstesniuose tyrimuose tirti įvairių *Astragalus* genties rūšių *A. leporinus*, *A. distinctissimus*, *Astragalus neurocarpus* Bioss. žolės / šaknų ekstraktai pasižymėjo veiksmingumu slopinant AChE fermentą [121]. Suprantama, kad rezultatų negalima palyginti su gautais skirtingų *Astragalus* genties augalų rūšių ekstraktų slopinimo gebos rezultatais, tačiau, analizuojant *A. glycyphyllos* etanolinių ekstraktų gautus rezultatus, galima pastebėti, kad panašius rezultatus gavo Turkijos mokslininkai Sekeroglu ir Gezici (2019) [121]. Tyrimų *in vitro* duomenimis, *Astragalus neurocarpus* Bioss. antžeminės augalo dalies etanolinis ekstraktas esant $800 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ koncentracijai slopino AChE aktyvumą $68,14 \pm 0,03$ proc. [121].

Rezultatų skyriaus apibendrinimas. Biologinio aktyvumo tyrimų rezultatai patvirtino mokslinėje literatūroje paskelbtus duomenis [69,70,121], kad augaliniai ruošiniai, pagaminti iš daugelio *Astragalus* L. ir *Dioscorea* L. genties augalų rūšių, geba slopinti fiziologiškai svarbius fermentus. Tokią pačią tendenciją atskleidė ir šiame disertacinio tyrimo skyriuje tirta niponininių ir kaukaziųjų dioskorėjų (*Dioscorea nipponica* Makino et *Dioscorea caucasica* Lipsky) ekstraktų iš lapų ir šakniastiebių ir saldžialapės kulkšnės (*Astragalus glycyphyllos* L.) ekstrakto iš lapų inhibicinė geba. Įvertinus inhibicines savybes nustatyta, kad ekstraktai mažina hidrolaziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų aktyvumą modelinėse *in vitro* fermentinėse sistemose priklausomai nuo pasirinktos koncentracijos. Visų tirtų dioskorėjų lapų ekstraktų slopinimo geba fermentams kito tokiais intervalais: slopinamasis poveikis α -GLU fermentui nuo $6,72 \pm 1,41$ proc. iki $78,49 \pm 1,52$ proc.; ir jų šakniastiebių ekstraktų slopinamasis poveikis nuo $36,79 \pm 2,93$ proc. iki $40,79 \pm 2,71$ proc., slopinamasis poveikis α -amilazės fermentui nuo $11,9 \pm 0,9$ proc. iki $71,6 \pm 1,0$ proc., AKF fermentui nuo $28,02 \pm 1,17$ proc. iki $77,13 \pm 0,78$ proc., AChE nuo $27,55 \pm 0,39$ proc. iki $54,33 \pm 0,7$ proc.. Saldžialapės kulkšnes lapų ekstrakto slopinamojo poveikio fermentams geba kito tokiais intervalais: α -GLU fermentui nuo $29,12 \pm 0,18$ proc. iki $71,72 \pm 0,48$ proc.; α -amilazės fermentui nuo $31,56 \pm 0,18$ proc. iki $71,72 \pm 0,48$ proc.; AKF fermentui nuo $23,35 \pm 0,35$ proc. iki $61,86 \pm 1,08$ proc.; AChE fermentui nuo $17,24 \pm 0,2$ proc. iki $55,41 \pm 0,82$ proc.

Lyginant α -GLU aktyvumo sumažėjimo pokyčius tarp ekstraktų, išskirtų iš *Dioscorea* spp. lapų ir šakniastiebių, išryškėjo slopinimo gebos skirtumai. Daug mažesnės lapų ekstraktų koncentracijos stipriau slopino α -gliukozidazės aktyvumą nei didesnės šaknų ekstraktų koncentracijos. Tai įrodo, kad inhibicinė geba priklauso nuo ekstraktų kokybinės ir kiekybinės sudėties. Ekstraktų iš *Dioscorea* spp. lapų ir šakniastiebių kiekinės sudėties skirtumai ir su šiais skirtumais susiję slopinimo skirtumai įrodo, kad šie ekstraktai dėl juose esančių skirtingų junginių sudėties ir kiekio skirtingai slopino fermentą. Pagrindinis skirtumas tarp junginių sudėties

lapuose ir šakniastiebiuose – flavonoidų, *O*-kvercetino glikozido formų gausa, kurių lapų ekstraktų sudėtyje nustatyta didelė įvairovė, o šakniastiebių ekstraktų sudėtyje jie nepatikti. Skirtumas tarp kiekinės sudėties – hidroksicinamono rūgščių sukaupti daug didesni kiekiai lapų ekstraktuose nei šakniastiebių ekstraktuose. Niponinės dioskorėjos lapų ekstrakto neochlorogeno rūgšties kiekis, palyginti su šakniastiebių ekstraktais, atitinkamai 72,828 ir 0,181 µg/ml, chlorogeno – 323,425 ir 1,107 µg/ml. Kaukazinės dioskorėjos lapų ekstrakto neochlorogeno rūgšties kiekis, palyginti su šakniastiebių ekstraktais, atitinkamai 5,887 ir 0,687 µg/ml, chlorogeno – 116,57 ir 1,869 µg/ml.

Lyginant α -GLU aktyvumo sumažėjimo pokyčius tarp dviejų tyrime taikytų metodų atvejų išryškėjo itin statistiškai reikšmingas vidutinis procentinis fermento aktyvumo sumažėjimo skirtumas. Nors gausus tyrimų, įvertinančių α -gliukozidazės aktyvumą *in vitro* veikiant gamtiniais inhibitoriais, skaičius, tačiau, kas galėjo nulemti skirtingą atsaką į slopinimą, tikslų paaiškinimų mokslinėje literatūroje nepavyko rasti.

Norint tiksliau išsiaiškinti ekstraktų tariamąjį slopinimo tipą, atlikti kinetiniai matavimai. Nustatyta, kad *Dioscorea* spp. *caucasica*, *nipponica* lapų ir *Dioscorea nipponica* šakniastiebių ekstraktams būdingas mišrus slopinamojo poveikio α -gliukozidazės fermentui tipas, *Dioscorea caucasica* šakniastiebių ekstraktui – konkurencinis slopinamojo poveikio α -gliukozidazės fermentui tipas, o *Astragalus glycyphyllos* L. lapų ekstraktui bekonkurencinis slopinamojo poveikio α -gliukozidazės fermentui tipas. Visų tirtų augalų rūšių lapų ekstraktams būdingas bekonkurencinis slopinamojo poveikio acetilcholinestrazės fermentui tipas.

IŠVADOS

1. Ištirta *D. nipponica*, *D. caucasica* ekstraktų iš lapų ir šaknų bei *A. glycyphyllos* ekstraktų iš lapų fitocheminė sudėtis ir parodyta, kad:
 - 1.1. *D. nipponica*, *D. caucasica* lapų ekstraktuose dominuoja didelė įvairovė *O*-kvercetino glikozido formų: kvercetin-3-*O*-rutinozidas, kvercetin-3-*O*-gliukozidas, kvercetin-3-*O*-malonilheksozidas, kvercetin-3-*O*-acetilheksozidas, kvercetin-3-*O*-malonilramnozidas ir kvercetin-3-*O*-acetilramnozidas.
 - 1.2. *Dioscorea* spp. lapų ekstraktuose dominuoja hidroksicinamono rūgštys ir jų izomerai bei hidroksiriebalų rūgštys.
 - 1.3. Tiek *Dioscorea* spp. šakniastiebių, tiek *Dioscorea* spp. lapų ekstraktuose nustatyti steroidiniai saponinai ir jų izomerai.
 - 1.4. Didesni hidroksicinamono rūgščių ir jų izomerų kiekiai nustatyti niponinės dioskorėjos lapų ekstraktuose, o kvercetin-3-*O*-gliukozido nustatytas kiekis abiejų rūšių lapų ekstraktuose panašus.
 - 1.5. *D. nipponica*, *caucasica* spp. šaknų ekstraktuose nustatytas mažiausias chlorogeno rūgšties ir neochlorogeno rūgšties kiekis.
 - 1.6. Saldžialapės kulkšnės, *A. glycyphyllos* L., lapų ekstraktoje nustatytos gintaro, azelaino rūgštys; kumaroilchino, feruloilchino rūgštys bei cikloartano tipo izomerai.
 - 1.7. Saldžialapės kulkšnės, *A. glycyphyllos* L., lapų ekstraktoje pirmą kartą nustatytas uridinas, *D. caucasica*, *nipponica* šakniastiebių ekstraktuose – hidroksidodekanoilkarnitinas, lapų ekstraktuose – kvercetin-3-*O*-malonilheksozidas, kvercetin-3-*O*-acetilheksozidas, kvercetin-3-*O*-malonilramnozidas ir kvercetin-3-*O*-acetilramnozidas.
2. Taikytinomis metodikomis parinktas tinkamas fermento / substrato / slopiklio sąveikos modelis ir ištirtos ekstraktų slopinimo gebos savybės. Taikytas matematinis fermentinės reakcijos sistemos modeliavimas tinkamas Lainuiverio ir Berko tiesių grafikams sudaryti, kinetiniams parametrams nustatyti bei slopinimo tipui įvertinti.
3. Nustatyta ekstraktų inhibicinė geba ir ją įvertinus parodyta, kad inhibicinės gebos savybių slopinant hidrolazės fermentus turi visi ekstraktai. Taikytinomis metodikomis nustatyta, kad:
 - 3.1. Didžiausias α -GLU aktyvumo sumažėjimas pasiektas esant 50 $\mu\text{g/ml}$ ($71,02 \pm 1,69$ proc.) D.N lapų ekstrakto koncentracijai; 100 $\mu\text{g/ml}$ ($78,49 \pm 2,39$ proc.) D.C lapų ekstrakto koncentracijai ir 400 $\mu\text{g/ml}$ ($54,33 \pm 0,7$ proc.) A.G lapų ekstrakto koncentracijai.
 - 3.2. Didžiausias α -amilazės aktyvumo sumažėjimas pasiektas esant 640 $\mu\text{g/ml}$ ($71,6 \pm 1,0$ proc.) D.N lapų ekstrakto koncentracijai, 480 $\mu\text{g/ml}$ ($48,6 \pm 2,2$ proc.) D.C lapų ekstrakto koncentracijai ir 800 $\mu\text{g/ml}$ ($71,72 \pm 0,48$ proc.) A.G lapų ekstrakto koncentracijai.

- 3.3. Didesnė nei 50 proc. inhibicinė geba AKF fermentui pasiekta esant 1000 µg/ml D.C ir D.N lapų ekstraktų koncentracijoms ir 1250 µg/ml A.G lapų ekstrakto koncentracijai.
- 3.4. Didžiausias AChE aktyvumo sumažėjimas pasiektas esant 100 µg/ml (45,85 proc.) D.C lapų ekstrakto koncentracijai ir 80 µg/ml (52,51 ± 0,9 proc) D.N lapų ekstrakto koncentracijai.
- 3.5. Optimalus hidrolizės metu naudojamo fermento ir substrato sąveikos modelis, po to – fermento, substrato ir *A. glycyphyllos* lapų ekstrakto sąveikos modelis parodė, kad 0,16 mM substrato koncentracijos užteko 50 proc. AChE inhibicijai pasiekti.
- 3.6. D.C ir D.N šakniastiebių ekstraktų (500 µg/ml) inhibicinė geba α-gliukozidazės fermentui nesiekė 50 procentų.
4. Nustatytos kinetinių parametrų vertės ir jas įvertinus parodyta, kad:
 - 4.1 *Dioscorea* spp. *caucasica*, *nipponica*, lapų ir *Dioscorea nipponica* šaknų ekstraktamas būdingas mišrus slopinamojo poveikio α-gliukozidazės fermentui tipas, jų K_i vertė atitinkamai 5,35–11,44 µg/ml, 27,23–31,87 µg/ml ir 476,65 µg/ml.
 - 4.2 *D. caucasica* šakniastiebių ekstraktui būdingas konkurencinis slopinamojo poveikio α-gliukozidazės fermentui tipas, jo K_i vertė 165,97–304,32 µg/ml.
 - 4.3 *A. glycyphyllos* lapų ekstraktui būdingas bekonkurencinis slopinamojo poveikio α-gliukozidazės fermentui tipas, jo K_i vertė yra 0,195–0,25 µg/ml.
 - 4.4 Visų tirtų rūšių lapų ekstraktams būdingas bekonkurencinis slopinamojo poveikio acetilcholinesterezės fermentui tipas.
5. Įvertinus *Dioscorea* L., *Astragalus* L. augalinių žaliavų ekstraktų inhibicinės gebos savybes, teoriškai suformuluota prielaida, kad ekstraktų sudėtyje yra gamtinių junginių, gebančių jungtis su hidrolaziniu aktyvumu pasižyminčiais fermentais ir taip mažinti jų aktyvumą. Teoriškai pagrįsta, kad tam įtakos turi:
 - 5.1 Hidroksicinamono rūgštys ir jų izomerai, *O*-kvercetino glikozido formos, nustatytos *D. nipponica*, *D. caucasica* lapų ekstraktuose;
 - 5.2 Peptidai, katechinai, nustatyti *D. nipponica* ekstraktuose;
 - 5.3 Hidroksicinamono rūgštys ir jų izomerai, nustatyti *A. glycyphyllos* lapų ekstraktuose.

4. SUMMARY

4.1. RELEVANCE OF THE RESEARCH

Studies of phytochemical composition and biological properties of medicinal and other plants accumulate more and more scientific information about new and/or existing herbal preparations that can have a positive physiological effect on various functions of the human body. Such scientific information significantly contributes to the development and production of food products of biological value, pharmaceutical products, or ingredients in the production of cosmetic products. Over the past few decades, the antioxidant potential of plants and the phytochemicals that create it have been particularly widely studied, and research on other properties beneficial to health, i.e. inhibition of cancer cell proliferation, antimicrobial, biological, and other activities, has also developed rapidly. Due to these studies, significant data are obtained to prove new health statements, empirical knowledge of traditional medicine is scientifically confirmed, the possibilities of controlling and correcting negative physiological processes and changes in the human body are expanded by applying innovative nutritional solutions.

The importance of controlling the activity of many enzymes has long been proven in medical science. For example, inhibition of certain hydrolase enzymes is recognized to be important in modulating physiological functions in the human body in cases of carbohydrate metabolism disorder, dementia, high blood pressure and some other health problems. It is also acknowledged that the effective use of phytochemicals in medicinal and other plants with inhibitory effects can significantly contribute to the prevention, risk reduction, and complex therapy of these negative physiological functions. In order for such plants to be used purposefully for the prevention of various diseases, it is necessary to obtain data on their phytochemical composition and biological properties through reliable and modern scientific research. Therefore, the complex evaluation of the composition and biological properties of plants is a perspective area of research.

Some species of plants of *Dioscorea* spp. and *Astragalus* spp. are well known to traditional Chinese medicine, whose health benefits have recently been positively evaluated by medical specialists in many western countries. Different anatomical parts of plants of this genus are used in the form of dried herbs, powders, extracts, and other forms for health enhancement, development of food products and food supplements with increased biological value and treatment.

Some plants of the *Astragalus* L. genus are known as valuable sources of polysaccharides, isoflavonoids, and cycloartane-type saponins. As a result, in some countries most of the research is still focused on the identification of new and/or known saponins in rhizomes with roots of *Dioscorea* (lat. *Rhizoma cum radicibus Dioscoreae*), while the overground parts of the plant have been studied much less. Therefore, there is a lack of scientific information about the composition and biological properties of the biologically active compounds of the overground parts of the plant.

After a detailed study and evaluation of the currently available scientific information, it became clear that the plant species of *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea nipponica* Makino have been insufficiently and unsystematically studied, especially their underground parts. These species are most common in tropical and subtropical climate zones but are also found in temperate areas. In Lithuania, these species do not grow but they were introduced into the collection of medicinal plants in the Botanical Garden of Kaunas Vytautas Magnus University quite a long time ago. Moreover, the phytochemical composition, antioxidant and biological properties of *Dioscorea* L. plant species grown in Lithuanian botanical gardens have not been studied so far.

Astragalus glycyphyllos L. is naturally growing and widespread in the temperate regions of Europe and usually grows in wet habitats or meadows. There are more scientific studies compared to the published studies of *Dioscorea nipponica* Makino and *Dioscorea caucasica* Lipsky. The antioxidant properties, phytochemical quantitative composition of different plant parts of the self-growing *Astragalus glycyphyllos* L. plant of the Lithuanian flora have been studied, whereas the biological properties have not been researched.

Based on a detailed review and evaluation of scientific, ethnopharmacological, and other information, the main hypothesis of this dissertation was formulated: the different anatomical parts of the plants *D. caucasica*, *D. nipponica* and *A. glycyphyllos* selected for the research may contain valuable phytochemical compounds that are little researched, which may be characterised by diverse bioactivity, including targeted effects on the activity of physiologically important enzymes – α -amylase, α -glucosidase, angiotensin-converting enzyme, and acetylcholinesterase. Therefore, after carrying out systematic studies of the phytochemical composition and inhibitory properties of the selected plants, it is feasible to expect a wider application of such plants in the creation of new functional food products and nutritional supplements beneficial to health.

The objective of the research is to evaluate the phytochemical composition of the *Dioscorea* and *Astragalus* plants and determine the effect of the extracts isolated from them on physiologically important enzymes with hydrolase activity.

The following tasks were set to achieve the goal of the work:

1. To investigate and evaluate the composition of phytochemical compounds of *Dioscorea nipponica*, *D. caucasica* and *Astragalus glycyphyllos* L. extracts applying methods of chromatography and mass spectrometry.
2. To apply the known *in vitro* enzyme inhibition methods to the assessment of the effect of the studied plant extracts on enzymes.
3. To evaluate the influence of different concentrations of plant extracts on the activity of α -glucosidase, α -amylase, angiotensin-converting enzyme, and acetylcholinesterase.
4. To determine the kinetic parameters of α -glucosidase and acetylcholinesterase inhibition by evaluating the interactions between the

substrate and the inhibitor in model enzyme reaction systems *in vitro* and determine the supposed inhibition type of the extracts for these enzymes.

5. To theoretically substantiate the possible relationships between the bioactive compounds in the extracts and the inhibitory effect of enzymes.

Novelty of the scientific work

1. In this work, systematic studies of the phytochemical composition of different anatomical parts of *D. nipponica* Makino and *D. caucasica* Lipsky plants were carried out by the methods of ultra-efficient liquid chromatography (UPLC) and hybrid high-resolution mass spectrometry (UPLC-QTOF MS/MS) for the first time; the obtained information significantly contributes to the available knowledge about derivatives of different *O*-quercetin glycoside forms, hydroxycinnamic acids (3-*O*-caffeoylquinic, 5-*O*-caffeoylquinic, 4-*O*-caffeoylquinic, caffeoylthreonic, coumaroylquinic, caffeoylshikim, feruloylquinic), and hydroxy fatty acids. Some quercetin derivatives and isomers of hydroxycinnamic acids were detected for the first time in *D. nipponica* and *D. caucasica* leaf extracts. For the first time, piscidic acid was detected in the rhizomes of the *D. caucasica*, hydroxydodecanoylcarnitine was found in the rhizomes of both *Dioscoreae*, uridin detected in the leaf of the *A. glycyphyllos* L.
2. In this paper, studies on the effects of ethanolic extracts of leaves and rhizomes of *D. nipponica*, *D. caucasica* and leaves of *A. glycyphyllos* on physiologically important enzymes (α -amylase, α -glucosidase, angiotensin-converting enzyme and acetylcholinesterase) were performed for the first time.
3. In this work, applying kinetics model systems of extracts, substrates and enzymes reaction, the inhibition type of extracts for α -glucosidase and acetylcholinesterase enzymes were determined for the first time.
4. Theoretically formulated assumptions about possible relationships between *Dioscorea* spp. differences in the phytochemical composition of leaf and root extracts and their related α -glucosidase inhibitory ability.
5. Systematic studies of phytochemical composition of plants and inhibitory properties of extracts expand scientific knowledge about these plants significantly.

Practical value of the work

The obtained data on the phytochemical composition and inhibitory properties of *D. caucasica*, *D. nipponica* and *A. glycyphyllos* extracts provide important information that is needed for the development of new functional preparations from these plants and the justification of their possible physiological effects. Such preparations as extracts from different anatomical parts and their fractions could be applied to the creation of new food supplements and new functional food products with increased nutritional value. In addition, the received data can serve to predict the benefits of foods for human health containing the studied plants, e.g., as a mild

non-medicinal antidiabetic agent that inhibits the activity of α -glucosidase and α -amylase and reduces the glycemic index after the consumption of starchy food. Since the extracts of the overground plant parts showed a good inhibitory effect on angiotensin-converting enzyme, preparations made from them could be recommended for the control of mild hypertension with food and / or food supplements.

Furthermore, the achieved results encourage the improvement and expansion of research with selected plants. Research in this direction, could be continued by fractionating the extracts, isolating the most effective compounds, studying their activity by various *in vitro* methods. Further research should continue with animals (*in vivo*) and at the final stage with humans (clinical). Such studies can be expected to produce a sufficiently comprehensive data package for health statements.

Research objects

Species of different genus were selected for the research: *Dioscorea* spp. *caucasica*, *nipponica*, and *Astragalus* spp. *glycyphyllos*. These species are grown in the collection of medicinal plants of Kaunas Botanical Garden of Vytautas Magnus University. The studied leaf samples were collected at the beginning of blooming, and the rhizomes were dug up during the vegetation period. The collected raw material, i.e. the leaves are dried at room temperature by spreading them in a thin layer in a well-ventilated room protected from direct sunlight. Unpeeled rhizomes with roots (lat. *Rhizoma cum radicibus Dioscorea*) are cut into 10–15 cm long pieces and dried in a dryer (Sencor food dehydrator, SFD 742 RD, China) at a temperature of $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Dried leaves are light green in colour, with a faint smell, rhizomes are cylindrical pieces with a brown surface, yellowish-white inside, with a slightly sweet taste.

All dried plant parts were ground into a fine powder with a Reatsch ZM200 grinder (Reatch GmbH, Haanas, Germany) with a 0.5 mm mesh sieve.

Research methods

Changing the conditions of the biological methods but following the main aspects of the research methods [134, 145, 139], biological studies were applied to determine the capacity of extracts to inhibit enzyme activity *in vitro*. Enzyme activity was determined using the following biological methods: (1) for determining the α -glucosidase activity – chromogenic method using *p*NPG substrate [134]; (2) for determination of α -amylase activity – a colorimetric method using potato starch as a substrate [145]; (3) to determine the activity of acetylcholinesterase – Ellman's method [139]; (4) to determine the activity of angiotensin-converting enzyme – methodologies described by Vermerissen et al. (2002) [146], Holmquist et al. (1979) [142] and Ronca-Testoni (1983) [143].

In enzyme kinetics, the main parameters are the following: Michaelis-Menten constant (K_m), maximum reaction rate (V_{max}) and inhibition constant (K_i) are estimated according to the double inverse equation of Lineweaver-Burk plot and the Michaelis-Menten equation. The type of extract inhibition was determined in accordance with Lineweavers-Burk plot graphs.

The quality of ethanolic extract of *Dioscorea* spp. *nipponica*, *caucasica*, and *Astragalus* spp. *glycyphyllos* was analysed by the method of ultra-efficient liquid chromatography – mass spectrometry (UPLC – Q-TOF MS/MS) using a Waters ultra-efficient liquid chromatography (UPLC) (Waters, Milford, USA) and Bruker maXis mass spectrometry (MS/MS) system (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Compounds are identified by comparing molecular formula and MS/MS fragments with compounds in METLIN, LIPIDMAPS databases and data found in literature sources. The diagram below shows the process sequence of the research progress.

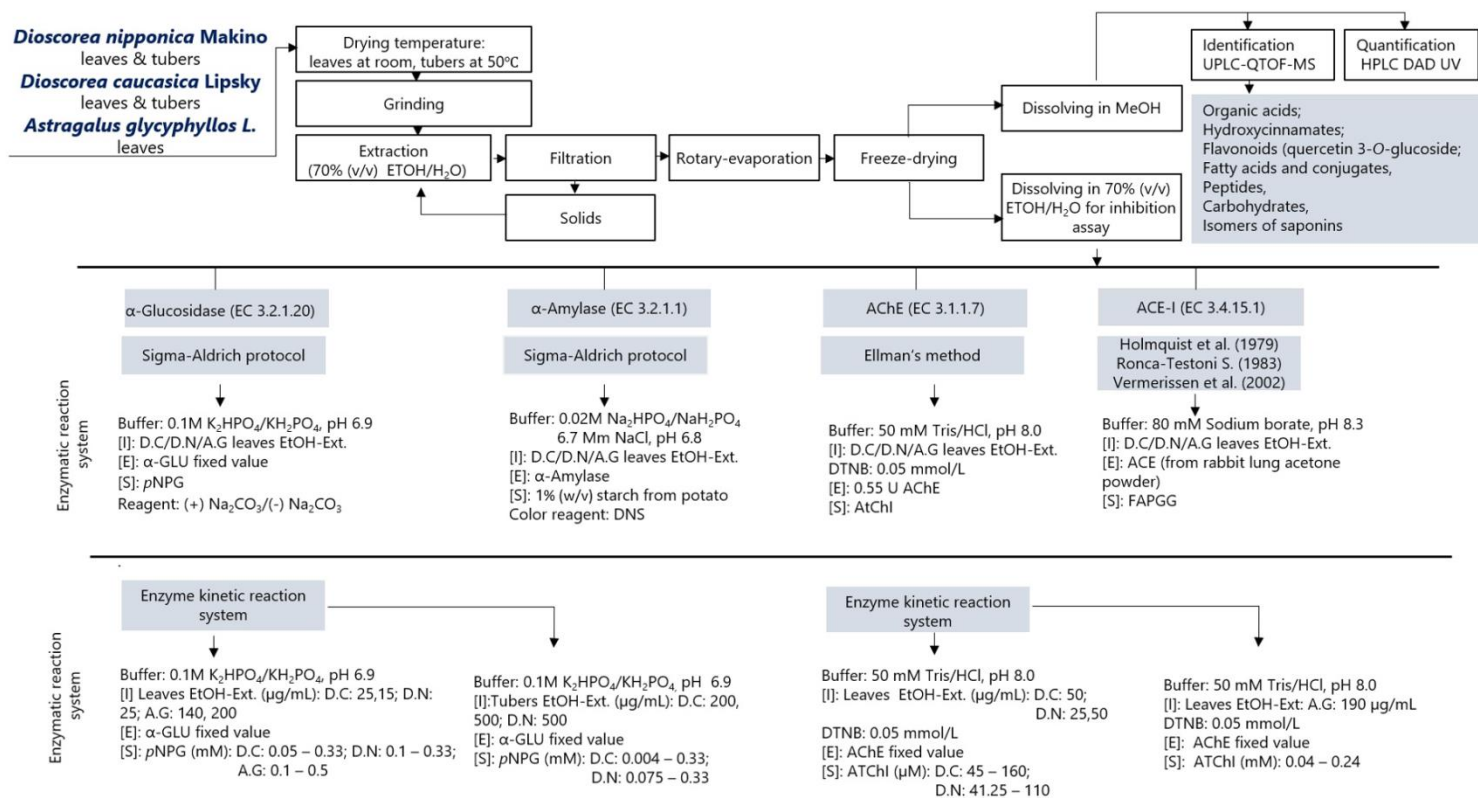


Fig. 4.1. The process sequence of the research progress

4.2. RESULTS AND THEIR DISCUSSION

4.2.1. Profiles of compounds in leaf and rhizome extracts of *D. caucasica* Lipsky

Compounds were determined in negative mode by ESI(-) by UPLC-QTOF-MS/MS method in *D. caucasica* leaf and rhizome extracts. According to the study of different parts of the plant, compounds and extracts containing them are briefly divided into two groups: (1) leaf ethanolic extract containing four organic acids (**1–4**), eight hydroxycinnamic acids (**10–17**), seven flavonoids (**18–24**), one carbohydrate (**6**), two fatty acids (**26–28**) and several compounds of other classes (**31–34**); (2) rhizome ethanolic extract containing four organic acids (**1–2, 4–5**), four carbohydrates (**6–9**), five fatty acids (**25, 27–30**), six isomers of steroidal glycosides (**35–40**) and several compounds of other classes (**38–39**). **Table 4.2.1** below illustrates the more detailed data for these compounds.

Table 4.2.1 Compounds in leaf and rhizome extracts of *D. caucasica* Lipsky are identified by UPLC/Q-TOF-MS/MS method

ID Nr.	t_R , min	m/z [M – H] ⁻				Compounds	Leaves	Tubers	Reference
		Found	Calculated	Diagnostic Ion(s)	Error (ppm)				
Organic acids									
1.	0.4	191.0561	191.0556	191[C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0.5	(-)-Quinic acid	+	+	MS
	0.7 ²	191.0562			-0.6				
2.	0.5	133.0142	133.0137	133[C ₄ H ₅ O ₅] ⁻	-0.5	(L/D)-Malic acid/	+	+	[154]
	0.8 ²	133.0142			-0.5	2-Hydroxybutanedioic acid			[155]
3.	0.5	173.0454	173.0450	173[C ₇ H ₉ O ₅] ⁻	-0.4	Shikimic acid	+		[154, 156]
4.	0.8	191.0196	191.0191	191[C ₆ H ₇ O ₇] ⁻	-0.4	2-Hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid	+	+	MS
	1.2 ²	191.0200			-0.8	(Citric/isocitric acid)			
5.	1.8	255.0512	255.0505	255[C ₁₁ H ₁₁ O ₇] ⁻	-0.7	(p-hydroxybenzyl) tartaric acid (Piscidic acid)		+	[157]
Carbohydrates									
6.	0.6	179.0561	179.0555	179[C ₆ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0.6	Hexose	+	+	
7.	0.7	341.1089	341.1083	341[C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁] ⁻	-0.6	Dihexose (Hex ₂)		+	[158]
8.	0.7	683.2252	683.2246	683[C ₂₄ H ₄₃ O ₂₂] ⁻ [2M – H] ⁻	-0.6	Unseparated sugars		+	[159]
9.	0.7	1025.3414	1025.3408	1025[C ₃₆ H ₆₃ O ₃₃] ⁻ [3M – H] ⁻	-0.6	Unseparated sugars		+	[159]

Table 4.2.1 (cont.)

ID Nr.	t_R , min	m/z [M – H] [–]				Compounds	Leaves	Tubers	Reference
		Found	Calculated	Diagnostic Ion(s)	Error (ppm)				
Hydroxycinnamates									
10.		707.1822	707.1823	707[C ₃₂ H ₃₅ O ₁₈] [–] [2M – H] [–]	-0.1		+		
	1.5	353.0875	353.0872	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] [–]	-0.3	3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid ¹			
		707.1822	707.1823	707[C ₃₂ H ₃₅ O ₁₈] [–] [2M – H] [–]	-0.1		+		
11.		355.0664	355.0665	355[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀] [–]	-0.1	Caffeic acid 3- <i>O</i> -glucuronide			[160]
12.	1.6	297.0612	297.0610	297[C ₁₃ H ₁₃ O ₈] [–]	-0.2	Caffeoylthreonic acid	+		
		707.1827	707.1823	707[C ₃₂ H ₃₅ O ₁₈] [–] [2M – H] [–]	-0.4		+		
13.		353.0876	353.0872	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] [–]	-0.4	5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid ¹			
	1.7	191.0559	191.0556	191[C ₇ H ₁₁ O ₆] [–]	-0.5				
14.		337.0930	337.0923	337[C ₁₆ H ₁₇ O ₈] [–]	-0.4	Coumaroylquinic acid	+		[156]
15.		353.0877	353.0872	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] [–]	-0.5	4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	+		[160, 161]
	1.9	191.0564		191[C ₇ H ₁₁ O ₆] [–]	-0.7		+		
16.	2.0	335.0771	335.0766	335[C ₁₆ H ₁₅ O ₈] [–]	-0.5	Caffeoylshikimic acid	+		[156]
17.	2.1	367.1031	367.1029	367[C ₁₇ H ₁₉ O ₉] [–]	-0.2	Feruloylquinic acid	+		[156, 160]

Table 4.2.1 (cont.)

ID Nr.	t_R , min	m/z [M – H] ⁻				Compounds	Leaves	Tubers	Reference
		Found	Calculated	Diagnostic Ion(s)	Error (ppm)				
Flavonoids									
18.	2.3	609.1463	609.1455	609[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆] ⁻	-0.8	Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (rutin) ¹	+		
19.	2.4	463.0879	463.0876	463[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂] ⁻	-0.3	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside (isoquercitrin) ¹	+		
20.		505.0995	505.0982	505[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃] ⁻	-1.3	Quercetin-3- <i>O</i> -acetyl(hexoside)	+		
21.	2.5	549.0883	549.0880	549[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅] ⁻	-0.3	Quercetin-3- <i>O</i> -malonyl(hexoside)	+		[162]
22.	2.6	447.0930	447.0927	447[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁] ⁻	-0.3	Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnoside (quercitrin)	+		[163]
23.	2.7	533.0934	533.0931	533[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄] ⁻	-0.27	Quercetin-3- <i>O</i> -malonyl(rhamnoside)	+		MS
24.		489.1036	489.1033	489[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂] ⁻	-0.3	Quercetin-3- <i>O</i> -acetyl(rhamnoside)	+		
Fatty acids and conjugates									
25.	4.6	329.2335	329.2328	329[C ₁₈ H ₃₃ O ₅] ⁻	-0.7	Trihydroxyoctadecenoic acid		+	[164]
26.	5.8	293.2120	293.2117	293[C ₁₈ H ₂₉ O ₃] ⁻	-0.3	Hydroxyoctadecatrienoic acid	+		[164], MS
27.	6.8	358.2601	358.2593	358[C ₁₉ H ₃₆ NO ₅] ⁻	-0.8	Hydroxydodecanoylcarnitine		+	³ LMFA 07070032
28.	6.9	295.2280	295.2273	295[C ₁₈ H ₃₁ O ₃] ⁻	-0.7	Isomer of Hydroxyoctadecadienoic acid	+		
	8.0 ²	295.2281			-0.8			+	[164]
29.	8.4	271.2279	271.2273	271[C ₁₆ H ₃₁ O ₃] ⁻	-0.6	Hydroxyhexadecanoic		+	[164]
30.	8.8	279.2330	279.2324	279[C ₁₈ H ₃₁ O ₂] ⁻	-0.6	Octadecadienoic acid (Linoleic acid, C18:2)		+	[164]

Table 4.2.1 (cont.)

ID Nr.	t_R , min	m/z [M – H] [–]				Compounds	Leaves	Tubers	Reference
		Found	Calculated	Diagnostic Ion(s)	Error (ppm)				
Other compounds									
31.	0.3	225.0617	225.0610	225[C ₇ H ₁₃ O ₈] [–]	-0.7	Glucuheptonic acid	+		[165]
32.	0.9	290.0881	290.0875	290[C ₁₁ H ₁₆ NO ₈] [–]	-0.6	<i>N</i> -acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid	+		
33.		128.0352	128.0347	128[C ₅ H ₆ NO ₃] [–]	-0.5	Pyroglutamic acid	+		[166]
34.	1.4	345.1188	345.1186	345[C ₁₅ H ₂₁ O ₉] [–]	-0.2	Aucubin	+		MS
35.	3.3	1109.5383	1109.5379	1109[C ₅₂ H ₈₅ O ₂₅] [–]	-0.4	Steroidal glycoside		+	[167]
36.	3.7	1093.5431	1093.5431	1093[C ₅₂ H ₈₅ O ₂₄] [–]	-0.0	Steroidal glycoside		+	[167]
37.	4.3	1075.5327	1075.5325	1075[C ₅₂ H ₈₃ O ₂₃] [–] [M – H-146] [–]	-0.2	Steroidal glycoside (OP derivative)		+	[167, 168]
38.	6.5	929.4754	929.4746	929[C ₄₆ H ₇₃ O ₁₉] [–]	-0.1	Steroidal glycoside		+	
39.	6.6	913.4798	913.4797	913[C ₄₆ H ₇₃ O ₁₈] [–]	-0.1	Steroidal glycoside		+	
40.	6.8	767.4228	767.4217	767[C ₄₀ H ₆₃ O ₁₄] [–]	-1.1	Steroidal glycoside (pentandroside B)		+	[167, 169]
Unknown compound									
41.	6.1	559.3117	559.3118	559[C ₂₈ H ₄₇ O ₁₁] [–]	-0.1	Unknown compound	+		MS
42.	6.6	483.2727	483.2719	483[C ₂₅ H ₃₅ N ₆ O ₄] [–]	-0.8	Unknown compound	+		MS
43.	5.6	721.3652	721.3646	721[C ₃₄ H ₅₇ O ₁₆] [–]	-0.6	Unidentified galactolipid	+		MS
44.	6.8	723.3809	723.3803	723[C ₃₄ H ₅₉ O ₁₆] [–]	-0.6	Unidentified galactolipid		+	MS

¹Identification is supported by the standard. ²Elution times (t_R) of the same compounds for tuber extracts were slightly higher. ³LMFA – designates the LIPIDMAPS online database number for the metabolite. ⁴OP – ophiopogonin.

The following organic acids were found in extracts of leaves and rhizomes of *D. caucasica*: (-)-quinic (**1**) ($[M - H]^-$ m/z 191.0556), (*L/D*)-malic (**2**) ($[M - H]^-$ m/z 133.0137), citric/isocitric (**4**) ($[M - H]^-$ m/z 191.0191) at different retention times (t_R) of 0.4 and 1.2 min. The latter compounds corresponded to molecular formulas. Shikimic acid (**3**) ($[M - H]^-$ m/z 173.0450) at a retention time (t_R) of 0.5 min and glucoheptonic acid (**31**) ($[M - H]^-$ m/z 225.0610) at a retention time (t_R) 0.3 min was detected in *D. caucasica* leaf extracts, while piscidic acid (**5**) ($[M - H]^-$ m/z 255.0505) with a retention time (t_R) 1.8 min was detected in rhizome extracts. In previous studies, piscidic acid was identified in rhizomes of *D. nipponica* [157], while shikimic, malic, and threonic acids were identified in *Dioscorea elephantipes*, *Dioscorea sylvatica*, and other species (154). Glucoheptonic acid was discovered in the leaves of *D. caucasica* for the first time.

Another compound (**30**) ($[M - H]^-$ ion m/z 290.0875) at a retention time (t_R) of 0.9 min matched the model of derivative fragment of sialic acid (*N*-acetyl-neuraminic acid) that was preliminary identified as *N*-acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid (NADNA). In previous studies of *Dioscorea* spp. species, NADNA was not found. At the same retention time as the compound (**30**), a model of the amino acid fragment (**33**) was detected, which was identified as pyroglutamic acid (**33**) ($[M - H]^-$ m/z 128.0347) [166]. These compounds were found only in the extract of *Dioscorea* leaves. Another deprotonated molecular ion (**34**) $[M - H]^-$ at m/z 345.1186 (t_R , 1.4 min) coincided with the spectra provided in the database Metlin and other authors and corresponded to the characteristic of the iridoid glycoside aukubin [170]. The latter iridoid glycoside is mostly found in plant species of the *Plantago* genus.

The isomer of caffeoylquinic acid has the chemical formula $C_{16}H_{18}O_9$ and a monoisotopic ion mass of m/z 354.0950. Similar $[M - H]^-$ precursor ions with m/z value 353.0872 were characteristic of compounds (**10**), (**13**), and (**15**) at the retention times (t_R) of 1.5, 1.7 and 1.9 min, respectively. This pattern of mass spectra indicated the presence of several isomers of caffeoylquinic acid. The first compound (**10**) was identified as 3-*O*-caffeoylquinic acid [160]. The second compound (**13**) was assigned to 5-*O*-caffeoylquinic acid. According to the molecular ion corresponding to the molecular formula and its dimer m/z 707.1823 $[2M - H]^-$ (t_R , 1.7 min), it was easy to see the characteristic fragments m/z 191.0556 $[M - H]^-$ (t_R , 1.7 min) specific to 5-*O*-caffeoylquinic acid m/z 353.0872 $[M - H]^-$. The molecular spectra obtained coincided with previous studies [160], and the identity of 5-*O*-caffeoylquinic acid was confirmed by reference standard. Based on the precursor ion m/z 297.0612 $[M - H]^-$ compound (**12**) was preliminary identified as caffeoylthreonic acid. Other compounds (**14**) and (**15**) containing $[M - H]^-$ m/z 337.0923 and m/z 353.0872 molecular ions and fragments m/z 191.0556 $[M - H - 146]^-$ and m/z 191.0556 $[M - H - 162]^-$ respectively, were assigned to hydroxycinnamic acids: coumaroylquinic and 4-*O*-caffeoylquinic acids. Compound (**16**) ($[M - H]^-$ ion m/z 335.0766), retention time (t_R) of 2 min was identified as caffeoylshikimic acid. In earlier studies, it was determined in *D. alata* leaves [156], whereas the compound (**17**) ($[M - H]^-$ ion m/z 367.1029) according to the obtained retention time (t_R) of 2 min was assigned to feruloylquinic acid.

Compounds **18–24** were identified as flavonoids belonging to quercetin derivatives. Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) corresponding to the molecular formula $C_{15}H_{10}O_7$ (monoisotopic mass m/z 302.04265) and having a characteristic fragment ion m/z 301[M – H][–] was definitely associated with the detected quercetin derivatives analyzed in leaf extracts of *D. caucasica*. This explains that the molecular spectra of the detected flavonoids are characterized by [M – H (3-*O*-glycoside)][–] compounds. Compounds (**18**) and (**19**) with molecular ions of m/z 609.1455 (t_R , 2.3 min) and m/z 463.0876 (t_R , 2.4 min) corresponded to quercetin-3-*O*-rutinoside and quercetin-3-*O*-glucoside, respectively. The identity of the latter compounds was confirmed by reference standards. Compound (**22**) ([M – H][–], ion m/z 447.0927) (t_R , 2.6 min) coincided with the spectra of quercitrin reported by other authors [163] and was identified as quercetin-3-*O*-rhamnoside (quercitrin). The detected compounds as t_R 2.5 min: (**21**) ([M – H][–] ion m/z 549.0880), (**20**) ([M – H][–] ion m/z 505.982); t_R 2.7 min: (**23**), [M – H][–] ion m/z 533.0931), (**24**) [M – H][–] ion m/z 489.1033), are associated with quercetin derivatives that may belong to acetylated (malonyl) flavonoids. This is explained by the fact that the loss of the acetyl residue (C_2H_2O) of the malonyl group compounds is due to the loss of CO_2 . This is characteristic of both compound (**20**) with m/z 505.0982 [M – H – 44][–] and compound (**24**) with m/z 489.1036 [M – H – 44][–]. The presence of compounds (**20**) and (**21**) was confirmed by the mass spectra distribution path presented in the literature investigating the profiles of phenolic compounds in the fruits and leaves of *Ficus carica* L. by using QTOF-MS analysis [162]. Accordingly, acetylated (malonyl) flavonoids were identified as follow: (**20**) quercetin-*O*-acetyl(hexoside), (**21**) quercetin-3-*O*-malonyl(hexoside) (**23**) quercetin-3-*O*-malonyl(rhamnoside) (**24**) quercetin-3-*O*-acetyl(rhamnoside).

Carbohydrates were detected only in samples of *D. caucasica* rhizome extracts, with the exception of a hexose of uncertain structure (**6**). Sucrose (**7**) ([M – H][–] m/z 341.1083) was detected at t_R 0.7 min [158, 159] and at the same retention time, while two other compounds, (**8**) ([2M – H][–], m/z 683.2246) and (**9**) ([3M – H][–] ion, m/z 1025.3408), corresponded to the spectral characteristics of deprotonated dimer and trimer oligosaccharide ions [159]. **Table 4.2.1** describes them as non-separated sugars.

The m/z fragment (profile) patterns detected in the obtained mass spectra are associated with fatty acids. Compound (**30**) [M – H][–] m/z 279.2324 (t_R 8.8 min), corresponded to linoleic acid (C18:2), another compound (**28**) [M – H][–] m/z 295, 2273 (t_R , 6.9 and 8.0 min) corresponded to hydroxyoctadecadienoic acid. Other compounds showed ions of hydroxylated fatty acid molecules: (**29**) ([M – H][–] ion m/z 271.2273) at (t_R) 8.4 min and (**25**) ([M – H][–] m/z 329.2328) at (t_R) 4.6 min corresponded to hydroxyhexadecanoic acid (**29**) and trihydroxy octadecenoic acid (**25**), respectively. Hydroxyoctadecatrienoic acid (**26**) [M – H][–] ion m/z 293.2117 was detected only in the leaf extract with a retention time (t_R) of 5.8 min. Furthermore, the [M – H][–] ion of compound (**27**) m/z 358.2593 at (t_R) 6.8 min showed the molecular formula $C_{19}H_{36}NO_5$, which corresponds to a fatty acid ester. Such a fatty acid ester is

characteristic of carnitine derivatives. Referring to the literature data and the LIPID MAPS database, this compound is identified as hydroxy dodecanoylcarnitine.

In the obtained mass spectra, it was not possible to determine the exact place of hydroxylation, but according to the molecular ion corresponding to the molecular formula, it is easy to see the characteristic fragments specific to fatty acids, and the observed retention time of fatty acids correlates with literature data. It should be noted that conjugates of fatty acids with amino acids are widely found in animal products, but their availability in plants is limited.

The exact structures of the detected compounds **(35)**, **(36)**, **(37)**, **(38)**, and **(39)** could not be clarified, but based on their molecular ions $[M - H]^-$ m/z 1109.5379 (t_R , 3.3 min), 1093.5431 (t_R , 3.7 min), 1075.5325 (t_R , 4.3 min), 929.4746 (t_R , 6.5 min), 913.4797 (t_R , 6.6 min), corresponding to the molecular formulas $C_{52}H_{85}O_{25}$, $C_{52}H_{85}O_{24}$, $C_{52}H_{83}O_{23}$, $C_{46}H_{73}O_{19}$ and $C_{46}H_{73}O_{18}$, they undoubtedly belong to the steroidal glycosides abundant in various species of *Dioscorea*. The spectral data of compound **(40)** $[M - H]^-$ ion m/z 767.4217 (t_R , 6.8 min) also indicate the steroidal saponin pentandroside B [167]. Moreover, compound **(44)** $[M - H]^-$ m/z 723.3803 corresponding to the molecular formula $C_{34}H_{59}O_{16}$ was detected in rhizomes with a retention time (t_R) of 6.8 min, while compound **(43)** $[M - H]^-$ ion m/z 721.3646 was detected in leaves with a retention time of 5.6 min. The latter compounds most likely belong to galactolipids.

4.2.2. Profiles of compounds in *D. nipponica* Makino leaf and rhizome extracts

Referring to the study of different plant parts, the compounds and extracts containing them are divided into two groups: (1) leaf ethanolic extract containing six organic acids (**1–5**, **7**), eight hydroxycinnamic acids (**14–21**), ten flavonoids (**22–31**), three carbohydrates (**8–9,11**), one cluster ion (**13**), three isomers of steroidal glycosides (**41**, **44**, **48**) and several compounds of other classes (**37–40**); (2) rhizome ethanol extract containing five organic acids (**1–2**, **4–6**), four carbohydrates (**8**, **10–12**), one cluster ion corresponding to the hexose dimer of quinic acid (**13**), four fatty acids (**32–33**, **35–36**), eight isomers of steroidal glycosides (**42–49**) and several compounds of other classes (**38–39**). More detailed data for these compounds are shown below (**Table 4.2.2**).

Table 4.2.2 Compounds in leaf and rhizome extracts of *D. nipponica* Makino are identified by UPLC/Q-TOF-MS/MS method

ID Nr.	<i>t_R</i> , min	m/z [M – H] ⁻				Compounds	Leaves	Tubers	Reference
		Found	Calculated	Diagnostic Ion(s)	Error (ppm)				
Organic acids									
1.	0.4	191.0563	191.0556	191[C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0.7	(-)-Quinic acid	+	+	MS
	0.7 ²	191.0561			-0.5				
2.	0.5	133.0142	133.0137	133[C ₄ H ₅ O ₅] ⁻	-0.7	2-Hydroxybutanedioic acid (Malic acid)	+	+	[154]
	0.7 ²	133.0142			-0.6				
3.	0.5	173.0454	173.0450	173[C ₇ H ₉ O ₅] ⁻	-0.7	Shikimic acid	+		[154]
4.	0.7	191.0198	191.0191	191[C ₆ H ₇ O ₇] ⁻	-0.7	2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid (Citric/isocitric acid)	+	+	MS
	1.2 ²	191.0198			-0.7				
5.	1.0	147.0299	147.0294	147[C ₅ H ₇ O ₅] ⁻	-0.5	Citramalic acid	+	+	
	1.4 ²	147.0300			-0.6				
6.	1.8	255.0514	255.0505	255[C ₁₁ H ₁₁ O ₇] ⁻	-0.9	Piscidic acid		+	[157]
7.	2.8	187.0976	187.0970	187[C ₉ H ₁₅ O ₄] ⁻	-0.6	Nonane diacid (Azelaic acid)	+		[171]
Carbohydrates									
8.	0.3	179.0561	179.0556	179[C ₆ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0.5	Hexose	+	+	MS
	0.6 ²	179.0563	179.0556	179[C ₆ H ₁₁ O ₆] ⁻	-0.7				
9.	0.4	149.0456	149.0450	147[C ₅ H ₉ O ₅] ⁻	-0.6	Pentose	+		MS
10.	0.4	387.1146	387.1139	387[C ₁₃ H ₂₃ O ₁₃] ⁻	-0.7	Unknown disaccharide (³ DBE= 2)	+	+	MS
	0.7 ²	387.1146			-0.8				

Table 4.2.2 (cont.)

ID Nr.	<i>t_R</i> , min	m/z [M – H] [–]				Compounds	Leaves	Tubers	Reference
		Found	Calculated	Diagnostic Ion(s)	Error (ppm)				
11.	0.7	341.1089	341.1083	341[C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁] [–]	-0.6	Hex ₂	+	[158]	
12.	0.7	683.2256	683.2246	683[C ₂₄ H ₄₃ O ₂₂] [–] [2M – H] [–]	-0.1	Unseparated sugars	+	[159]	
Cluster ion									
13.	0.4	533.1722	533.1717	533[C ₁₉ H ₃₃ O ₁₇] [–]	-0.5		+		
	0.7 ²	533.1723			-0.6	Quinic acid + dihexose (Hex ₂)	+	MS	
Hydroxycinnamates (HCAs)									
14.	1,5	707.1829	707.1823	707[C ₃₂ H ₃₅ O ₁₈] [–] [2M – H] [–]	-0.6			[160]	
		353.0879	353.0873	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] [–]	-0.6	3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid ¹	+	MS	
15.	1.6	355.0672	355.0665	355[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀] [–]	-0.7	Caffeic acid 3- <i>O</i> -glucuronide	+	[160]	
16.		297.0621	297.0610	297[C ₁₃ H ₁₃ O ₈] [–]	-1.1	Caffeoylthreonic acid	+		
		707.1828	707.1823	707[C ₃₂ H ₃₅ O ₁₈] [–] [2M – H] [–]	-0.5			[160]	
17.	1.7	353.0880	353.0873	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] [–]	-0.7	5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid ¹	+	MS	
		191.0562	191.0556	191[C ₇ H ₁₁ O ₆] [–]	-0.6				
18.	1.9	337.0929	337.0923	337[C ₁₆ H ₁₇ O ₈] [–] [M – H – 146] [–]	-0.6	Coumaroylquinic acid	+	MS	

Table 4.2.2 (cont.)

ID Nr.	<i>t_R</i> , min	m/z [M – H] [–]				Compounds	Leaves Tubers	Reference
		Found	Calculated	Diagnostic Ion(s)	Error (ppm)			
19.	1.9	353.0877	353.0873	353[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] [–]	-0.4	4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	+	
		191.0564	191.0556	191[C ₇ H ₁₁ O ₆] [–]	-0.8			
20.	2.0	335.0771	335.0766	335[C ₁₆ H ₁₅ O ₈] [–]	-0.5	Caffeoylshikimic acid	+	[156]
21.	2.1	367.1031	367.1029	367[C ₁₇ H ₁₉ O ₉] [–]	-0.2	Feruloylquinic acid	+	[160,156]
Flavonoids								
22.	1.8	577.1354	577.1346	577[C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂] [–]	-0.8	Procyanidin dimer (B type)	+	[127,172]
23.	1,9	289.0719	289.0712	289[C ₁₅ H ₁₃ O ₆] [–]	-0,7	Catechin	+	[158]
	2.1 ²	289.0723		289[C ₁₅ H ₁₃ O ₆] [–]	-1.09			
24.	2.3	609.1461	609.1456	609[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆] [–]	-0.5	Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (rutin) ¹	+	MS
25.	2.4	477.0676	477.0669	477[C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃] [–]	-0.7	Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	+	[173]
26.	2.4	463.0891	463.0876	463[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂] [–]	-1.5	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside (isoquercitrin) ¹	+	MS
27.		505.0995	505.0982	505[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃] [–]	-1.3	Quercetin-3- <i>O</i> -acetyl(hexoside)	+	
28.	2.6	549.0883	549.0880	549[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅] [–]	-0.3	Quercetin-3- <i>O</i> -malonyl(hexoside)	+	[162]
29.	2.7	447.0941	447.0924	447[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁] [–]	-0.3	Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnoside (quercitrin)	+	[163]
30.		533.0934	533.0931	533[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄] [–]	-0.27	Quercetin-3- <i>O</i> -malonyl(rhamnoside)	+	MS
31.	2.8	489.1036	489.1033	489[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂] [–]	-0.3	Quercetin-3- <i>O</i> -acetyl(rhamnoside)	+	

Table 4.2.2 (cont.)

ID Nr.	<i>t_R</i> , min	m/z [M – H] [–]				Compounds	Leaves	Tubers	Reference
		Found	Calculated	Diagnostic Ion(s)	Error (ppm)				
Fatty acids and conjugates									
32.	3.8	327.2181	327.2172	327[C ₁₈ H ₃₁ O ₅] [–]	-0.9	Hydroperoxy-epoxy-octadecenoic acid	+		[164]
	4.3	327.2180			-0.8			+	
33.		329.2337	329.2328	329[C ₁₈ H ₃₃ O ₅] [–]	-0.9	Trihydroxyoctadecenoic acid		+	[164]
		329.2332			-0.4				
34.	5.8	293.2122	293.2117	293[C ₁₈ H ₂₉ O ₃] [–]	-0.5	Hydroxyoctadecatrienoic acid	+		[164]
35.	6.3	295.2280	295.2273	295[C ₁₈ H ₃₁ O ₃] [–]	-0.7	Hydroxyoctadecadienoic acid	+		[164]
	7.0	295.2281			-0.8			+	
36.	6,8	358,2601	358,2593	358[C ₁₉ H ₃₆ NO ₅] [–]	-0.8	Hydroxydodecanoylcarnitine		+	⁴ LMFA 07070032
Other compounds									
37.	0.3	225.0617	225.0610	225[C ₇ H ₁₃ O ₈] [–]	-0.7	Glucoheptonic acid	+		[165]
38.	0.9	290.0881	290.0875	290[C ₁₁ H ₁₆ NO ₈] [–]	-0.6	<i>N</i> -acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid	+		MS
	1.3	290.0882	290.0875	290[C ₁₁ H ₁₆ NO ₈] [–]	-0.7			+	
39.	0.9	128.0354	128.0347	128 [C ₅ H ₆ NO ₃] [–]	-0.7	Pyroglutamic acid	+		
	1.3	128.0354	128.0347	128 [C ₅ H ₆ NO ₃] [–]	-0.7			+	
40.	1.4	345.1188	345.1186	345[C ₁₅ H ₂₁ O ₉] [–]	-0.2	Aucubin	+		

Table 4.2.2 (cont.)

ID Nr.	<i>t_R</i> , min	m/z [M – H] [–]				Compounds	Leaves	Tubers	Reference
		Found	Calculated	Diagnostic Ion(s)	Error (ppm)				
Saponin isomer									
41.	3.2	947.4856	947.4852	947[C ₄₆ H ₇₅ O ₂₀] [–]	-0.4	Steroidal glycoside	+		MS
42.	3.3	1125.5336	1125.5329	1125[C ₅₂ H ₈₅ O ₂₆] [–]	-0.7	Steroidal glycoside (OP derivative)		+	[168]
43.		1109.5390	1109.5379	1109[C ₅₂ H ₈₅ O ₂₅] [–] [M – H – 162] [–]	-1.1	Steroidal glycoside		+	
44.	3.4	945.4693	945.4695	945[C ₄₆ H ₇₃ O ₂₀] [–]	-0.2	Steroidal glycoside	+		[167]
	5.6	945.4701	945.4695	945[C ₄₆ H ₇₃ O ₂₀] [–]	-0.6				
45.	6.2	1091.5283	1091.5274	1091[C ₅₂ H ₈₃ O ₂₄] [–]	-0.9	Steroidal glycoside (OP derivative)		+	[167,168]
46.	6.5	929.4751	929.4746	929[C ₄₆ H ₇₃ O ₁₉] [–]	-0.5	Steroidal glycoside		+	[167]
47.	6.8	899.4644	899.4640	899[C ₄₅ H ₇₁ O ₁₈] [–]	-0.4	Steroidal glycoside		+	[174]
48.	5.9	767.4216	767.4218	767[C ₄₀ H ₆₃ O ₁₄] [–]	-0.2	Steroidal glycoside (pentandroside B)	+		[167]
	6.9	767.4227		767[C ₄₀ H ₆₃ O ₁₄] [–]	-0.9				
Peptides									
49.	3.3	585.2678	585.2673	585[C ₂₈ H ₃₇ N ₆ O ₈] [–]	-0.5	Tetrapeptide		+	MS (Metlin)
50.	4.1	570.2792	570.2788	570[C ₂₆ H ₃₆ N ₉ O ₆] [–]	-0.4	Tetrapeptide		+	MS (Metlin)
51.	3.5	658.2956	658.2949	658[C ₂₉ H ₄₀ N ₉ O ₉] [–]	-0.7	Pentapeptide		+	MS (Metlin)

Table 4.2.2 (cont.)

ID Nr.	t_R , min	m/z [M – H] ⁻				Compounds	Leaves	Tubers	Reference
		Found	Calculated	Diagnostic Ion(s)	Error (ppm)				
Unknown compound									
52.	2.8	429.1764	429.1760	429[C ₂₀ H ₂₉ O ₁₀] ⁻	-0.4	Unidentified (<i>O</i> -glycosyl compounds)	+		MS
53.	3.1	635.2926	635.2915	658[C ₂₉ H ₄₇ O ₁₅] ⁻	-1.1	Unidentified (acylsucrose)	+		MS
	3.5 ²	635.2927		658[C ₂₉ H ₄₇ O ₁₅] ⁻	-1.2			+	
54.	3.4	495.2341	495.2324	495[C ₃₆ H ₃₁ O ₂] ⁻	-1.7	Unidentified	+		MS
55.	4.3	449.2753	449.2751	449[C ₂₂ H ₄₁ O ₉] ⁻	-0.2	Unidentified		+	MS
56.	5.5	721.3650	721.3646	721[C ₃₄ H ₅₇ O ₁₆] ⁻	-0.4	Unidentified galactolipid	+		MS

¹Identification is supported by the standard. ²Elution times (t_R) of the same compounds for tuber extracts were slightly higher. ³DBE – Double Bond Equivalent. ⁴LMFA – designates the LIPIDMAPS online database number for the metabolite. ⁴OP – ophiopogonin.

Organic acids found in extracts of leaves and rhizomes of *Dioscorea nipponica* are the following: (-)-quinic acid (**1**) ($[M - H]^-$, m/z 191.0556), (*L/D*)-malic (**2**) ($[M - H]^-$, m/z 133.0137), citric/isocitric (**4**) ($[M - H]^-$, m/z 191.0191) citramalic (**5**) ($[M - H]^-$, m/z 147.0294) at different retention times (t_R) of 0.4 and 1.2 min. Piscidic acid (**6**) ($[M - H]^-$, m/z 255.0505) with a retention time (t_R) of 1.8 min. was only found in rhizome extracts, while shikimic (**3**) ($[M - H]^-$, m/z 173.0450) and azelaic (**7**) ($[M - H]^-$, m/z 187.0970) acids with retention times (t_R) 0.5 and 2.8 min were determined only in leaf extracts. In previous studies, shikimic and malic acids were determined in leaves of *D. elephantipes*, *D. sylvatica*, *D. mexicana* [154], azelaic acid in rhizomes of *D. alata*, *D. bulbifera* [171], and piscidic acid in *D. nipponica* rhizomes.

Carbohydrate-specific molecular ions were detected in both leaf and rhizome extracts. Sucrose-specific molecular ion (**11**) ($[M - H]^-$, m/z 341.1089) [158, 159] with a retention time (t_R) of 0.7 min and the following ion of the compound (**12**) [$2M - H]^-$, m/z 683.2252) at the same retention time matched well the spectral characteristics of the deprotonated dimer oligosaccharide ion and was assigned to unrefined sugars. A similar carbohydrate-specific compound (**10**) ($[M - H]^-$, m/z 387.1139) according to retention time (t_R) of 0.4 min was detected in both leaf and rhizome extracts. This unknown disaccharide (**10**) could have formed from various hexoses. It is also known that cluster ion compounds exist in nature as blends of mixed groups (clusters) with other molecules. Namely, the mass spectrum of compound ion (**13**) ($[M - H]^-$, m/z 533.1717) (t_R , 0.4 min: leaves; t_R , 0.7 min: rhizomes) clearly indicated quinic acid ester and a hexose mixture ($[quinic\ acid + Hex_2 - H]^-$). Also, the MS spectrum of the compound (**37**) ($[M - H]^-$, m/z 225.0610) corresponded well to the formula of glucoheptonic acid, $C_7H_{13}O_8$ [165], and another MS spectrum (**39**), ($[M - H]^-$, m/z 128.0347) corresponded to the pyroglutamic acid formula $C_5H_6NO_3$; the first compound was detected only in the leaf extract and the second in both extracts (**Table 4.2.2**).

N-acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid (**38**) belonging to sialic acid derivatives ($[M - H]^-$, m/z 290.0875) (t_R , 0.9 min: leaves; t_R , 1.3 min: rhizomes) matched the molecular mass spectrum in the Metlin database. The molecular ion (**40**) of another compound ($[M - H]^-$, m/z 345.1186) matched the mass spectrum of the iridoid glycoside well and was preliminary identified as aukubin. This compound belonging to iridoid glycosides is usually found in different parts of plants and is responsible for defensive functions.

The different isomers of caffeoylquinic acid have the chemical formula $C_{16}H_{18}O_9$ and a monoisotopic mass of 354.0950. During the research, the molecular ion $[M - H]^-$ m/z 353.0876 of caffeoylquinic acid precursor was characteristic of molecular isomers of compounds (**14**), (**17**), and (**19**) formed at different retention times of 1.5, 1.7, and 1.9 min, respectively. From the molecular ion (**14**) ($[M - H]^-$, m/z 353.0873) corresponding to the molecular formula $C_{16}H_{17}O_9$ and the adjacent dimer (m/z 707.1823) (t_R , 1.5 min) it was easy to envision the presence of 3-*O*-caffeoylquinic (neochlorogenic) acid. A similar arrangement of the spectra is characteristic for the retention time of 1.7 min. The most intense m/z peaks of the

molecular ion are located in the chromatogram as follow: 707.1823 [2M – H]⁻; 353.0873, [M – H]⁻ and 191.0556 [M – H]⁻, confirmed the presence of (17) 5-*O*-caffeoylquinic acid. The presence of these acids coincided with the spectra of caffeoylquinic acid isomers reported by other authors [160]. Also, the identity is confirmed by an authentic standard. Referring to well-fitting molecular formulas and MS spectra, the ion (16) of compound ([M – H]⁻, m/z 297.0610) at a retention time (*t_R*) of 1.6 min was preliminary identified as caffeoylthreonic acid and ion (15) of compound ([M – H]⁻, m/z 355.0665) as the caffeic acid 3-*O*-glucuronide [160]. Another compound (18) with a retention time (*t_R*) of 1.9 min and m/z 337.0923 was identified as coumaroylquinic acid based on the clearly visible (146 Da) separation of the sugar part. Ions of compounds (20) ([M – H]⁻, m/z 335.0766) and (21) ([M – H]⁻, m/z 367.1029) showed typical mass spectra of caffeoylshikimic and feruloylquinic acids, respectively [160, 156].

The various isomers of quercetin have the chemical formula C₁₅H₁₀O₇ (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) and the monoisotopic mass is 302.04265. [M – H (3-*O*-glycoside)]⁻ flavonoid isomers were dominant in *Dioscorea nipponica* leaf extracts, as shown in **Table 4.2.2**

Compounds (24) and (26) at m/z 609.1456 and 463.0876 were identified as quercetin-3-*O*-rutinoside (rutin) and quercetin-3-*O*-glucoside (isoquercitrin), respectively; their identity is confirmed by reference standards. Another quercetin glycoside derivative (29) with a retention time (*t_R*) of 1.9 min and m/z 447.0924 was identified as quercetin-3-*O*-rhamnoside (quercitrin). The identity of the latter coincided with mass spectral data reported by other scientists [163]. Also, the mass spectra m/z (477.0669) presented in the literature [173] coincide with the obtained spectra of the compound ion (25) ([M – H]⁻, m/z 447.0669). The latter compound has been identified as quercetin-3-*O*-glucuronide. Compounds (27) and (28) showed precursor ions [M – H]⁻ m/z 549.0880 and 505.0982, accordingly. The latter were identified as quercetin-3-*O*-malonyl glucoside and quercetin-3-*O*-acetylglucoside, accordingly. The presence of these compounds is confirmed by the mass spectral data presented in literature [162]. A similar path in the mass spectrum is characteristic of other detected compounds: molecular ions (30) ([M – H]⁻, m/z 533.0931) and (31) [M – H]⁻, m/z 489.1033) corresponding to molecular formulas C₂₄H₂₁O₁₄ and C₂₃H₂₁O₁₂ respectively, led to the preliminary identification of quercetin-3-*O*-malonylrhamnoside and quercetin-3-*O*-acetylrhamnoside, accordingly. Ion (22) of compound ([M – H]⁻, m/z 577.1346) was identified as the procyanidin dimer [172]. With respect to the data obtained for this oligomer it is confirmed that the compound ion (23) ([M – H]⁻, m/z 289.0712) is associated with catechin. Previous studies have detected catechin in many species of the genus *Dioscorea*: *D. bulbifera*, [158,175], *D. hirtiflora* [175], *D. hamiltonii* [29], and procyanides have been identified in previous studies in *D. cirrhosa* [127] and *D. alata* [176] species.

Long-chain fatty acids and their hydroxylated derivatives are common in a variety of plant materials, including rhizomes of *Dioscorea* [164,177]. In the investigated MS spectra, ion (35) of compound ([M – H]⁻, m/z 295.2273) corresponded to hydroxyoctadecadienoic. Other derivatives showed structures of

hydroxylated fatty acids: ion **(32)** $[M - H]^-$, m/z 327.2172) corresponded to hydroperoxy-epoxy-octadecenoic acid; molecular ion **(33)** ($[M - H]^-$, m/z 329.2328) corresponded to tri-hydroxy-octadecenoic acid. Hydroxy-octadecatrienoic acid corresponded to molecular ion **(34)** ($[M - H]^-$, m/z 293.2117), but was only detected in leaf extracts of *D. nipponica* Makino. It should be noted that MS/MS data do not provide sufficient information about the exact position of the hydroxy groups in the fatty acid chain. Furthermore, ion **(36)** of the compound ($[M - H]^-$, m/z 358.2593) corresponded to the molecular formula $C_{19}H_{36}NO_5$, which was associated with a fatty acid ester. The latter was assigned to a carnitine derivative, namely, hydroxydodecanoylcarnitine (C12-OH). However, the obtained mass spectra did not allow to determine the exact location of hydroxylation. It is worth mentioning that conjugates of fatty acids with amino acids are widely found in foods of animal origin but are relatively rare in plants.

Steroidal glycosides (saponins) were detected in rhizome samples of *Dioscorea nipponica*, but only a few were detected in leaf samples. Steroidal saponins identified in previous studies also dominated in the rhizomes of *Dioscorea* [174]. QTOF/MS data are insufficient to elucidate the exact structures of the compounds; their purification and detailed spectral data, including various BMR, FTIR modifications, would be required; however, such work was beyond the scope of our study. Nevertheless, compounds **(41)**, **(45)**, and **(47)** with molecular ions $[M - H]^-$ m/z 947.4852, 1091.5274 and 899.4640, respectively, corresponded to the molecular formulas $C_{46}H_{75}O_{20}$, $C_{52}H_{83}O_{24}$, and $C_{45}H_{71}O_{18}$, and definitely belong to the steroidal glycosides abundant in the rhizomes of *Dioscorea* species [174, 178] and some other plants [168, 167]. In the MS spectrum, compound ion **(48)** ($[M - H]^-$, m/z 767.4218) corresponded to the molecular formula $C_{40}H_{63}O_{14}$, which coincides with the presence of the steroidal saponin pentandroside B [167]. Hamed et al. (2004) [169] detected the ion of the compound – pentandroside B ($[M - H]^-$ m/z 767) in a *Tribulus* genus plant – *Tribulus pentadrus*.

The molecular formula $C_{46}H_{73}O_{19}$ of the compound ion **(46)** ($[M - H]^-$, m/z 929.4746) differed by one additional oxygen atom from compound ion **(44)** ($[M - H]^-$, m/z 945, 4695) of the molecular formula $C_{46}H_{73}O_{20}$, suggesting that the identities of both compounds may belong to steroidal saponins. Similar differences in molecular formulas are observed among compounds: molecular ions: **(42)** ($[M - H]^-$, m/z 1125.5329 $C_{52}H_{85}O_{26}$) and **(43)** ($[M - H]^-$, m/z 1109.5379 $C_{52}H_{85}O_{25}$). The latter compounds may also belong to steroidal saponins, i.e., derivatives of opphiopogonin [168]. The compound **(56)** ($[M - H]^-$, m/z 721.3646) found in the leaf extract and corresponding to the formula $C_{34}H_{57}O_{16}$ was identified as an unknown galactolipid.

Compounds **(49)**, **(50)** and **(51)** with $[M - H]^-$ m/z 585.2673, 570.2788, and 658.2949 molecular ions accordingly, corresponded to $C_{28}H_{37}N_6O_8$, $C_{26}H_{36}N_9O_6$, and $C_{29}H_{40}N_9O_9$ molecular formulas belonging to peptides. With reference to the Metlin database, compounds **(49)** and **(50)** are identified as tetrapeptides, while **(51)** is identified as a pentapeptide. There is not much evidence about peptides extracted from plant parts of *D. nipponica*. A well-known peptide so far is cyclo-(Leu-Tyr) found in rhizomes of *D. nipponica* [41] and later in other species of *Dioscorea* [166].

4.2.3. Profiles of compounds in leaf extracts *A. glycyphyllos* L.

A. glycyphyllos leaf extract contains: organic acids organic acids (**1–3**); carbohydrates (**4–6**); uridine (**8**); hydroxycinnamic acids (**9–10**); cycloartane glycosides (**11–13**). More detailed data for these compounds are shown below (**Table 4.2.3**).

Table 4.2.3. Compounds in leaf extracts of *A. glycyphyllos* L. are identified by UESC/Q-TOF-MS/MS method

ID Nr.	t_R , min	m/z[M– H] [–]			Error (ppm)	Compound	Reference
		Found	Calculated	Diagnostic Ion(s)			
1.	0.5	133.0142	133.0137	133[C ₄ H ₅ O ₅] [–]	-0.5	(<i>L/D</i>)-Malic acid/ malic acid	MS
2.	1.4	117.0191	117.0187	117[C ₄ H ₅ O ₄] [–]	-0.4	Succinic acid	MS
3.	2.8	187.0978	187.0970	187[C ₉ H ₁₅ O ₄] [–]	-0.8	Azelaic acid	MS
5.	0.6	149.0456	149.0450	149[C ₅ H ₉ O ₅] [–]	-0.6	Pentose	
6.		341.1082	341.1083	341[C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁] [–]	-0.1	Sucrose/ isosucrose	[179]
7.		387.1140	387.1139	387[C ₁₃ H ₂₃ O ₁₃] [–]	-0.1	Unknown disaccharide (DBE= 2) ¹	MS
8.	0.9	243.0623	243.06171	243[C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₆] [–]	-0.6	Uridine	MS
9.	2.2	337.0929	337.0923	337[C ₁₆ H ₁₇ O ₈] [–]	-	Coumaroylquinic acid	
10.	2.5	367.1039	367.1029	367[C ₁₇ H ₁₉ O ₉] [–]	-1.0	Feruloylquinic acid	[160]
11.	4.2	699.4322	699.4319	699[C ₃₇ H ₆₃ O ₁₂] [–]	-0.3	Cycloartane glycosides	[180]
12.	4.8	695.4008	695.4006	695[C ₃₇ H ₅₉ O ₁₂] [–]	-0.2	Cycloartane glycosides	[180]
13.	5.4	691.4060	691.4057	691[C ₃₈ H ₅₉ O ₁₁] [–]	-0.3	Cycloartane glycosides	[180]

¹DBE – double bond equivalent.

Organic acids identified in the leaves of *A. glycyphyllos* are as follow: (*L/D*)-malic (**1**) ([M – H][–] ion m/z 133.0137), succinic (**2**) ([M – H][–] ion m/z 117.0187), azelaic (**3**), ([M – H][–] ion m/z 187.0970) in retention time (t_R) intervals from 0.5 to 2.8 min. Other molecular ions (**5**) ([M – H][–], m/z 149.0456) (**6**) [M – H][–], m/z 341.1083) and unknown disaccharide (**7**) ([M – H][–], m/z 387.1139), with a retention time (t_R) of 0.6 min were identified as (**5**) pentose, (**6**) sucrose, and (**7**) an unknown disaccharide, respectively. Knowing that the amounts of many monosaccharides in this species were determined by Lysiuk et al. (2015) [179], it was easy to assign these

compounds to the carbohydrate class. Also, the MS spectrum of compound (9) ($[M - H]^-$, m/z 337.0923) corresponded to the coumaroylquinic acid formula $C_{16}H_{17}O_8$, and the other spectrum of compound (10) ($[M - H]^-$, m/z 367.109) – feruloylquinic formula $C_{17}H_{19}O_9$. Another ion (8) of the compound ($[M - H]^-$, m/z 243.0623) corresponds to the molecular formula $C_9H_{11}N_2O_6$, which matches to the presence of uridine. Previous studies have identified uridine in the ethanolic root extract [181] of the *Astragalus membranaceus*, (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao.

The exact structures of other compounds (11), (12), and (13) could not be determined but referring to their molecular ions $[M - H]^-$ m/z 699.43195 (t_R , 4.2 min), 695.4006 (t_R , 4.8 min) and 691.4057 (t_R , 5.4 min), which correspond to the molecular formulas $C_{37}H_{63}O_{12}$, $C_{37}H_{59}O_{12}$ and $C_{38}H_{59}O_{11}$, belong to cycloartane glycosides abundant in plant species of *Astragalus* L. genus [180].

4.2.4. Determination of enzyme activity

4.2.4.1. Evaluation of inhibition of *D. caucasica* extract on α -glucosidase enzyme

The ability of ethanolic extracts of *D. caucasica* to inhibit the enzyme was determined in two modeled enzymatic reaction systems *in vitro* (Fig. 4.2.4.1)

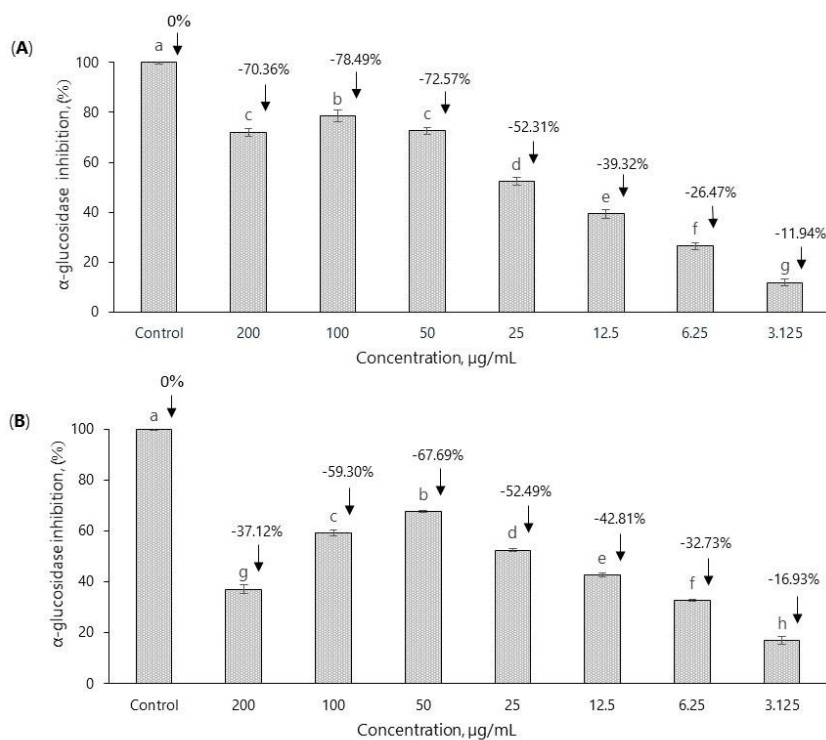


Fig. 4.2.4.1 Effect of ethanol extract of *D. caucasica* leaves on α -glucosidase activity in enzymatic reaction systems *in vitro* (A, B)

Part (A) of the figure – the reaction is complete without 0.1 M Na₂CO₃ reagent; part (B) of the figure – the reaction is complete with 0.1 M Na₂CO₃ reagent. Significant difference between modeled enzyme reaction systems by Fisher's LSD test ($p < 0.05$) after unifactorial dispersion analysis ANOVA is indicated by different letters above the bars. The inhibitory capacity of the extract is marked with a negative sign in percentage expression above the columns, the enzymatic reaction system without the inhibitor is marked with 0 per cent above the column. Mean values \pm SN of three measurements are presented

Increasing the concentration of the extracts from ≥ 3.125 $\mu\text{g/mL}$ to < 200 $\mu\text{g/mL}$ the activity of the enzyme decreased accordingly: (1) at the end of the reaction without 0.1M Na₂CO₃: from $\geq 11.94 \pm 1.22$ per cent to $< 70.36 \pm 1.52$ per cent compared to the control (2) at the end of the reaction with 0.1 M Na₂CO₃: $\geq 16.93 \pm 1.43$ to < 37.12 per cent ± 1.8 compared to the control (**Fig.4.2.4.1., (A), (B); Table 4.2.4.1.**)

When comparing the changes in the reduction of α -glucosidase activity between the two cases of the methods used in the study, a statistically notable difference ($p < 0.05$) in the inhibition ability of different extract concentrations was observed, except for the 25 $\mu\text{g/ml}$ extract concentration, in *in vitro* methods (**Fig.4.2.4.1., (A), (B); Tab. 4.2.4.1.**) In the study, using extract concentrations from $\geq 6.25 - 12.5$ $\mu\text{g/mL}$ and > 50 $\mu\text{g/mL}$, the average percent difference in enzyme activity between the applied methods was $-6.260 - -3.490$ per cent and 4.880 per cent, respectively. When increasing the concentration of the extract from ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$ and > 200 $\mu\text{g/mL}$, a highly statistically significant average percentage difference in enzyme activity change between the applied methods emerged $- 19.19$ per cent and 33.24 per cent. As it was mentioned, out of all the extract concentrations selected in the study, only one (25 $\mu\text{g/mL}$) showed statistically insignificant differences in the average per cent change in enzyme activity, which was -0.180 per cent between the applied methods. ($P = 0.8639$) (**Table 4.2.4.1.**)

Table 4.2.4.1 Difference in change in α -glucosidase activity between the two biological surveys applied

<i>D. caucasica</i> leaf extracts, $\mu\text{g/mL}$	Enzymatic reaction system		Percentage difference	<i>p</i> -value
	With 0.1 M Na ₂ CO ₃	Without 0.1 M Na ₂ CO ₃		
3.125	16.93 ± 1.43	11.94 ± 1.22	-4.990	$P = 0.01$
6.25	32.73 ± 0.54	26.47 ± 1.43	-6.260	$P = 0.0021$
12.5	42.81 ± 0.67	39.32 ± 1.75	-3.490	$P = 0.0321$
25	52.49 ± 0.47	52.31 ± 1.64	-0.180	$P = 0.8639$
50	67.69 ± 0.26	72.57 ± 1.52	4.880	$P = 0.0054$
100	59.30 ± 1.1	78.49 ± 2.39	19.19	$P = 0.0002$
200	37.12 ± 1.8	70.36 ± 1.52	33.24	$P < 0.0001$

The values are presented as the means \pm standard deviations (SD, $n = 3$); statistical evaluation of the differences between the values is indicated by paired two sample *t*-test by comparing enzymatic reactions before and after adding 0.1 M Na₂CO₃.

The different response to inhibition could be caused by the compounds and their concentration in the extracts, the relationship between the sodium carbonate response

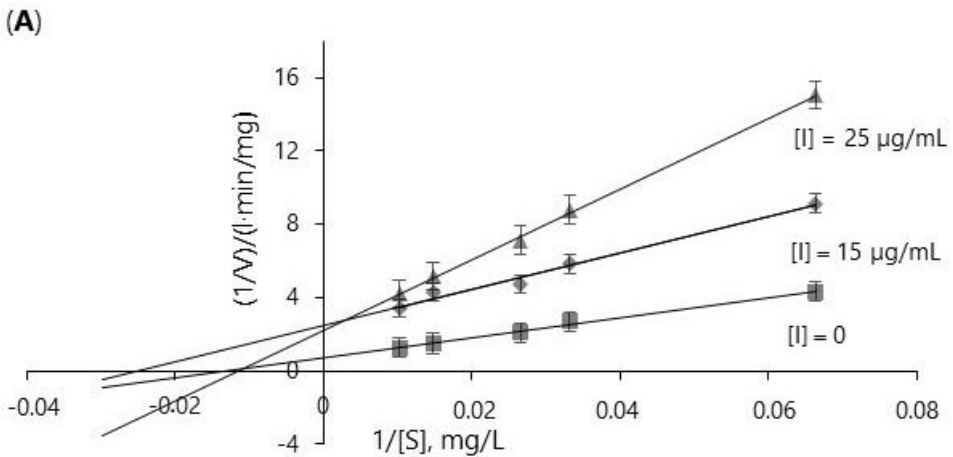
and other reasons, the exact explanations of which could not be found in the scientific literature.

4.2.4.1.1. Kinetic modeling of enzymatic reactions

In order to estimate the kinetic constants (K_m , V_{max}), the model of the interaction between the enzyme (E) and the substrate (S) related to the conversion of the product (P) ($S \xrightarrow{E} P$) was constructed as it was done in the case of the determination of the percentage activity of α -glucosidase, only the composition of the mixture for each enzymatic reaction differed in the amount of substrate.

According to the Lineweaver-Burke line graph, the change in reaction rate $1/V$ versus $1/[pNPG]$, expressed by the following equations: (1) in the absence of an inhibitor in the reaction mixture: $y = 55.052x + 0.7009$, $r^2 = 0.9935$; (2) adding 15 $\mu\text{g/mL}$ concentration of leaf ethanolic extract/inhibitor: $y = 99.316x + 2.482$, $r^2 = 0.9852$; adding 25 $\mu\text{g/mL}$ concentration of leaf ethanolic extract/inhibitor: $y = 193.4x + 2.2253$, $r^2 = 0.9989$ (**Fig. 4.2.4.2; part A**).

Similarly, a double reciprocal plot was constructed when the enzymatic reaction was stopped with 0.1M Na_2CO_3 (**Fig. 4.2.4.2; part B**). The following mathematical equations were obtained: (1) in the absence of an inhibitor in the reaction mixture: $y = 134.64x + 1.7083$, $r^2 = 0.9943$; adding 15 $\mu\text{g/mL}$ concentration of leaf ethanolic extract/inhibitor: $y = 188.35x + 6.3407$, $r^2 = 0.9072$; adding 25 $\mu\text{g/mL}$ concentration of leaf ethanolic extract/inhibitor: $y = 249.6x + 7.4252$, $r^2 = 0.9862$.



(B)

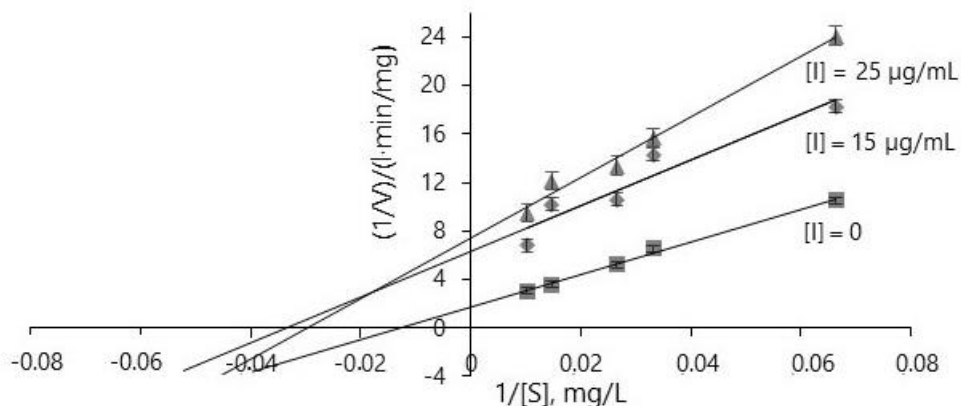


Fig. 4.2.4.2 The alleged non-competitive (mixed-type) inhibition on α -glucosidase enzyme caused by ethanolic extract of *D. caucasica* Lipsky leaves

Mathematical model of the Lineweaver-Burk line graph for different concentrations of *p*NPG (0.05–0.33 mM) (A, B). (A) – the reaction is complete without 0.1 M Na_2CO_3 reagent; (B) – the reaction is complete with 0.1 M Na_2CO_3 reagent; the symbols on the graphic refers: squares (■): enzyme-substrate interaction in a model enzyme reaction system *in vitro*; rhombuses (◆): interaction of enzyme, substrate and inhibitor (15 $\mu\text{g/mL}$) in a model enzyme reaction system *in vitro*; triangles (▲): interaction of enzyme, substrate and inhibitor (25 $\mu\text{g/mL}$) in a model enzyme reaction system *in vitro*. Mean values \pm SD of three measurements are presented.

D. caucasica leaf extracts showed the alleged non-competitive (mixed type) inhibition on the α -glucosidase enzyme (Fig. 4.2.4.2, parts (A) and (B)). During the study, in the system of II enzyme reaction (Table 4.2.4.2) under extract concentrations of 15 $\mu\text{g/mL}$ and 25 $\mu\text{g/mL}$, the $V_{\max(\text{app})}$ and $K_{m(\text{app})}$ values decreased by $0.157 \pm 0.03 \text{ mg/min/mL}$, $0.134 \pm 0.004 \text{ mg/min/mL}$, and $29.76 \pm 1.54 \text{ mg/L}$, $33.61 \pm 0.75 \text{ mg/L}$ accordingly. In contrast, in I enzyme reaction system, at 15 $\mu\text{g/mL}$ extract concentration, $V_{\max(\text{app})}$, $K_{m(\text{app})}$ values decreased by $0.402 \pm 0.041 \text{ mg/min/mL}$ and 39.984 mg/L , respectively. But at 25 $\mu\text{g/mL}$ extract concentration, $V_{\max(\text{app})}$ value decreased to $0.449 \pm 0.026 \text{ mg/min/mL}$ and $K_{m(\text{app})}$ value slightly increased to 86.91 mg/L . The obtained values of the kinetic constants showed the alleged non-competitive inhibition on the α -glucosidase enzyme, despite the significant differences in the values of the kinetic constants ($V_{\max(\text{app})}$, $K_{m(\text{app})}$) between the enzymatic reaction systems. Non-competitive (mixed type) inhibition was also confirmed by the fact that in the Lineweaver-Burk plot, $1/V$ versus $1/[S]$ lines crossing the coordinate axes intersect in the third square.

As it can be seen from the results (Table 4.2.4.2), the catalytic efficiency (CE) of α -glucosidase in different enzymatic reaction systems decreased as follows: in I enzymatic reaction from 0.007 ($[I] = 0$) to 0.005 ($[I] = 15 \mu\text{g/mL}$) and 0.004 ($[I] = 25 \mu\text{g/mL}$); in II enzymatic reaction from 0.018 ($[I] = 0$) to 0.01 ($[I] = 15 \mu\text{g/mL}$) and 0.005 ($[I] = 25 \mu\text{g/mL}$). The decrease in the rate of catalysis, along with the decrease in the concentration of the formed product, confirmed the ability of the extracts to inhibit α -glucosidase enzyme.

Shown below (**Fig. 4.2.4.3**) is a mathematical model of the Lineweaver-Burk line graph, which indicates the alleged competitive inhibition on the α -glucosidase enzyme caused by the rhizome extract of *D. caucasica*. The Lineweaver-Burk inhibition plots of $1/V$ versus $1/[pNPG]$ gave the following equations: (1) in the absence of inhibitor in the reaction mixture $y = 30.698x + 0.9772$, $r^2 = 0.9292$; (2) adding 200 $\mu\text{g/mL}$ rhizome ethanolic extract/inhibitor: $y = 69.91x + 1.0085$, $r^2 = 0.9833$; adding 500 $\mu\text{g/mL}$ rhizome ethanolic extract/inhibitor: $y = 80.37x + 0.967$, $r^2 = 0.966$.

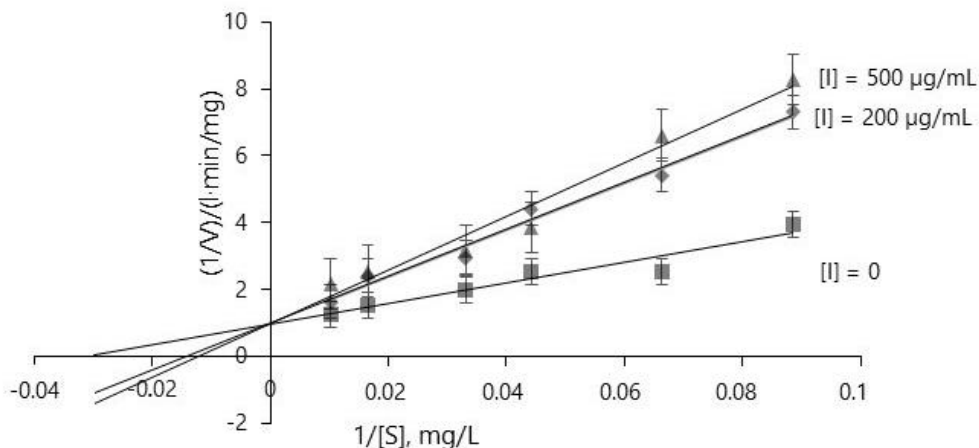


Fig. 4.2.4.3 The alleged competitive inhibition on α -glucosidase enzyme caused by *D. caucasica* Lipsky rhizome extract

Mathematical model of the Lineweaver-Burke line graph for different concentrations of *pNPG* (0.004–0.33 mM). The symbols on the graphic refers: squares (■): enzyme-substrate interaction in a model enzyme reaction system *in vitro*; rhombuses (◆): interaction of enzyme, substrate and inhibitor (200 $\mu\text{g/mL}$) in a model enzyme reaction system *in vitro*; triangles (▲): interaction of enzyme, substrate and inhibitor (500 $\mu\text{g/mL}$) in a model enzyme reaction system *in vitro*. Mean values \pm SD of three measurements are presented.

The rhizome extract of *D. caucasica* showed a competitive type of inhibition with a K_i value of 165.97 to 304.32 $\mu\text{g/mL}$ at 200 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$ extract concentrations, respectively. With increasing extract concentration, $K_{m(app)}$ values gradually increased from 69.34 ± 0.31 to 83.33 mg/mL , and $V_{max(app)}$ – 0.99 ± 0.22 and 1.034 ± 0.38 $\text{mg/L}\cdot\text{min}$ – hardly changed (**Table 4.2.4.2**). An increased value of K_m and unchanged V_{max} indicated a type of competitive inhibition [152].

Table 4.2.4.2 Kinetic parameters of α -glucosidase inhibition kinetics

Interaction pattern of a model enzyme reaction system	Values of kinetic parameters	Kinetic parameters		Mode
		Enzymatic reaction system I ¹	Enzymatic reaction system II ²	
I	II	III	IV	V
Inhibitor: <i>D. caucasica</i> Lipsky leaf extracts				
Enzyme/substrate interaction model	K_m , mg/L	78.55 ± 0.11	80.873 ± 0.26	
	V_{max} , mg/L·min	1.43 ± 0.183	0.597 ± 0.07	
	CE	0.018	0.007	
Enzyme/substrate/inhibitor interaction model. Extract, 15 µg/mL	$K_{m(app)}$, mg/L	39.984 ± 0.31	29.761 ± 1.54	Mixed-type
	$V_{max(app)}$, mg/L·min	0.402 ± 0.041	0.157 ± 0.03	
	K_i , µg/mL	5.86	5.35	
	CE	0.01	0.005	
Enzyme/substrate/inhibitor interaction model. Extract, 25 µg/mL	$K_{m(app)}$, mg/L	86.91 ± 0.16	33.615 ± 0.75	Mixed-type
	$V_{max(app)}$, mg/L·min	0.449 ± 0.026	0.134 ± 0.004	
	K_i , µg/mL	11.44	7.23	
	CE	0.005	0.004	
Inhibitor: <i>D. caucasica</i> Lipsky tubers extracts				
Enzyme/substrate interaction model	K_m , mg/L	-	31.446 ± 0.28	
	V_{max} , mg/L·min	-	1.023 ± 0.23	
	CE	-	0.032	
Enzyme/substrate/inhibitor interaction model. Extract, 200 µg/mL	$K_{m(app)}$, mg/L	-	69.34 ± 0.31	Competitive
	$V_{max(app)}$, mg/L·min	-	0.991 ± 0.22	
	K_i , µg/mL	-	165.97	
	CE	-	0.014	
Enzyme/substrate/inhibitor interaction model. Extract, 500 µg/mL	$K_{m(app)}$, mg/L	-	83.125 ± 0.51	Competitive
	$V_{max(app)}$, mg/L·min	-	1.034 ± 0.38	
	K_i , µg/mL	-	304.32	
	CE	-	0.011	

Enzymatic reaction system I¹ – the reaction is completed without 0.1 M Na₂CO₃ reagent; enzymatic reaction system II² – the reaction is completed with 0.1 M Na₂CO₃ reagent.

4.2.4.2. Evaluation of inhibition extracts of *D. nipponica* extracts on α -glucosidase enzyme

Extracts of *D. nipponica* were similarly studied. When investigating the inhibitory ability of the ethanolic extracts of *D. nipponica* (3.125 – 200 µg/mL) on

α -glucosidase enzyme, the diagrams below (**Fig. 4.2.4.4**) show a statistically significant difference ($p < 0.05$) in all the modeled enzymatic reaction systems compared to the control.

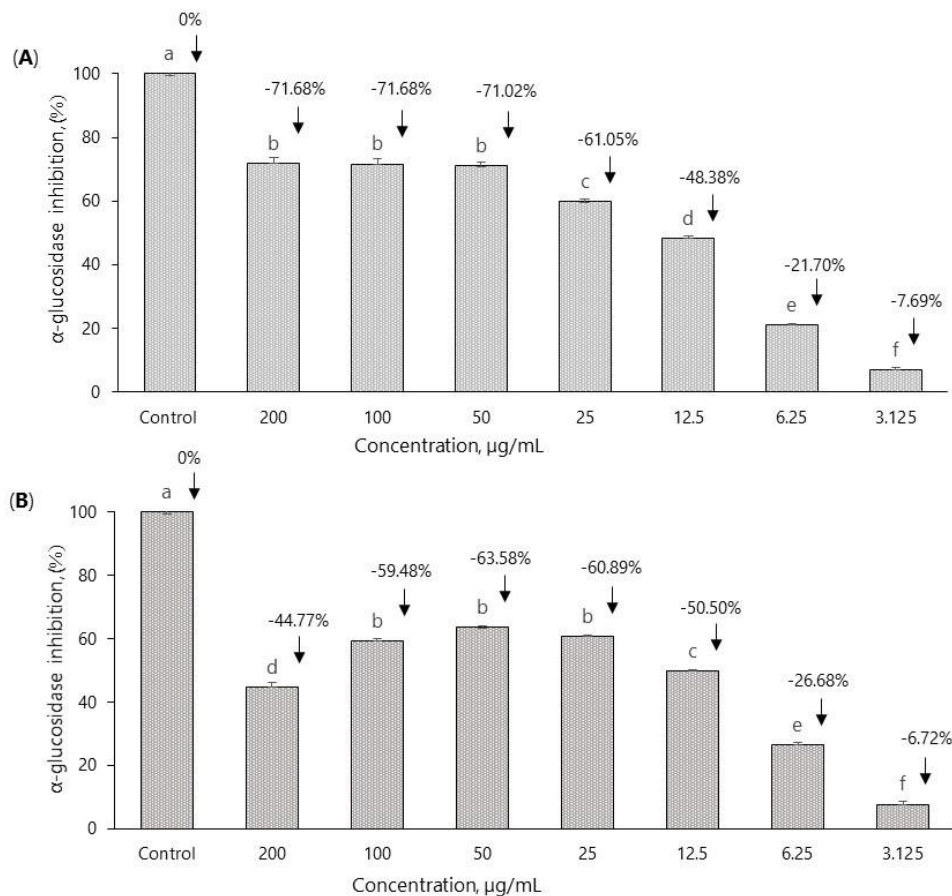


Fig. 4.2.4.4 Impact of ethanolic extract of *D. nipponica* leaves on α -glucosidase activity in enzymatic reaction systems *in vitro* (**A, B**)

Part (**A**) of the figure – the reaction is complete without 0.1 M Na_2CO_3 reagent; part (**B**) of the figure – the reaction is complete with 0.1 M Na_2CO_3 reagent. Significant difference between modeled enzyme reaction systems by Fisher's LSD test ($p < 0.05$) after unifactorial dispersion analysis ANOVA is indicated by different letters above the bars. The inhibitory capacity of the extract is marked with a negative sign in percentage expression above the columns, the enzymatic reaction system without the inhibitor is marked with 0% per cent above the column. Mean values \pm SD of three measurements are presented.

Increasing the extract concentrations from $\geq 3.125 \mu\text{g/mL}$ to $< 200 \mu\text{g/mL}$ resulted in a corresponding decrease in enzyme activity in all simulated enzymatic reaction systems (**Fig. 4.2.4.4**, parts (**A**) and (**B**)) compared to the control.

Part (**A**) of the diagram (**Fig. 4.2.4.4**) shows a corresponding decrease in α -glucosidase activity from $\geq 7.69 \pm 1.55$ per cent to $< 61.05 \pm 1.52$ per cent with

increasing extract concentrations from ≥ 3.125 to < 25 $\mu\text{g/mL}$ compared to the control. However, increasing the extract concentration from ≥ 50 $\mu\text{g/mL}$ to < 200 $\mu\text{g/mL}$ did not change the enzyme activity and ranged from 71.02 to 71.68 per cent, accordingly. This result showed that enzyme activity was impacted by the extract. A slightly different decrease in enzyme activity than that shown in part (A) of the diagram is seen in part (B). When increasing the extract concentrations from ≥ 3.125 $\mu\text{g/mL}$ to < 12.5 $\mu\text{g/mL}$, α -glucosidase activity decreased from $\geq 6.72 \pm 1.41$ per cent respectively to $< 50.50 \pm 3.29$ per cent compared to the control. Further increasing the extract concentration from ≥ 25 $\mu\text{g/mL}$ to < 100 $\mu\text{g/mL}$, the decrease in α -glucosidase activity was almost unchanged and ranged from $\geq 60.89 \pm 1.88$ per cent to $< 59.48 \pm 0.76$ per cent accordingly, compared to the control. However, increasing the extract concentration to ≤ 200 $\mu\text{g/mL}$ decreased the α -glucosidase activity by 44.77 ± 1.98 per cent compared to the control, but not as expected.

When comparing the changes in the reduction of α -glucosidase activity between the two methods applied in the study, a statistically notable percentage difference was found when increasing the extract concentration from ≥ 50 $\mu\text{g/mL}$ to < 200 $\mu\text{g/mL}$, in *in vitro* methods. The obtained results are presented in Table 4.2.4.3 For the latter concentrations, the average per cent difference in the change in enzyme activity between the applied methods was 7.44 per cent, 12.20 per cent and 26.91 per cent, respectively. Meanwhile, lower extract concentrations were not statistically significantly different: < 3.125 $\mu\text{g/mL}$: 0.96 per cent ($P = 0.4719$); 6.25 $\mu\text{g/mL}$: -4.980 per cent ($P = 0.129$); 12,5 $\mu\text{g/mL}$: -2.12 per cent ($P = 0.4054$) > 25 $\mu\text{g/mL}$: -0.16 per cent ($P = 0.9143$).

Table 4.2.4.3 Difference in change in α -glucosidase activity between the two biological surveys applied

<i>D. nipponica</i> leaf extracts, $\mu\text{g/mL}$	Enzymatic reaction model system		Percentage difference	<i>p</i> -value
	With 0.1M Na_2CO_3	Without 0.1M Na_2CO_3		
3.125	6.72 ± 1.41	7.68 ± 1.55	0.960	$P = 0.4719$
6.25	26.68 ± 2.99	21.70 ± 3.39	-4.980	$P = 0.129$
12.5	50.50 ± 3.29	48.38 ± 2.19	-2.120	$P = 0.4054$
25	60.89 ± 1.88	61.05 ± 1.52	-0.16	$P = 0.9143$
50	63.58 ± 1.96	71.02 ± 1.69	7.44	$P = 0.0076$
100	59.48 ± 0.76	71.68 ± 1.16	12.20	$P = 0.0001$
200	44.77 ± 1.98	71.68 ± 0.68	26.91	$P < 0.0001$

The values are presented as the means \pm standard deviations (SD, $n = 3$); statistical evaluation of the differences between the values is indicated by paired two sample *t*-test by comparing enzymatic reactions before and after adding 0.1M Na_2CO_3 .

After evaluating the inhibition of α -glucosidase caused by the extract, it can be assumed that the 0.1M Na_2CO_3 reagent contained in the enzyme reaction mixtures can significantly change the enzyme activity readings *in vitro*, as in the previous study with *D. caucasica* leaf extracts. It can also be concluded that it is influenced by the compounds present in the extract and their concentrations, since significant differences in inhibition between the reaction systems become particularly

pronounced with increasing concentrations of the extract. In the literature, there was no information about possible changes in the enzyme activity readings *in vitro* when studying the inhibition of α -glucosidase caused by herbal preparations by this method. There is also not much research done on completing the reaction without the Na_2CO_3 reagent. Trifonova et al. (2021) [135] and Stoilova et al. (2017) [136] investigated the effectiveness of plant extracts in inhibiting α -glucosidase enzyme by classical chromogenic method without using Na_2CO_3 reagent. These insights can be very beneficial for similar studies with plant extracts or plant-derived products.

4.2.4.2.1. Kinetic modeling of enzymatic reactions

By analogy, Lineweaver-Burk line graph was applied to determine the dependence of the enzymatic reaction rate $1/V$ on the substrate $1/[p\text{NPG}]$ calculating the values of the kinetic constants (V_{max} , K_m) while determining the assumed type of inhibition for α -glucosidase inhibition.

According to Lineweaver–Burk mathematical graph, the change in reaction rate $1/V$ versus $1/[p\text{NPG}]$ is expressed by the following enzyme reaction equations: (1) in the absence of an inhibitor in the reaction mixture: $y = 49.172x + 0.5981$, $r^2 = 0.9853$; adding 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration of leaf ethanolic extract/inhibitor: $y = 200.95x + 1.0672$, $r^2 = 0.9872$ (**Fig. 4.2.4.5, A**); (2) in the absence of an inhibitor in the reaction mixture: $y = 114.08x + 0.5349$, $r^2 = 0.975$, with the addition of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rhizome ethanolic extract/inhibitor: $y = 188.05x + 1.0962$, $r^2 = 0.9813$ (**Fig. 4.2.4.6**) Similarly, a double reciprocal graph was formed when the enzymatic reaction was stopped using 0.1M Na_2CO_3 (**Fig. 4.2.4.5, B**). The following mathematical equations were expressed: (1) in the absence of an inhibitor in the reaction mixture $y = 125.15x + 1.2148$, $r^2 = 0.9887$; adding 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethanolic leaf extract/inhibitor: $y = 412.31x + 2.328$, $r^2 = 0.9982$.

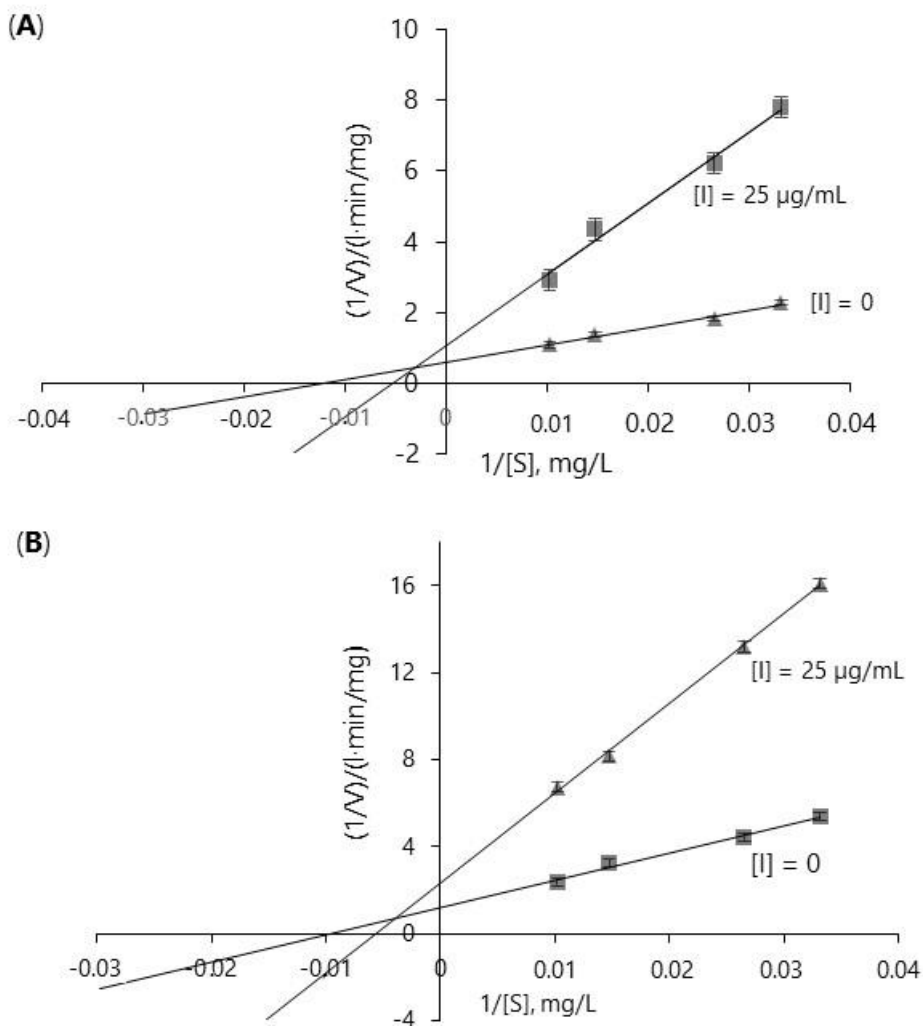


Fig. 4.2.4.5 The alleged non-competitive (mixed type) inhibition on α -glucosidase enzyme caused by ethanolic extract of *D. nipponica* Makino leaves

Mathematical model of the Lineweaver-Burk line graph for different concentrations of *p*NPG (0.1–0.33 mM) (A, B). (A) – the reaction is completed without 0.1M Na_2CO_3 reagent; the symbols on the graphic refer: triangles (▲): enzyme-substrate interaction in a model enzyme reaction system *in vitro*; squares (■): interaction of enzyme, substrate, and inhibitor (25 $\mu\text{g/mL}$) in a model enzyme reaction system *in vitro*. (B) – the reaction is complete with 0.1M Na_2CO_3 reagent; the symbols on the graphic refer: squares (■): enzyme-substrate interaction in a model enzyme reaction system *in vitro*; triangles (▲): interaction of enzyme, substrate, and inhibitor (25 $\mu\text{g/mL}$) in a model enzyme reaction system *in vitro*. Mean values \pm SD of three measurements are presented.

The extract of *D. nipponica* leaves (**Fig. 4.2.4.5, parts (A) and (B)**) showed the alleged non-competitive (mixed type) inhibition on α -glucosidase enzyme. Enzymatic reactions in different systems (**Table 4.2.4.4**) at 25 $\mu\text{g/mL}$ extract concentration $K_{m(app)}$, $K_{m(app)}$ values increased by $177.1 \pm 0.08 \text{ mg/mL}$, $188.3 \pm 2.2 \text{ mg/mL}$, and $V_{max(app)}$, $V_{max(app)}$ values decrease by $0.43 \pm 0.006 \text{ mg/min/mL}$, $0.94 \pm 0.13 \text{ mg/min/mL}$, respectively, compared to the control. This inhibition profile indicated that the inhibitor binds with both the free enzyme (E) and the enzyme-substrate (ES) complex [150]. Similar to leaves, rhizome extract of *D. nipponica* (**Fig. 4.2.4.6**) showed mixed non-competitive inhibition on α -glucosidase enzyme. Non-competitive (mixed type) inhibition was also confirmed by the fact that in the line graph of Lineweaver-Burk $1/V$ versus $1/[S]$ the line rotates around the abscissa axis $-1/K_m$ [151 p. 114].

Table 4.2.4.4 Kinetics constants for α -glucosidase inhibition by *D. nipponica* leaf and tuber extracts.

Inhibitor	$K_{m(app)}$, mg/L	$V_{max(app)}$, mg/L·min	K_i , $\mu\text{g/mL}$	Inhibition type
D.N leaves 25 $\mu\text{g/mL}$ extract	188.29 ± 5.8	0.94 ± 0.35	31.87	
	$177.11 \pm 0.7^*$	$0.43 \pm 0.06^*$	27.23^*	Mix-type
Control ¹	82.21 ± 4.5	1.67 ± 0.28		
	$103.02 \pm 1.3^*$	$0.82 \pm 0.13^*$		
D.N tubers 500 $\mu\text{g/mL}$ extract	171.54 ± 8.25	0.912 ± 0.45	476.5	Mix-type
	213.67 ± 12.92	1.869 ± 0.38		

¹ K_m or V_{max} – the absence of inhibitor in enzymatic reaction systems

² $K_{m(app)}$ or $V_{max(app)}$ – identical kinetic parameters as K_m and V_{max} only in the presence of inhibitor

*Symbol – enzymatic reaction system with 0.1 M Na_2CO_3

The values are presented as the means \pm standard deviations (SD, n = 3).

D. nipponica rhizome extract (**Fig. 4.2.4.5**) inhibited α -glucosidase activity as did the leaf extract in a non-competitive manner. This can be explained by the decreasing values of $K_{m(app)}$ and $V_{max(app)}$ kinetic constants compared to the control. Also, in the line graph of Lineweaver-Burk, the $1/V$ versus $1/[S]$ lines crossing the coordinate axes and intersecting in the third square confirmed the mixed type of inhibition [150, 152].

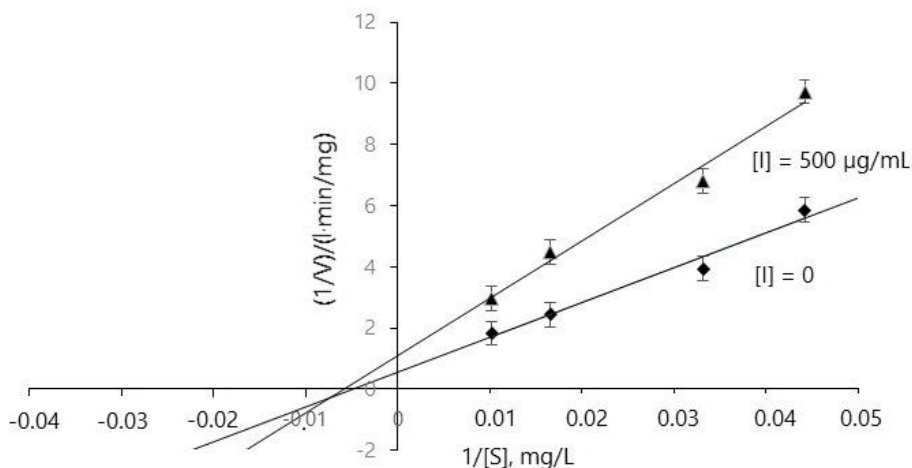


Fig. 4.2.4.6 The alleged non-competitive (mixed-type) inhibition on α -glucosidase enzyme caused by ethanol extract of *D. nipponica* Makino) rhizomes

Mathematical model of the Lineweaver-Burk line graph for different concentrations of *p*NPG (0.075–0.33 mM). The symbols on the graphic refer: rhombuses (◆): enzyme-substrate interaction in a model enzyme reaction system *in vitro*; triangles (▲): interaction of enzyme, substrate and inhibitor (500 µg/mL) in a model enzyme reaction system *in vitro*. Mean values \pm SD of three measurements are presented.

Summarizing the results of the study, it can be concluded that the studied *Dioscorea* spp. extracts are capable of inhibiting the α -glucosidase enzyme at very low concentrations. Such inhibitory ability of the extracts can be linked to hydroxycinnamic acids, quercetin derivatives (quercitrin and isoquercitrin), which dominated in the composition of the extracts, and their inhibitory effect has long been scientifically proven.

Applying minor changes to the biological research, it was observed that the 0.1M Na₂CO₃ reagent can significantly change the enzyme activity readings *in vitro*, especially at higher extract concentrations. During the study, it was found that leaf extracts of *D. caucasica* and *D. nipponica* (200 µg/mL) inhibited α -glucosidase enzyme > 50 per cent, rhizoma extracts (500 µg/mL) inhibited the latter enzyme weakly: 36.79 ± 2.93 per cent by *D. caucasica* and 40.79 ± 2.71 per cent by *D. nipponica*.

4.2.4.3. Evaluation of inhibition of *A. glycyphyllos* extracts on α -glucosidase enzyme

Dry ethanolic extracts of the *Astragalus glycyphyllos* leaves were dissolved in methanol. As it can be seen from **Table 4.2.4.5** below, all selected concentrations of the extract (100–400 µg/mL) showed an inhibitory effect on α -glucosidase enzyme.

Table 4.2.4.5 Effect of ethanolic extracts of *A. glycyphyllos* L. leaves on α -glucosidase activity activity

Solvent	Concentration, $\mu\text{g/mL}$	Inhibition, per cent
Methanol/water (70/30 v/v)	100	29.12 ^a \pm 0.39
	120	34.21 ^b \pm 0.16
	160	38.67 ^c \pm 4.06
	200	43.40 ^d \pm 0.17
	360	51.04 ^e \pm 0.57
	400	54.33 ^f \pm 0.7

Significant difference between modeled enzyme reaction systems by Fisher's LSD test ($p < 0.05$) after unifactorial dispersion analysis ANOVA is indicated by different letters beside the numbers. Mean values \pm SD of three measurements are presented.

During the study, it was found that the activity of α -glucosidase enzyme depended on the concentration of *A. glycyphyllos* extract. When increasing the concentration of the extract from $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ to $< 400 \mu\text{g/mL}$, the α -glucosidase activity decreased gradually from $\geq 29.12 \pm 0.39$ to $< 54.33 \pm 0.7$ per cent compared to the control. The data obtained during the *in vitro* study showed that the *A. glycyphyllos* leaf extract at $360 \mu\text{g/mL}$ inhibited the enzyme by 51.04 ± 3.27 per cent.

4.2.4.3.1. Kinetic modeling of enzymatic reactions

In order to determine the values of the inhibition constants, the dependence of the enzyme reaction rate on the concentration of the substrate was measured in the presence and absence of the inhibitor. *A. glycyphyllos* leaf extract showed alleged non-competitive inhibition on α -glucosidase enzyme. This can be seen in the Lineweaver-Burk line graph (Fig. 4.2.4.7), which depicts the enzyme-substrate and enzyme-substrate-extract interaction model.

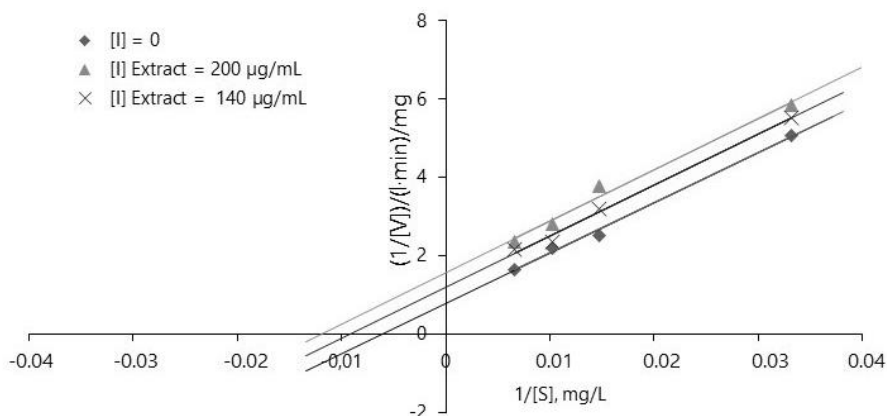


Fig. 4.2.4.7 The alleged uncompetitive inhibition on α -glucosidase enzyme caused by ethanol extract of *A. glycyphyllos* leaf

Mathematical model of the Lineweaver-Burke line graph for different concentrations of *p*NPG (0.1–0.5 mM). The symbols on the graphic refer: squares (♦): enzyme-substrate interaction in a model enzyme reaction system *in vitro*; (X): interaction of enzyme, substrate, and inhibitor (140 µg/mL) in a model enzyme reaction system *in vitro*; triangles (▲): interaction of enzyme, substrate, and inhibitor (200 µg/mL) in a model enzyme reaction system *in vitro*. Mean values ± SD of three measurements are presented.

During the study, increasing the concentration of the extract, the values of the kinetic parameters decreased accordingly: $K_{m(app)}$: <140 µg/mL: 109.09 ± 22.40 ; > 200 µg/mL: 84.09 ± 8.75 ; $V_{max(app)}$: <140 µg/mL: 0.639 ± 0.02 mg/min/mL; > 200 µg/mL: 0.834 ± 0.03 mg/min/mL compared to control. The decrease in the values of the kinetic parameters and the non-intersecting lines on the coordinate axis are characteristic of the alleged uncompetitive inhibition. The latter inhibition profile indicates that the inhibitor binds only with the enzyme-substrate (ES) complex, forming an inactive enzyme-substrate-inhibitor (ESI) complex.

4.2.4.4. Evaluation of inhibition of extracts of *D. caucasica* on α -amylase enzyme

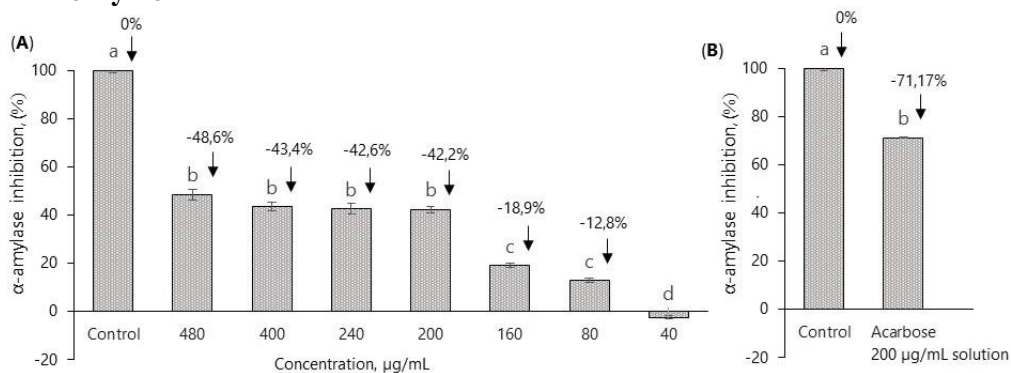


Fig. 4.2.4.8 Effect of ethanolic extract of *D. caucasica* Lipsky leaves on α -amylase activity (A) and the impact of aqueous acarbose solution on α -amylase activity (B) in enzymatic reaction systems

A row of columns in a bar chart (A) with the last column below the horizontal line indicate that a concentration of 40 µg/mL leaf extract is unable to inhibit the enzyme activity. Significant difference between modeled enzyme reaction systems by Fisher's LSD test ($p < 0.05$) after unifactorial dispersion analysis ANOVA is indicated by different letters above the bars. The inhibitory capacity of the extract is marked with a negative sign in percentage expression above the columns, the enzymatic reaction system without the inhibitor is marked with 0 per cent above the column. Mean values ± SE of three measurements are presented.

During the action of the enzyme and inhibitor, it is possible to additionally regulate the course of the enzymatic reaction. This can be seen in Fig. 4.2.4.8 (as well as in previous inhibition studies) inhibitor concentration-dependent enzyme activity. Increasing extract concentrations from ≥ 40 µg/mL to < 480 µg/mL enzyme activity decreased correspondingly in all modeled enzymatic reaction systems (Fig. 4.2.4.8) compared to the control, except for 40 µg/mL extract concentration, in *in vitro* studies. However, when comparing the change in α -amylase activity between enzymatic

reaction mixtures containing different concentrations of the extract, the percentage of enzyme activity decreased from $\geq 12.8 \pm 0.9$ per cent to $< 42.2 \pm 1.3$ per cent respectively, increasing the extract concentration from $\geq 80 \mu\text{g/ml}$ to $< 200 \mu\text{g/mL}$. When increasing the concentration of the extract from $\geq 200 \mu\text{g/mL}$ to $< 480 \mu\text{g/mL}$, α -amylase activity did not change significantly and ranged from 42.6 ± 2.3 per cent to 48.6 ± 2.2 per cent. Such a gradual decrease in enzyme activity *in vitro* indicated sufficient saturation of the inhibitor. The results also showed that the aqueous solution of acarbose reduced the activity of the enzyme by $\sim 71.17 \pm 0.4$ per cent at a concentration of $200 \mu\text{g/mL}$. From these data, it can be concluded that *D. caucasica* leaf extract is effective in inhibiting α -amylase enzyme, but statistically significantly ($p < 0.05$) less than aqueous solution of acarbose.

4.2.4.5. Evaluation of inhibition of extracts of *D. nipponica* on α -amylase enzyme

Similarly to the studies of *D. caucasica*, a change in α -amylase activity dependent on increasing extract concentration is observed in all simulated enzymatic reaction mixtures.

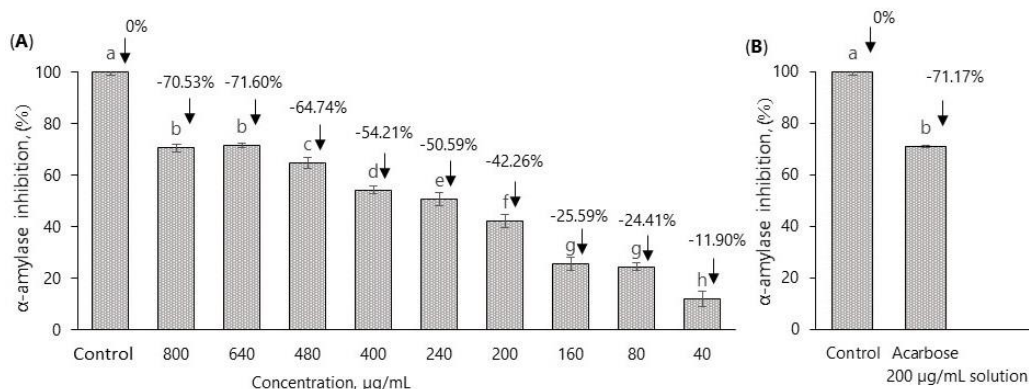


Fig. 4.2.4.9 Effect of ethanolic extract of *D. nipponica* Makino leaves on α -amylase activity (A) and the impact of aqueous acarbose solution on α -amylase activity (B) in enzymatic reaction systems

Significant difference between modeled enzyme reaction systems by Fisher's LSD test ($p < 0.05$) after unifactorial dispersion analysis ANOVA is indicated by different letters above the bars. The inhibitory capacity of the extract is marked with a negative sign in percentage expression above the columns, the enzymatic reaction system without the inhibitor is marked with 0 per cent above the column. Mean values \pm SE of three measurements are presented.

Enzyme activity decreased correspondingly by increasing the concentration of the extracts: $< 40 \mu\text{g/mL}$: 11.9 ± 2.94 per cent; $80 \mu\text{g/mL}$: 24.41 ± 1.49 per cent; $160 \mu\text{g/mL}$: 25.59 ± 2.73 ; $200 \mu\text{g/mL}$: 42.26 ± 2.72 per cent; $240 \mu\text{g/mL}$: 50.59 ± 2.52 per cent; $400 \mu\text{g/mL}$: 54.21 ± 1.48 per cent; $480 \mu\text{g/mL}$: 64.74 ± 1.0 per cent; $640 \mu\text{g/mL}$: 71.6 ± 1.0 per cent; $> 800 \mu\text{g/mL}$: 70.53 ± 1.37 per cent.

The change in enzyme activity in the simulated reaction systems was statistically significantly different ($p < 0.05$) when the extract concentrations were

increased: from ≥ 40 $\mu\text{g/mL}$ to < 800 $\mu\text{g/mL}$, compared to the control; from ≥ 40 – 80 $\mu\text{g/mL}$ and ≥ 160 – 640 $\mu\text{g/mL}$ when comparing between enzyme reaction mixtures. However, the change in enzyme activity reduction was not statistically notably different ($p > 0.05$) between enzyme reaction mixtures with increasing extract concentrations: from ≥ 80 $\mu\text{g/mL}$ to < 160 $\mu\text{g/mL}$ and from ≥ 640 $\mu\text{g/mL}$ to < 800 $\mu\text{g/mL}$. From an enzymological point of view, the enzyme reaction system gradually became saturated with an inhibitor capable of reducing enzyme activity by > 50 per cent. The data obtained during the *in vitro* study show that the *D. nipponica* leaf extract reduced α -amylase activity with an IC_{50} reached 437.96 $\mu\text{g/mL}$. From these data, it can be concluded that *D. nipponica* leaf extract was a potent inhibitor of α -amylase, but not significantly stronger than the aqueous solution of acarbose. The latter decreased the enzyme activity by $\sim 71.17 \pm 0.4$ per cent at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.4.6. Evaluation of inhibition of extracts of *A. glycyphyllos* on α -amylase enzyme

Evaluation of the inhibition of *A. glycyphyllos* extracts on α -amylase enzyme was also investigated by applying the Miller reaction [145].

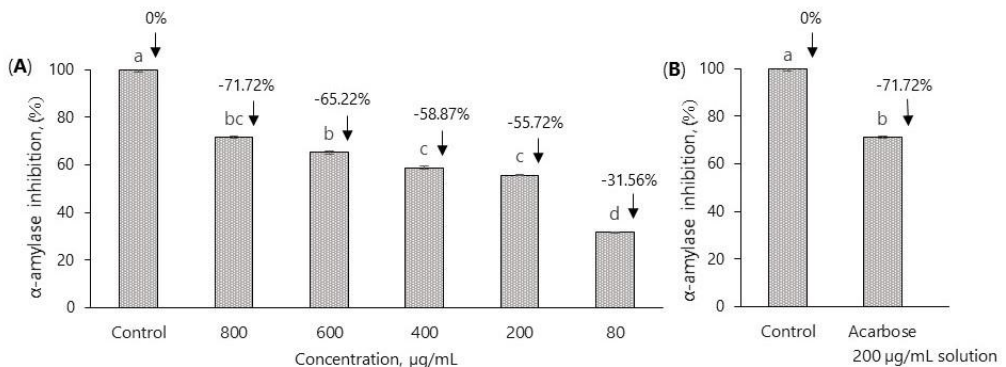


Fig. 4.2.4.10 Effect of ethanolic extract of *A. glycyphyllos* leaves on α -amylase activity (A) and the impact of aqueous acarbose solution on α -amylase activity (B) in enzymatic reaction systems *in vitro*

Significant difference between modeled enzyme reaction systems by Fisher's LSD test ($p < 0.05$) after unifactorial dispersion analysis ANOVA is indicated by different letters above the bars. The inhibitory capacity of the extract is marked with a negative sign in percentage expression above the columns, the enzymatic reaction system without the inhibitor is marked with 0 per cent above the column. Mean values \pm SE of three measurements are presented.

Enzyme activity decreased correspondingly by increasing extract concentrations < 80 $\mu\text{g/mL}$: 31.56 ± 0.18 per cent; 200 $\mu\text{g/mL}$: 55.72 ± 0.78 per cent; 400 $\mu\text{g/mL}$: 58.87 ± 0.55 per cent; 600 $\mu\text{g/mL}$: 65.22 ± 0.50 per cent; > 800 $\mu\text{g/mL}$: 71.72 ± 0.48 per cent. The highest decrease in enzyme activity was determined at 800 $\mu\text{g/mL}$ extract concentration. The change in enzyme activity in the simulated reaction systems was statistically significantly different ($p < 0.05$) when the extract

concentrations were increased: from $\geq 80 \mu\text{g/mL}$ to $< 800 \mu\text{g/mL}$, compared to the control; from $\geq 80 - 200 \mu\text{g/mL}$, from $\geq 400 - 600 \mu\text{g/mL}$ and between $400 \mu\text{g/mL}$ and $800 \mu\text{g/mL}$ extract concentrations when compared between enzymatic reaction mixtures. However, the change in enzyme activity reduction was not statistically notably different ($p > 0.05$) between enzyme reaction mixtures with increasing extract concentrations: from $\geq 200 \mu\text{g/mL}$ to $< 400 \mu\text{g/mL}$ and from $\geq 600 \mu\text{g/mL}$ to $< 800 \mu\text{g/mL}$.

4.2.4.7. Evaluation of inhibition of *D. caucasica* extracts on ACE enzyme

Considering which compounds were found to dominate *Dioscorea* spp. species, further studies evaluated the effect of the extracts on ACE activity using spectrophotometric method [142, 143, 146]. Medicine captopril, prepared as a 1mg/ml solution in distilled water [148], was selected as a positive control.

When investigating the inhibitory ability of ethanolic extracts of *D. caucasica* (250–1,250 $\mu\text{g/mL}$) for ACE enzyme (Fig. 4.2.4.11), a statistically significant difference ($p < 0.05$) was obtained in all the modeled enzymatic reaction systems, compared to the control.

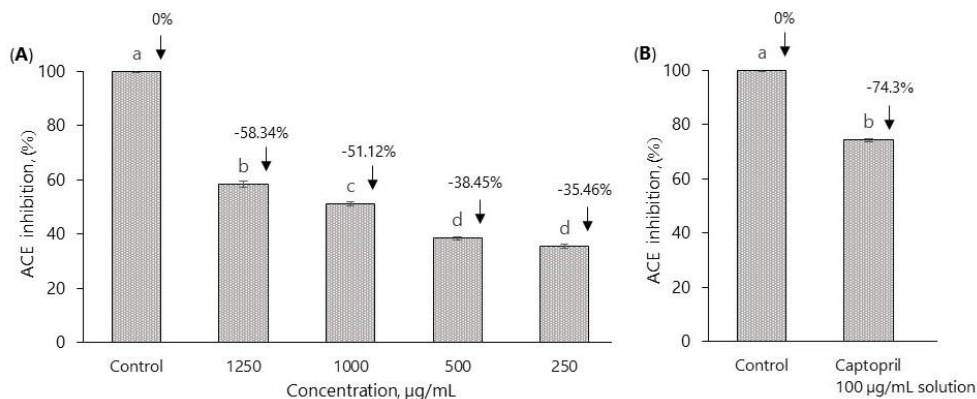


Fig. 4.2.4.11. Effect of ethanolic extract of *D. caucasica* leaves on ACE activity (A) and impact of captopril aqueous solution on ACE activity (B) in enzymatic reaction systems *in vitro*

Significant difference between modeled enzyme reaction systems by Fisher's LSD test ($p < 0.05$) after unifactorial dispersion analysis ANOVA is indicated by different letters above the bars. The inhibitory capacity of the extract is marked with a negative sign in percentage expression above the columns, the enzymatic reaction system without the inhibitor is marked with 0 per cent above the columns. Mean values \pm SE of three measurements are presented.

Enzyme activity decreased correspondingly by increasing extract concentrations: $< 250 \mu\text{g/mL}$: 35.46 ± 0.76 per cent; $500 \mu\text{g/mL}$: 38.45 ± 0.52 per cent; $1,000 \mu\text{g/mL}$: 51.12 ± 0.81 per cent; $> 1,250 \mu\text{g/mL}$: 58.34 ± 1.01 per cent, enzyme activity decreased compared to the control. However, when comparing the change in ACE activity between enzymatic reaction mixtures containing different extract concentrations, the enzyme activity decreased statistically notably from $\geq 38.45 \pm 0.52$ per cent to $< 58.34 \pm 1.01$ per cent, increasing the extract concentration

from $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ to $< 1,250 \mu\text{g/mL}$, respectively. Additionally, there was no statistically significant difference in the decrease of ACE activity when the reaction mixtures were exposed to 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$ extract concentrations.

4.2.4.8. Evaluation of the inhibition of *D. nipponica* extracts on ACE enzyme

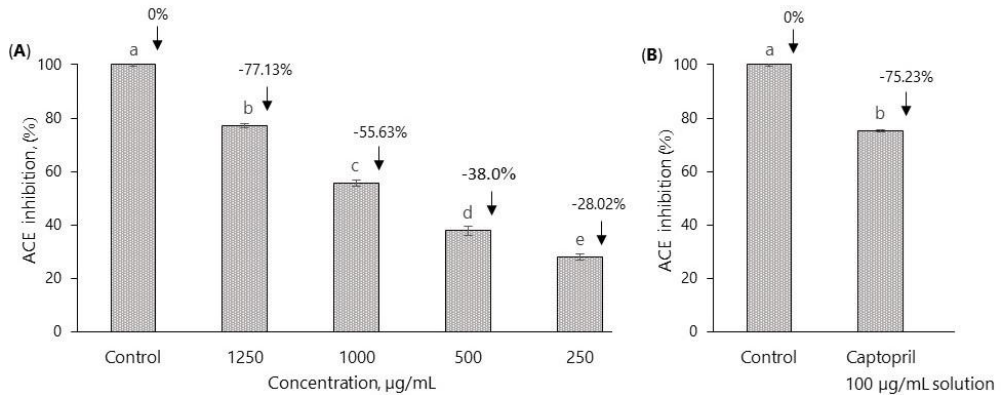


Fig. 4.2.4.12. Effect of ethanol extract of *D. nipponica* leaves on ACE activity (A) and impact of captopril aqueous solution on ACE activity (B) in enzymatic reaction systems *in vitro*

Significant difference between modeled enzyme reaction systems by Fisher's LSD test ($p < 0.05$) after unifactorial dispersion analysis ANOVA is indicated by different letters above the bars. The inhibitory capacity of the extract is marked with a negative sign in percentage expression above the columns, the enzymatic reaction system without the inhibitor is marked with 0 per cent above the columns. Mean values \pm SE of three measurements are presented.

The obtained results showed that increasing the extract concentrations: $< 250 \mu\text{g/mL}$: 28.02 ± 1.17 per cent; $500 \mu\text{g/mL}$: 38.0 ± 1.74 per cent; $1,000 \mu\text{g/mL}$: 55.63 ± 1.3 per cent; $> 1,250 \mu\text{g/mL}$: 77.13 ± 0.78 per cent enzyme activity decreased accordingly. The change in the reduction of ACE activity was statistically significantly different ($p < 0.05$) compared to the control and increasing extract concentration: from $\geq 250 \mu\text{g/mL}$ to $< 1,250 \mu\text{g/mL}$ between the enzymatic reaction mixtures.

It has been proven that quercetin derivatives, tannins, and peptides are capable of inhibiting ACE activity [126, 128, 46]. Considering the the compounds of these classes were detected in plant preparations, it can be concluded that they had an effect on the reduction of ACE activity *in vitro*.

4.2.4.9. Evaluation of inhibition of *A. glycyphyllos* extracts on ACE enzyme

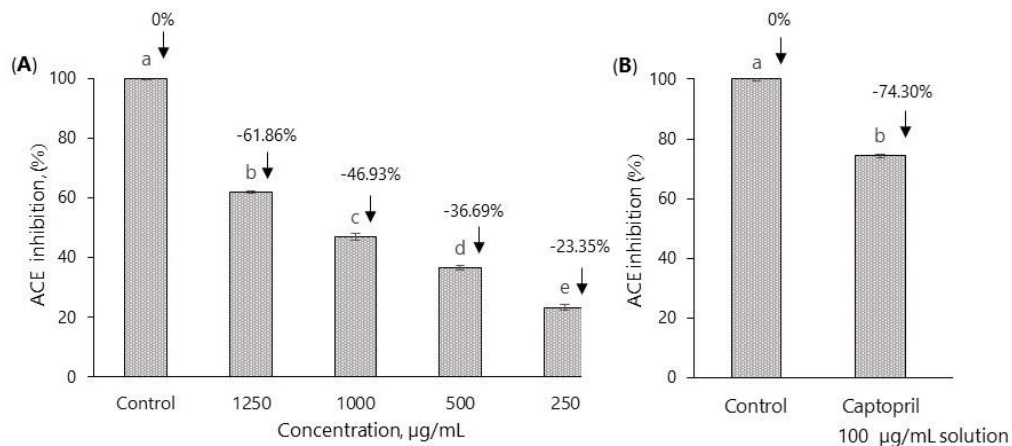


Fig. 4.2.4.13. Effect of ethanol extract of *A. glycyphyllos* leaves on ACE activity (A) and impact of captopril aqueous solution on ACE activity (B) in enzymatic reaction systems *in vitro*

Significant difference between modeled enzyme reaction systems by Fisher's LSD test ($p < 0.05$) after unifactorial dispersion analysis ANOVA is indicated by different letters above the bars. The inhibitory capacity of the extract is marked with a negative sign in percentage expression above the columns, the enzymatic reaction system without the inhibitor is marked with 0 per cent above the columns. Mean values \pm SE of three measurements are presented.

The obtained results showed that by increasing the extract concentrations: < 250 µg/ml: 23.35 ± 0.35 per cent; 500 µg/mL: 36.69 ± 1.18 per cent; $1,000$ µg/mL: 46.93 ± 0.72 ; $> 1,250$ µg/mL: 61.86 ± 1.08 per cent. Enzyme activity decreased accordingly. The activity of the enzyme in the modeled enzyme reaction systems was statistically significantly different (**Fig. 4.2.4.13, (A)**) when the extract concentration was ≥ 250 per cent to $< 1,250$ µg/mL compared to control and among themselves.

4.2.4.10. Evaluation of inhibition of *D. caucasica* extracts on AChE enzyme

To investigate the potential inhibitory effect of *D. caucasica* leaf extracts on AChE catalysis, dry powdered leaves of *D. caucasica* were dissolved in ethanol (70 per cent, C_2H_5OH). Under the influence of inhibitors (25–100 µg/mL), all enzymatic reaction mixtures showed a decrease in AChE activity. The obtained results are shown in **Table 4.2.4.7**

Table 4.2.4.7 Effect of ethanolic extracts of *D. caucasica* leaf on AChE activity

Conc. of extract, sol., µg/mL	Specific activity, µM/min/mg protein	AChE inhibition, per cent
25	0.1 ± 0.002 ^b	27.55
40	0.082 ± 0.002 ^c	40.58
50	0.078 ± 0.002 ^d	43.48
80	0.076 ± 0.002 ^e	45.31
100	0.074 ± 0.002 ^e	45.85
Control	0.138 ± 0.001 ^a	-

Significant difference between modeled enzyme reaction systems by Fisher's LSD test ($p < 0.05$) after unifactorial dispersive analysis ANOVA is indicated by different letters. Mean values ± SE of three measurements are presented.

It can be observed that the inhibitor at the concentration of 25 µg/mL slightly (>30 per cent) but statistically significantly reduced the activity of the enzyme compared to the control. Increasing the inhibitor concentration to 40 µg/mL resulted in a 40.58 per cent decrease in enzyme activity compared to the control. However, increasing the inhibitor concentration from ≥ 50 µg/mL to <100 µg/mL resulted in an insignificant decrease in AChE activity of ≥ 43.48 to < 45.85 per cent compared to the control, respectively. It should be noted that increasing the extract concentration from ≥ 80 µg/mL to < 100 µg/mL did not change the enzyme activity and ranged from 45.31 to 45.85 per cent, respectively. The maximum decrease in enzyme activity was achieved at 80 µg/mL extract concentration.

The inhibitory effect of *D. caucasica* leaf extracts on AChE enzyme was compared with 16 µg/mL donepezil hydrochloride solution. The positive control revealed a stronger inhibition of AChE (>50 per cent) than *D. caucasica* leaf extracts.

4.2.4.10.1. Kinetic modeling of enzymatic reactions

The amount of substrate for the enzymatic reaction system was selected in the range from 45 to 160 µM. According to the Lineweaver-Burk line graph, the change in reaction rate $1/V$ versus $1/[ATChI]$ is expressed by the following equations: (1) in the absence of an inhibitor in the reaction mixture: $y = 569.49 + 2.3524x$, $r^2 = 0.9874$; (2) adding leaf ethanolic extract/inhibitor of 50 µg/mL concentration: $y = 483.75 + 6.7466x$, $r^2 = 0.9755$.

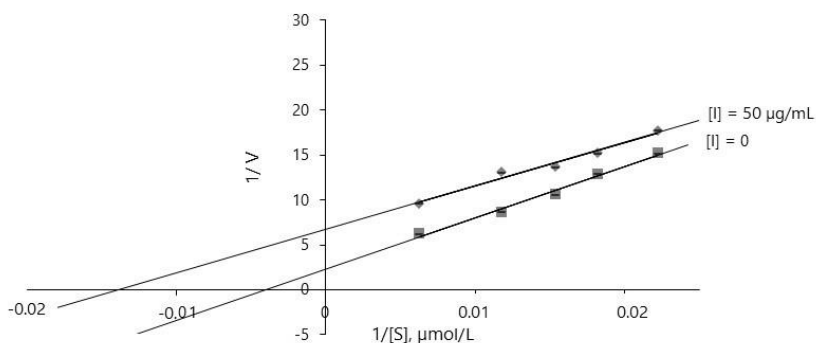


Fig. 4.2.4.14. The alleged uncompetitive inhibition of AChE enzyme caused by *D. caucasica* Lipsky leaf extract

Mathematical model of the Lineweaver-Burk line graph for different concentrations of ATChI (45–160 $\mu\text{mol/L}$ ATChI). The symbols on the graphic refer: squares (■): enzyme-substrate interaction in a model enzyme reaction system *in vitro*; rhombuses (◆): interaction of enzyme, substrate, and inhibitor (50 $\mu\text{g/mL}$) in a model enzyme reaction system *in vitro*. Mean values \pm SD of three measurements are presented.

D. caucasica leaf extract demonstrated the suggested uncompetitive inhibition on AChE (**Fig. 4.2.4.14**) enzyme. In accordance with Lineweaver-Burk line graph, in the absence of inhibitor V_{max} in the enzymatic reaction system, K_m values were $0.425 \pm 0.11 \mu\text{M/mg protein/min}$ and $242.08 \pm 15.76 \mu\text{mol/L}$, respectively; whereas, in the presence of an inhibitor of 50 $\mu\text{g/mL}$ concentration in the reaction system, $V_{max(app)}$, $K_{m(app)}$ values were significantly lower: $0.148 \pm 0.015 \mu\text{M/min/mg protein}$ and $71.56 \pm 6.55 \mu\text{mol/L}$, accordingly. This model of inhibition suggests that the inhibitor binds only to the enzyme-substrate complex [150]. The inhibitory effect of *D. caucasica* extract on AChE enzyme was compared with donepezil hydrochloride aqueous solution. The positive control reduced the enzyme activity by $\sim 70.62 \pm 2$ per cent at 16 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.4.11. Evaluation of inhibition of *D. nipponica* extracts on AChE enzyme

Taking into account the identified compounds in *D. caucasica* extracts and the obtained inhibitory capacity, inhibitor concentrations from $\geq 25 \mu\text{g/mL}$ to 80 $\mu\text{g/mL}$ were chosen for AChE activity determination studies.

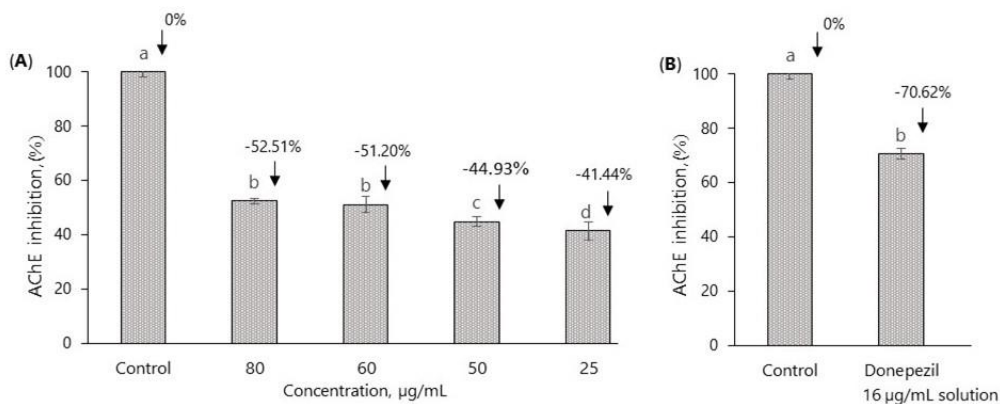


Fig. 4.2.4.15. Effect of ethanolic extract of *D. nipponica* leaves on AChE activity (A) and the impact of donepezil hydrochloride aqueous solution on AChE activity in enzymatic reaction systems *in vitro* (B)

Significant difference between modeled enzyme reaction systems by Fisher's LSD test ($p < 0.05$) after unifactorial dispersion analysis ANOVA is indicated by different letters above the bars. The inhibitory capacity of the extract is marked with a negative sign in percentage expression above the columns, the enzymatic reaction system without the inhibitor is marked with 0 per cent above the columns. Mean values \pm SE of three measurements are presented.

Under the influence of inhibitors of different concentrations on the reaction mixtures of the enzymatic system, it is possible to regulate the course of the enzymatic reaction. Increasing the extract concentration decreased the activity of the enzyme accordingly: $< 25 \mu\text{g/mL}$: 41.44 ± 3.2 per cent; $50 \mu\text{g/mL}$: 44.93 ± 1.9 per cent; $> 60 \mu\text{g/mL}$: 51.20 ± 2.9 per cent compared to the control and between reaction systems.

However, when increasing the extract concentration to $80 \mu\text{g/mL}$, the change in enzyme reduction from the previous $60 \mu\text{g/mL}$ extract concentration was not statistically significantly different ($p > 0.05$) and exhibited 52.51 ± 0.9 per cent. decrease in enzyme activity. At the same time, it is understood that the specific activity of the enzyme decreased consistently in the following sequence: $25 \mu\text{g/mL}$: $0.078 \pm 0.019 \mu\text{mol/mg protein/min}$ $> 50 \mu\text{g/mL}$: $0.074 \pm 0.023 \mu\text{mol/mg protein/min}$ $> 60 \mu\text{g/mL}$: $0.066 \pm 0.044 \mu\text{mol/mg protein/min}$ $> 80 \mu\text{g/mL}$: $0.064 \pm 0.014 \mu\text{mol/mg protein/min}$. From an enzymological point of view, the enzyme reaction system gradually became saturated with an inhibitor capable of reducing the activity of the enzyme.

Different concentrations of *D. nipponica* leaf extract inhibited AChE activity less than donepezil hydrochloride solution. The latter reduced the enzyme activity by $\sim 70.62 \pm 2.0$ per cent at a concentration of $16 \mu\text{g/mL}$. This data can imply that the AChE inhibitory effect of *D. nipponica* leaf extract was proved but not significantly lower than Donepezil HCl 70.62 ± 2.0 per cent.

Taking into account the ability of the studied *Dioscorea* spp. leaf extracts to inhibit the enzyme, it is observed that the inhibition caused by the *D. nipponica* leaf extract was slightly superior to that of the *D. caucasica* leaf extract. Although in the

literature, more attention is paid to compounds belonging to the class of alkaloids capable of reducing AChE activity, it has been proven that the compounds found in the extracts could influence the reduction of enzyme activity. This study demonstrates that the predominant compounds in *Dioscorea* leaves are still undiscovered or insufficiently studied and can reduce AChE activity.

Data on the inhibitory properties of *Dioscorea* species and their plant preparations for the AChE enzyme could not be found. However, Tenfen et al. (2019) [186] in the performed research found that the inhibition of *Eugenia* genus leaf extracts on AChE was related to the compounds and amounts of isoquercitrin, quercetin, catechin, epicatechin, and myricitrin. Several of these compounds were also detected in *Dioscorea caucasica* and *nipponica* leaf extracts, so it can be concluded that these compounds present in the extract had a significant effect on the reduction of enzyme activity.

4.2.4.11.1. Kinetic modeling of enzymatic reactions

The kinetics of the AChE inhibition reaction were modeled in the substrate concentration range from 41.25 to 110 $\mu\text{mol/L}$. According to the Lineweaver-Burk graph, the change in reaction rate $1/V$ versus $1/[\text{ATChI}]$ was expressed by the following equations: (1) in the absence of an inhibitor in the reaction mixture: $y = 447.92x + 2.577$, $r^2 = 0.9671$; (2) adding leaf ethanolic extract/inhibitor of 25 $\mu\text{g/mL}$ concentration: $y = 451.863 + 7.5815$, $r^2 = 0.97955$; adding leaf ethanolic extract/inhibitor of 50 $\mu\text{g/mL}$ concentration: $y = 447.02 + 9.4292$, $r^2 = 0.9541$.

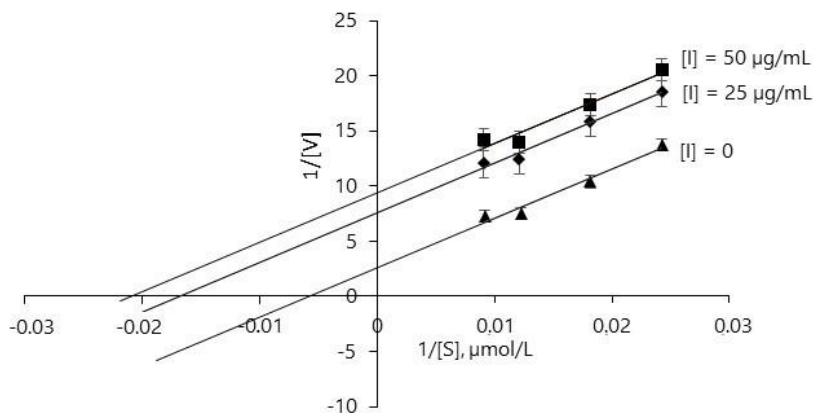


Fig. 4.2.4.16. The alleged uncompetitive inhibition of AChE enzyme caused by *D. nipponica* Makino leaf extract

Mathematical model of the Lineweaver-Burk line graph for different concentrations of ATChI (41.25–110 $\mu\text{mol/L}$ ATChI). The symbols on the graphic refer: triangles (▲): enzyme-substrate interaction in a model enzyme reaction system *in vitro*; rhombuses (◆): interaction of enzyme, substrate and inhibitor (25 $\mu\text{g/mL}$) in a model enzyme reaction system *in vitro*; squares (■): interaction of enzyme, substrate and inhibitor (50 $\mu\text{g/mL}$) in a model enzyme reaction system *in vitro*. Mean values \pm SD of three measurements are presented.

$V_{max(app)}$ value after increasing extract concentration from 25 to and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ decreased from 0.132 ± 0.01 to 0.106 ± 0.01 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/min. The $K_{m(app)}$ value also decreased, from 59.60 ± 0.06 – 47.407 $\mu\text{mol}/\text{L}$. These findings suggest that the inhibitor can only bind to the enzyme-substrate complex [150, 187]. This behavior can be explained by the *Le Chatelier's* principle stating that due the inhibitor effect, the equilibrium shifts towards forming more enzyme-substrate complexes and leads to a lower K_m , which indicates a higher binding affinity [187].

4.2.4.12. Kinetic modeling of enzymatic reaction investigating inhibition capacity of *A. glycyphyllos* L. leaf extract on AChE

To determine the effect of inhibitor, AChE activity was measured in the enzymatic system reaction mixture in the presence or absence of the stated concentration of inhibitor at varying concentrations of substrate (Fig. 4.2.4.17).

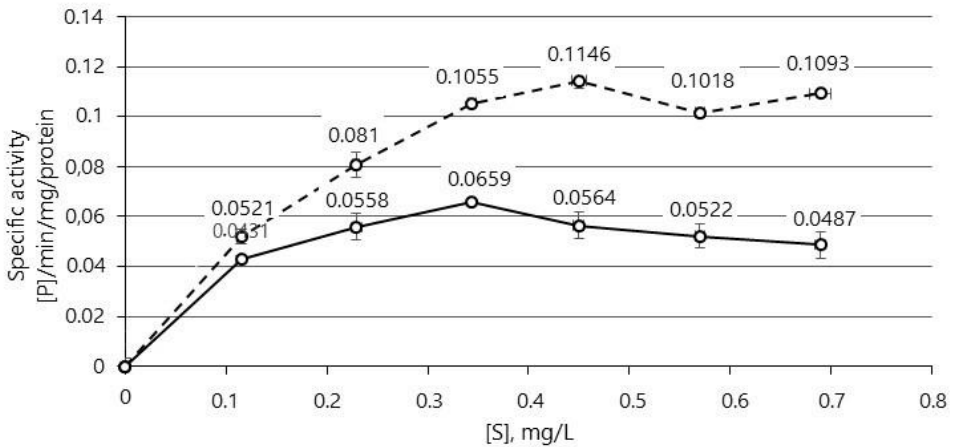


Fig. 4.2.4.17. Effect of ethanolic extract of *A. glycyphyllos* L. leaves on AChE activity in enzymatic reaction systems *in vitro* with different concentrations of substrates (0.12 mM–0.24 mM). Mean values \pm SD of three measurements are presented.

As shown in Figure 4.2.4.17, the AChE gradually reached a plateau of maximal activity at 0.12 mM–24 mM concentration of the substrate, which gradually decreased with the addition of *A. glycyphyllos* extract (190 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The inhibitory activity of the samples obtained varied as follows: 55.41 ± 0.82 per cent (for substrate 24 mM) $> 48.65 \pm 0.6$ per cent (for substrate 0.2 mM) $\approx 50.73 \pm 0.73$ per cent (for substrate 0.16 mM) $> 36.1 \pm 0.2$ per cent (for substrate 0.12 mM) $> 31.15 \pm 0.65$ per cent (for substrate 0.08 mM), 17.24 ± 0.2 per cent (for substrate 0.04 mM). The optimal model of the interaction between the enzyme and the substrate used during hydrolysis, followed by the model of the interaction between the enzyme, the substrate, and the extract, showed that a substrate concentration of 0.16 mM was sufficient to achieve 50 per cent inhibition.

As expected, in the kinetic modeling, *A. glycyphyllos* extract caused an decrease in the $V_{max(app)}$ and $K_{m(app)}$ values (0.0589 ± 0.001 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/min and

$0.009470 \pm 0.003 \mu\text{mol/L}$) compared to V_{max} and K_m values in the absence of *A. glycyphyllos* extract ($0.1436 \pm 0.001 \mu\text{mol/mg protein/min}$ and $0.05817 \pm 0.002 \mu\text{mol/L}$). Decreasing values of $V_{max(app)}$, $K_m(app)$ allow suggested the possibility that the inhibitor profile can only binds to the enzyme-substrate (ES) complex. (150, 187].

CONCLUSIONS

1. The phytochemical composition of extracts from leaves and rhizomes of *D. nipponica*, *D. caucasica* and extracts from leaves of *A. glycyphyllos* has been investigated and it is shown that:
 - 1.1 Great diversity forms of *O*-quercetin glycoside have been identified in both leaves and rhizomes of *Dioscorea* spp. – quercetin-3-*O*-rutinoside, quercetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-malonylhexoside, quercetin-3-*O*-acetylhexoside, quercetin-3-*O*-malonylrhamnoside and quercetin-3-*O*-acetylramnoside.
 - 1.2 Isomers of hydroxycinnamic acids and hydroxy fatty acids have been identified in both leaves and rhizomes of *Dioscorea* spp.
 - 1.3 Steroidal saponins and their isomers have been identified in both rhizome and leaves of *Dioscorea* spp.
 - 1.4 Higher amounts of hydroxycinnamic acids and their isomers were determined in the leaf extracts of *D. nipponica*, while the amount of quercetin-3-*O*-glucoside determined in the leaf extracts of both species was similar.
 - 1.5 The lowest amounts of chlorogenic acid and neochlorogenic acid were determined in *D. nipponica*, *caucasica* spp. in root extracts.
 - 1.6 In *A.glycyphyllos* leaf extract the dominant compounds were: succinic acid, azelaic acid, feruloylquinic acid, cumaroylquinic acid, uridine, and cycloartane-type isomers.
 - 1.7 For the first-time, uridine has been determined in *A.glycyphyllos* leaf extracts, hydroxydodecanoylcarnitine – in *D.caucasica*, *nipponica* root extracts, and in leaf extracts – quercetin-3-*O*-malonylhexoside, quercetin-3-*O*-acetylhexoside, quercetin-3-*O*-malonylrhamnoside, and quercetin-3-*O*-acetylramnoside.
2. A suitable enzyme/substrate/inhibitor interaction model was selected for the applied methodologies and the inhibitory capacity of the extracts were investigated. The applied mathematical modeling of the enzymatic reaction system is suitable for creating Lineweaver-Burk plot, determining kinetic parameters, and evaluating the type of inhibition.
3. The inhibition capacities of extracts were determined and after evaluating them, it was shown that all extracts inhibited enzymes activity in a dose-response manner. By using applied methodologies, it has been determined, that:
 - 3.1 The greatest decrease α -GLU activity was achieved at the concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ (71.02 ± 1.69 per cent) of D.N leaf extract concentration; 100 $\mu\text{g/mL}$ (78.49 ± 2.39 per cent) of D.C leaf extract concentration and 400 $\mu\text{g/mL}$ (54.33 ± 0.7 per cent) of A.G leaf extract concentration.
 - 3.2 The greatest decrease in α -amylase activity was achieved at the concentration of 640 $\mu\text{g/mL}$ (71.6 ± 1.0 per cent) of D.N leaf extract, 480

- µg/mL (48.6 ± 2.2 per cent) of D.C leaf extract; and 800 µg/mL (71.72 ± 0.48 per cent) of A.G leaf extract concentration.
- 3.3 More than half of the ACE inhibition capacity was achieved with 1,000 µg/mL D.C / D.N leaf extracts content, A.G – with 1,250 µg/mL leaf extracts content.
 - 3.4 The greatest in AChE reduction were achieved for 45.85 per cent with 100 µg/mL D.C leaf extract concentration and 52.51 ± 0.9 per cent with 80 µg/mL D.N leaf extract concentration.
 - 3.5 Optimal model of enzyme-substrate interaction used during hydrolysis, then – enzyme-substrate-extract (*A.glycyphyllos* L.) interaction model showed, that 0.16 mM substrate concentration was sufficient to achieve 50 per cent inhibition.
 - 3.6 The inhibition capacity of D.C and D.N rhizomes extract with 500 µg/mL concentration did not reach 50 per cent of α-GLU activity.
4. The values of the kinetic parameters were determined and after evaluating them, it was shown that:
 - 4.1 *Dioscorea* spp. *caucasica*, *nipponica*, leaf and *Dioscorea nipponica* rhizome extracts characterized mixed-type inhibition of α-glucosidase with K_i values of 5.35–11.44 µg/mL, 27.23–31.87 µg/mL, and 476.65 µg/mL, respectively.
 - 4.2 *Dioscorea caucasica* extract of rhizoma characterized competitive of α-glucosidase inhibition with a K_i value of 165.97–304.32 µg/mL.
 - 4.3 *Astragalus glycyphyllos* leaf extract characterized an uncompetitive of α-glucosidase inhibition with a K_i value of 0.195–0.25 µg/mL.
 - 4.4 All of the species extracts of leaf characterized uncompetitive inhibition of acetylcholinesterase.
 5. After evaluating the inhibitory properties of extracts of *Dioscorea* L., *Astragalus* L. plant raw materials, theoretically formulated assumption that extracts contain natural compounds capable of binding with enzymes exhibiting hydrolase activity and thus reduce their activity. It is theoretically reasonable that this is influenced by:
 - 5.1 Hydroxycinnamic acids and their isomers, *O*-quercetin glycoside forms were determined in extracts of *D. nipponica*, *D. caucasica* leaves.
 - 5.2 Peptides, catechin were determined in extracts of *D. nipponica*.
 - 5.3 Hydroxycinnamic acids and their isomers were determined in extract of *A. glycyphyllos* leaves.

LITERATŪRA

1. Integrated Taxonomic Information System (ITIS) Standard Report Page: *Dioscorea* L., Taxonomic Serial No.: 43366. 2020, [žiūrėta 2020-04-12]. Prieiga per: <http://www.itis.gov>
2. CHRISTENHUSZ, Maarten J.M. and James W. BYING. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* [interaktyvus]. Magnolia press, April 2016, 261(3), 201–217 [žiūrėta 2022-02-10]. ISSN 1179-3163. Prieiga per: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
3. LEBOT, V. Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids. Crop production science in horticulture. 2nd ed. Wallingford, Oxfordshire, UK; Boston, MA: 2020, 218–220
4. Georgia Exotic Pest Plant Council: GA-EPPC. List of Non-Native Invasive Plants in Georgia Exotic Pest Plant Council [žiūrėta 2021-11-11]. Prieiga per: <http://www.gaepcc.org/list/>
5. LIM, T.K. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Modified Stems, Roots, Bulbs. *Springer Science + Business Media Dordrecht*. 2016, 10, 218–225. ISBN: 9789401772754
6. GBIF. Global Biodiversity Information Facility (GBIF). [žiūrėta 2022-05-24]. Prieiga per: <https://www.gbif.org/>
7. EDDMapS. Early Detection and Distribution Mapping System. [žiūrėta 2021-12-21]. Prieiga per: <http://www.eddmaps.org>
8. ČULAFIĆ, L., et al. *Dioscorea balcanica* Košanin and *D. caucasica* Lipsky: in vitro culture and production of diosgenin. In: Bajaj, Y.P.S. (eds) Medicinal and Aromatic Plants XI. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer Berlin Heidelberg, 1999, 43, 85–104. ISBN 978-3-642-08363-1. Prieiga per: https://doi.org/10.1007/978-3-662-08614-8_6
9. ZERNOV Alexander. Plants of the Russian Western Caucasus. Field atlas. Moscow: KMK Scientific Press Ltd. 2010, 449
10. LUKATKIN, A. S. et al. Cultivation of *Dioscorea nipponica* Makino in vitro and ex Vitro. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* [interaktyvus]. 2007, 1(1), 66–69 [žiūrėta 2021-03-08].
11. Integrated Taxonomic Information System (ITIS) Standard Report Page: *Astragalus* L., Taxonomic Serial No.: 25392. Integrated Taxonomic Information System, 2022. [žiūrėta 2022-05-23]. Prieiga per: <http://www.itis.gov>
12. PODLECH, D., Taxonomic and phytogeographical problems in *Astragalus* of the Old World and South-West Asia. In: Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. *Biological Sciences* [interaktyvus]. Cambridge University Press (CUP), 1986, 89, 37–43. Prieiga per: <https://doi.org/10.1017/s0269727000008885>
13. LOCK, J. M. and B. D. Schrire. 2005. Tribe Galegeae. In: Lewis, Gwilym., B. Schrire, B. Machinder and M. Lock (eds.), *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, England. pp. 475–481.
14. ARBAČIAUSKAS, Kęstutis ir kt. Induočiai augalai/Tracheophyta Juodadantė kulkšnė. Iš. RAŠOMAVIČIUS, Valerijus (red.). Lietuvos raudonoji knyga. Gyvūnai, Augalai, Grybai. Aplinkos ministerija, 2021 213. ISBN 978-9955-37-229-5.

15. LIETUVOS RESPUBLIKOS VYRIAUSYBĖ. Lietuvos respublikos aplinkos ministro įsakymas: 2008 m. liepos 21 d. Nr. D1-389 [interaktyvus]. [žiūrėta 2022-06-12]. Prieiga per: <https://www.e-tar.lt>
16. LIETUVOS RESPUBLIKOS VYRIAUSYBĖ. Lietuvos respublikos aplinkos ministro įsakymas: 2003 m. spalio 13 d. Nr. 504 [interaktyvus]. [žiūrėta 2022-06-12]. Prieiga per: <https://www.e-tar.lt>
17. MAASSOUMI, Asghar A., et al. A new infrageneric grouping of *Astragalus* (Fabaceae). *Iranian Journal Botanical* [interaktyvus]. December 2016, 22(2), 88–100 [žiūrėta 2022-05-24]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.22092/ijb.2016.107941>
18. FENG, Jia-Fu., et al. Biotransformation of *Dioscorea nipponica* by rat intestinal microflora and cardioprotective effects of diosgenin. *Oxidative medicine and cellular longevity* [interaktyvus]. Hindawi Limited, September 2017, 2017, 1–9 [žiūrėta 2022-01-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1155/2017/4176518>
19. DONG, Mengxue et al. Diosgenin promotes antitumor immunity and PD-1 antibody efficacy against melanoma by regulating intestinal microbiota. *Cell Death and Disease* [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC, October 2018, 9(10), 1039 [žiūrėta 2022-06-16]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1099-3>
20. JUNCHAO, Yang et al. Anti- trachea inflammatory effects of diosgenin from *Dioscorea nipponica* through interactions with glucocorticoid receptor α . *Journal of International Medical Research* [interaktyvus]. SAGE Publications, October, 2016, 45(1), 101–113 [žiūrėta 2022-06-16]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1177/0300060516676724>
21. KIM, Choung U., Willard LEW, Matthew A. WILLIAMS, Hongtao LIU, Lijun ZHANG, S. SWAMINATHAN, Norbert BISCHOFBERGER, Ming S. CHEN, Dirk B. MENDEL, Chun Y. TAI, W. Graeme LAVER and Raymond C. STEVENS. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *Journal of the American Chemical Society* [interaktyvus]. American Chemical Society, January, 1997, 119(4), 681–690 [žiūrėta 2022-10-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/ja963036t>
22. ROHLOFF, John C., Kenneth M. KENT, Michael J. POSTICH, Mark W. BECKER, Harlan H. CHAPMAN, Daphne E. KELLY, Willard LEW, Michael S. LOUIE, Lawrence R. MCGEE, Ernest J. PRISBE, Lisa M. SCHULTZE, Richard H. YU and Lijun ZHANG. Practical Total Synthesis of the Anti-Influenza Drug GS-4104. *Journal of the American Chemical Society* [interaktyvus]. American Chemical Society, June 1998, 63. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jo980330q>
23. ABRECHT, Stefan, Peter HARRINGTON, Hans IDING, Martin KARPF, René TRUSSARDI, Beat WIRZ and Ulrich ZUTTER. The synthetic development of the anti-Influenza neuraminidase inhibitor oseltamivir phosphate (Tamiflu®): A challenge for synthesis: process research. *Chimia* [interaktyvus]. Swiss Chemical Society, September 2004, 58(9), 621 Prieiga per: <https://doi.org/10.2533/000942904777677605>
24. PRICE, Elliott J. Metabolomics of *Dioscorea* spp. (Yam): biochemical diversity of an underutilised and understudied crop. *Royal Holloway, University of London* [interaktyvus]. June 2017. Prieiga per: <https://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.792643>

25. TAO, Xufeng, et al. Dioscin: a diverse acting natural compound with therapeutic potential in metabolic diseases, cancer, inflammation and infections. *Pharmacological Research* [interaktyvus]. Elsevier BV, November 2018, 137, 259–269 [žiūrėta 2022-01-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.09.022>
26. ZHOU, Jiaju, Guirong XIE ir Xinjian YAN. Encyclopedia of traditional Chinese medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications. [interaktyvus]. *Isolat Compound D-G*. Springer Berlin Heidelberg, eBook, 2011, 2. [žiūrėta 2022-04-15]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-16738-6>.
27. PARK, Kyoung J., et al. Steroidal saponins from *Dioscorea nipponica* rhizomes and their biological activity. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2017, 48(4), 261–267. pISSN 0253-3073/eISSN 2288-9299.
28. WANG, Tiejie et al. Trillin, a steroidal saponin isolated from the rhizomes of *Dioscorea nipponica*, exerts protective effects against hyperlipidemia and oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology* [interaktyvus]. Elsevier BV, January 2012, 139(1), 214–220 [žiūrėta 2022-01-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.001>
29. ZHAO, Chengcheng, et al. Multicomponent analysis and activities for evaluation of *Dioscorea oppositifolia* and *Dioscorea hamiltonii*. *Food and Agricultural Immunology* [interaktyvus]. London: Informa UK Limited, October 2019, 30(1), 1148–1161 [žiūrėta 2022-02-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1674786>
30. YANG, Gui Y., et al. Natural deep eutectic solvents for the extraction of bioactive steroidal saponins from *Dioscoreae nipponicae* rhizoma. *Molecules* [interaktyvus]. MDPI AG, April 2021, 26(7), 2079 [žiūrėta 2022-01-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules26072079>
31. HWANG, Joo T., et al. Development of an oriental medicine discrimination method through analysis of steroidal saponins in *Dioscorea nipponica* Makino and their anti-osteosarcoma effects. *Molecules* [interaktyvus]. MDPI AG, November 2019, 24(22), 4022 [žiūrėta 2022-01-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules24224022>
32. CUI Cheng B. A new furastanol saponin from the water-extract of *Dioscorea nipponica* Mak., the raw material of the traditional chinese herbal medicine Wei Ao Xin. *Chinese chemical letters* [interaktyvus]. 2004, 15(10), 1191–1194 [žiūrėta 2022-06-07]. Prieiga per: <http://www.imm.ac.cn/journal/ccl.html>
33. SZAKIEL, Anna et al. Comparison of the profiles of non-glycosylated triterpenoids from leaves of plants of selected species of genus *Dioscorea*. *Phytochemistry Letters* [interaktyvus]. Elsevier BV, June 2017, 20, 350–35 [žiūrėta 2022-01-13]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.11.013>
34. WOO, Kyeong Wan, et al. Phenolic derivatives from the rhizomes of *Dioscorea nipponica* and their anti-neuroinflammatory and neuroprotective activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 155(2), 1164–1170. ISSN 0378-8741.
35. LOSEVA, Anna I., et al. Investigation of the chemical composition of cell cultures of *DIOSCOREA CAUCASICA* in connection with the production of BAS sources with cardioprotective potential. *New Technologies* [interaktyvus]. Maikop State Technological University, February 15 2022, 17(6), 35–47 [žiūrėta 2022-04-20]. Prieiga per: <https://doi.org/10.47370/2072-0920-2021-17-6-35-47>

36. QING, Lin S., et al. Ligand fishing from *Dioscorea nipponica* extract using human serum albumin functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217(28), 4663–4668 [žiūrėta 2022-07-27]. ISSN 0021-9673
37. ALI, Zulfqar, Troy J. SMILLIE, Ikhlas A. KHAN. 7-Oxodioscin, a new spirostan steroid glycoside from the rhizomes of *Dioscorea nipponica*. *Natural Product Communications* [interaktyvus]. SAGE Publications, February 2013, 8(3), 319–321 [žiūrėta 2022-06-06]. ISSN/ISBN: 1934-578X. Prieiga per: <https://doi.org/10.1177/1934578x1300800310>
38. LI, Xuejiao et al. Novel phenanthrene and isocoumarin from the rhizomes of *Dioscorea nipponica* Makino subsp. *rosthornii* (Prain et Burkill) C. T. Ting (Dioscoreaceae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [interaktyvus]. Elsevier BV, August 2017, 27(15), 3595–3601 [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.03.095>
39. KWON Chong S., et al. Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [interaktyvus]. Oxford University Press (OUP), January 2003, 67(7), 1451–1456 [žiūrėta 2022-04-19]. ISSN 0916-8451. Prieiga per: <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1451>
40. LU, Dan et al. Phenanthrene derivatives from the stems and leaves of *Dioscorea nipponica* Makino. *Journal of Asian Natural Products Research* [interaktyvus]. Informa UK Limited, February 2010, 12(1), 1–6 [žiūrėta 2022-06-16]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/10286020903403626>
41. ZHANG, Jiayong et al. Identification of water-soluble components, that are not saponins, from *Dioscorea nipponica* Mak. *Asian Journal of Traditional Medicines* [interaktyvus]. April, 2007, 2(2) 70-74. ISSN 1817-4337.
42. KIM, Minyoul, et al. Quantitative analysis of bioactive phenanthrenes in *Dioscorea batatas* Decne peel, a discarded biomass from postharvest processing. *Antioxidants* (Basel) [interaktyvus]. MDPI AG, November 2019, 8(11), 541 [žiūrėta 2022-01-12] Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/antiox8110541>
43. KOVÁCS, Adriána, Andrea VASAS, Judit HOHMANN. Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry* [interaktyvus]. Elsevier, March 2008, 69(5), 1084–1110 [žiūrėta 2022-01-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.12.005>
44. BOUDJADA, Amina, et al. Phenanthrene and dihydrophenanthrene derivatives from *Dioscorea communis* with anticholinesterase, and antioxidant activities. *Natural product research* [interaktyvus]. London: Informa UK Limited, May 2019, 33(22), 3278–3282 [žiūrėta 2022-01-16]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1468328>
45. WU, Zhi G., et al. Characterizing diversity based on nutritional and bioactive compositions of yam germplasm (*Dioscorea* spp.) commonly cultivated in China. *Journal of food and drug analysis* [interaktyvus]. Food and Drug Administration, Taiwan, April 2016, 24(2), 367–375 [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.12.003>
46. NAGAI, T., and T. NAGASHIMA. Functional properties of Dioscorin, a soluble viscous protein from Japanese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) tuber mucilage Tororo. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2006, 61(11–12), 792–798 [žiūrėta 2022-02-07]. ISSN 1865-7125
47. ADELOYE, Jumoke B., et al. In vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities, antioxidant activity, in vivo glycemic response and nutritional quality of

- dough meals from *Dioscorea alata* and *Vernonia amygdalina*. *Journal Food Measure* [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC, June 2021, 15, 4083–4097 [žiūrėta 2022-01-08]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00965-z>
48. DJEUKEU, W. Asongni, et al. Effect of dried yam flour (*Dioscorea schimperiana*) on cooking quality, digestibility profile and antioxidant potential of wheat based pasta. *Journal of Food Measurement and Characterization*. [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC, April 2017, 11, 1421–1429. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9521-6>
 49. HWANG, S.J. Antioxidant activities and quality characteristics of yanggaeng added with Yam (*Dioscorea japonica* Thunb) powder. *Culinary Science and Hospitality Research* [interaktyvus]. 2021, 27, 178–188.
 50. KORSUN, V. F., Korsun, E. V., Trumple, T. E., Malisko, M.A., Koršikova J. I., & Davidenko, T. A. (2020). Phytotherapy for heart disease. The herbs of life. Moscow: Center-polygraph [in Russian]. Phytotherapy of heart diseases.
 51. KORCHINSKY A. V. et al. Innovative technology of tablets «Diosklephyt» based on *Dioscorea caucasica* Lysky. *Drug development and registration* [interaktyvus]. Unpublished, 2015, 4(13) 74–81 [žiūrėta 2021-01-07]. Prieiga per: 10.13140/RG.2.1.2908.7768
 52. LIETUVOS RESPUBLIKOS VYRIAUSYBĖ. Lietuvos respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymas: 2007 m. liepos 10 d. Nr. V-596 [interaktyvus]. [žiūrėta 2022-09-12]. Prieiga per: <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.301861/asr>
 53. HSIEH, Ming-Ju, et al. *Dioscorea nipponica* attenuates migration and invasion by inhibition of urokinase-type plasminogen activator through involving PI3K/Akt and transcriptional inhibition of NF-κB and SP-1 in hepatocellular carcinoma. *The American Journal of Chinese Medicine* [interaktyvus]. World Scientific Pub Co Pte Lt, January, 2016, 44(01), 177–195 [žiūrėta 2022-10-14]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1142/s0192415x16500129>
 54. CHEN, Chuan-Rong et al. Gracillin induces apoptosis in HL60 human leukemic cell line via oxidative stress and cell cycle arrest of G1. *Die Pharmazie* [interaktyvus]. March, 2015, 70(3), 199–204 [žiūrėta 2022-10-14]. ISSN 0031-7144. Prieiga per: <https://doi.org/10.1691/ph.2015.4742>
 55. NIE Chao et al. Diosgenin-induced autophagy and apoptosis in a human prostate cancer cell line. *Molecular Medicine Reports* [interaktyvus]. Spandidos Publications, September, 2016, 14(5), 4349–4359 [žiūrėta 2022-07-05]. ISSN:1791-3004. Prieiga per: <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5750>
 56. CAO, Yong-Jun et al. Dioscin, a steroidal saponin isolated from *Dioscorea nipponica*, attenuates collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 cell response. *The American Journal of Chinese Medicine* [interaktyvus]. World Scientific Pub Co Pte Lt, January, 2019 47(02), 423–437 [žiūrėta 2022-1-14]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1142/s0192415x19500216>
 57. ZHOU, Qi, YU, et al. Therapeutic effects of total saponins from *Dioscorea nipponica* Makino on gouty arthritis based on the MAPK-PPARγ signaling pathway: an in vitro study. *Natural Product Communications* [interaktyvus]. SAGE Publications, March 2020, 15(3), 1–13 [žiūrėta 2022-06-06] Prieiga per: <https://doi.org/10.1177/1934578x20904497>
 58. PR Newswire. Hi-Tech Pharmaceuticals Diosterol™ brand *Dioscorea Nipponica* Makino is precision anabolic & androgenic extract designed for hard-training athletes

- who want to get more out of their workout by boosting testosterone levels. Internet, 2019. Prieiga per: <https://prn.to/2W76TjX>
59. ZHOU, Qi et al. Anti-inflammatory effect of total saponin fraction from *Dioscorea nipponica* Makino on gouty arthritis and its influence on NALP3 inflammasome. *Chinese Journal of Integrative Medicine* [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC. September 2019, 25(9), 663–670. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s11655-016-2741-5>
 60. ZHOU, Qi, et al. Total saponins from *Dioscorea nipponica* ameliorate urate excretion in hyperuricemic mice. *Planta medica* [interaktyvus]. Georg Thieme Verlag KG, September 2014, 80(15), 1259–1268 [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383048>
 61. TANG, Yi Na, et al. Cardioprotective effect of total saponins from three medicinal species of *Dioscorea* against isoprenaline-induced myocardial ischemia. *Journal of Ethnopharmacology* [interaktyvus]. Elsevier BV, December 2015, 175, 451–455 [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.004>
 62. LYSIUK Roman, and Solomiia KOZACHOK. HPLC-UV Determination of Catechins and Gallic Acid in Aerial Parts of *Astragalus glycyphyllos* L. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* [intraktyvus]. Bangladesh Journals Online (JOL), December 2019, 18(2), 241–247 [žiūrėta 2022-04-15]. ISSN 1816-1820. Prieiga per: <https://doi.org/10.3329/dujps.v18i2.44464>
 63. SHKONDROV, Aleksandr and Iilina KRASTEVA. High resolution LC-MS/MS screening for secondary metabolites in Bulgarian species of genus *Astragalus* L. *Química Nova*. 2021, 44, 683-688. ISSN 1678-7064. Prieiga per: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170730>
 64. BUTKUTĚ, Bronislava, et al. Mineral and phytochemical profiles and antioxidant activity of herbal material from two temperate *Astragalus* species. *BioMed Research International* [interaktyvus]. London: Hindawi Limited, 2018, 2018, 1–11 [žiūrėta 2022-03-14]. eISSN 2314-614. Prieiga per: <https://doi.org/10.1155/2018/6318630>
 65. POPOVA, Pavlinka et al. Induction of flavonoid biosynthesis by in vitro cultivation of *Astragalus glycyphyllos* L. *Pharmacia* [interaktyvus]. July 2020, 67(2), 95–99 [žiūrėta 2022-05-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3897/pharmacia.67.e50390>
 66. LINNEK, Jens et al. Cycloartane-type glycosides from two species of *Astragalus* (Fabaceae). *Natural product communications* [interaktyvus]. SAGE Publications, April 2009, 4(4), 477–478 [žiūrėta 2022-04-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1177/1934578x0900400406>
 67. SANTORO, Valentina et al. Chemical profiling of *Astragalus membranaceus* roots (Fish.) Bunge herbal preparation and evaluation of its bioactivity. *Natural Product Communications* [interaktyvus]. SAGE Publications, May 2020, 15 (5), 1–11 [žiūrėta 2022-03-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1177/1934578x20924152>
 68. SARIKURKCU, Cengiz and Gokhan ZENGIN. Polyphenol profile and biological activity comparisons of different parts of *Astragalus macrocephalus* subsp. finitimus from Turkey. *Biology* [interaktyvus]. MDPI AG, August 2020, 9(8), 231 [žiūrėta 2022-04-18]. ISSN 2079-7737. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/biology9080231>
 69. KIZILTAŞ, Hatice et al. LC-HRMS profiling of phytochemicals, antidiabetic, anticholinergic and antioxidant activities of evaporated ethanol extract of *Astragalus brachycalyx* Fischer. *Journal of Chemical Metrology* [interaktyvus]. ACG Publications, December 2021, 15(2), 135–151 [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.25135/jcm.62.2107.2155>

70. HAŞIMI Nesrin et al. LC-MS/MS and GC-MS analyses of three endemic *Astragalus* species from Anatolia towards their total phenolic- flavonoid contents and biological activities. *Biological Diversity and Conservation*. 2017, 10(1), 18–30. ISSN 1308–5301
71. LABED Amira et al. Compounds from the pods of *Astragalus armatus* with antioxidant, anticholinesterase, antibacterial and phagocytic activities. *Pharmaceutical biology* [interaktyvus]. Informa UK Limited, Jul 2016, 54(12), 3026–3032 [žiūrėta 2022-06-16]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1200632>
72. JANIBEKOV, Abdulaziz A., et al. New flavonoid glycosides from two *Astragalus* species (Fabaceae) and validation of their antihyperglycaemic activity using molecular modelling and in vitro studies. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. Elsevier BV, August 2018, 118, 142–148 [žiūrėta 2022-04-22]. ISSN 0926-6690. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.034>
73. SOLIMAN, Gamal A., et al. Protective effects of two *Astragalus* species on ulcerative colitis in rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [interaktyvus]. African Journals Online (AJOL), November 2016, 15(10), 2155 [žiūrėta 2022-04-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i10.14>
74. WU, Jing-Shan et al. Anti-hypertensive and angiotensin-converting enzyme inhibitory effects of radix Astragali and its bioactive peptide AM-1. *Journal of Ethnopharmacology* [interaktyvus]. Elsevier BV, May 2020, 254, 112724 [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112724>
75. LIU, Chung H., et al. Effects of the traditional Chinese herb *Astragalus membranaceus* in patients with poststroke fatigue: a double-blind, randomized, controlled preliminary study. *Journal of Ethnopharmacology* [interaktyvus]. Elsevier BV, December 2016, 194, 954–962 [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.058>
76. KIM, Jiman, Eulsun MOON and Seungwon KWON. Effect of *Astragalus membranaceus* extract on diabetic nephropathy. *Endocrinology, Diabetes and Metabolism Case Reports* [interaktyvus]. Bioscientifica, September, 2014(1), 1–4 [žiūrėta 2022-06-04]. ISSN 2052-0573. Prieiga per: <https://doi.org/10.1530/edm-14-0063>
77. HANIFA, Dina et al. Purple yam extract (*Dioscorea alata* L.) as adjuvant antihypertension medicine for postpartum hipertension. *STRADA Jurnal Ilmiah Kesehatan* [interaktyvus]. STRADA Indonesia Health Sciences Institute, November 2020, 9(2), 443–449 [žiūrėta 2022-04-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.30994/sjik.v9i2.363>
78. SHKONDROV, Aleksandar, et al. A new tetracyclic saponin from *Astragalus glycyphyllos* L. and its neuroprotective and hMAO-B inhibiting activity. *Natural Product Research* [interaktyvus]. Informa UK Limited, November, 2018, 34(4), 511–517 [žiūrėta 2022-05-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1491040>
79. CICERO, Arrigo F.G., Alessando COLLETTI. Handbook of nutraceuticals for clinical use [interaktyvus]. Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-73642-6 (eBook). Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-73642-6>
80. GEORGIEVA, Ani et al. Antiproliferative and antitumour activity of saponins from *Astragalus glycyphyllos* on myeloid Graffi tumour. *Journal Ethnopharmacology* [interaktyvus]. Elsevier, March, 2021, 267, 113519 [žiūrėta 2022-05-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113519>

81. TRUSCHEIT, Ernst, et al. Chemistry and biochemistry of microbial α -glucosidase inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition in English* [interaktyvus]. Wiley, September 1981, 20(9), 744–761 [žiūrėta 2022-04-21] Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/anie.198107441>
82. SPIZZIRRI, Umile Gianfranco, et al. Synthesis of antioxidant polymers by grafting of gallic acid and catechin on gelatin. *Biomacromolecules* [interaktyvus]. American Chemical Society, May 2009, 10(7), 1923–1930 [žiūrėta 2022-05-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/bm900325t>
83. LOBANOVA I., E, YAKIMOVA Y., L. The antimicrobial activity of oil and ethanol extracts of *Astragalus glycyphyllos*. *Vestnik Novosibirskogo GU. Ser.: biology, clinical. medicine*, 2012, 10(2), 79–83. ISSN 1818-7943.
84. SIMEONOVA, Romyana et al. Effects of extract from *Astragalus glycyphyllos* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in wistar rat. *International Journal of Pharma and Bio Science* [interaktyvus]. January 2013, 4(3), 179–186 [žiūrėta 2022-05-24]. ISSN 0975-6299.
85. PRAŠKEVIČIUS, Antanas ir kt. Dažniausiai vartojamų biomedicinos terminų ir sąvokų aiškinamasis žinynas (medikams). Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, 2014. ISBN 978-9955-15-313-9
86. DRAUZ, Karlheinz, Harald GRÖGER, MAY, Oliver (ed.). Enzyme catalysis in organic synthesis, 3 volume set. John Wiley & Sons, 2012, 3–6. ISBN 978-3-527-32547-4
87. BOWATER Richard, Laura BOWATER and Tom HUSBAN. Biochemistry. The molecules of life. Oxford university press, 2020, pp 45 [žiūrėta 2022-07-22]. ISBN 978-0-19-884839-4.
88. KHAN M.Y and Farha KHAN. Principles of enzyme technology. 2015, 3–16. ISBN-978-81-203-5041-0
89. The Enzyme List. Class 3 – Hydrolases. In: (NC-IUBMB) *Generated from the ExplorEnz database*, 2022. Prieiga per: <http://www.enzyme-database.org/downloads/ec3.pdf>
90. BERGLUND, Per and Seongsoon PARK. Strategies for altering enzyme reaction specificity for applied biocatalysis. *Current organic chemistry*. Bentham Science Publishers Ltd., March 2005, 9(4), 325–336 [žiūrėta 2022-10-19]. ISSN 1385-2758. Prieiga per: <https://doi.org/10.2174/1385272053174967>
91. HERNANDEZ-HERNANDEZ, Oswaldo et al. In vitro digestibility of dietary carbohydrates: toward a standardized methodology beyond amylolytic and microbial enzymes. *Frontiers in Nutrition* [interaktyvus]. Frontiers Media SA, May 2019, 6(61) [žiūrėta 2022-08-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00061>
92. REN, Limei et al. Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. *Protein & Cell* [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC, October, 2011, 2(10), 827–836 [žiūrėta 2022-08-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1105-3>
93. CHEY William D., et al. Congenital Sucrase-Isomaltase Deficiency: What, When, and How? *Gastroenterology & Hepatology* [interaktyvus]. Gastro-Hep Communications, New York, October 2020, 16(10), Supplement 3–11 [žiūrėta 2022-11-14]. Prieiga per: <https://www.gastroenterologyandhepatology.net/gh1020sup5-1.pdf>
94. DEROSA, Giuseppe and Pamela, MAFFIOLI. “ α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice” *Archives of Medical Science* [interaktyvus]. Termedia Sp.

- z.o.o. November, 2012 8(5), 899–906 [žiūrėta 2022-10-26]. Prieiga per: <https://doi.org/10.5114/aoms.2012.31621>
95. WHO (World Health Organization). Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. Geneva: World Health Organization [interaktyvus]. Technical Report Series, 2003, 916, 1–149. ISBN 0512-3054.
 96. ZHANG, Lin, et al. α -Glucosidase inhibitors from Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.). *Food chemistry*, 2011, 126(1), 203–206. ISSN 0308-8146.
 97. TANG Zhe and Jianhui SU. Effects of (-)-epigallocatechin gallate and quercetin on the activity and structure of α -amylase. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [interaktyvus]. African Journals Online (AJOL), February, 2019, 18(3), 585–590 [žiūrėta 2022-10-29]. ISSN 1596-5996 (print). Prieiga per: <https://doi.org/10.4314/tjpr.v18i3.20>
 98. TADERA, Kenjiro, et al. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 2006, 52(2), 149–153. ISSN 1881 – 7742.
 99. The Enzyme List. EC3 – Hydrolase Nomenclature. In: NC-IUBMB Enzyme Nomenclature. Prieiga per: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3.html>
 100. The Enzyme List. EC 3 – Carboxylic Ester Hydrolases. In: NC-IUBMB Enzyme Nomenclature. Prieiga per: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3/1/1.html>
 101. ZHOU, Yanzi, Shenglong WANG and Yingkai ZHANG. Catalytic reaction mechanism of acetylcholinesterase determined by Born–Oppenheimer Ab initio QM/MM molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry B* [interaktyvus]. American Chemical Society (ACS), June 2010, 114(6), 8817–8825 [žiūrėta 2022-08-30]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jp104258d>
 102. DVIR, Hay et al. Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chemico-Biological Interactions* [interaktyvus]. Elsevier, September 2010, 187, 10–22 [žiūrėta 2022-09-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042>
 103. GULÇIN, İlhami et al. Synthesis and biological evaluation of aminomethyl and alkoxyethyl derivatives as carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. Informa UK Limited, January, 2017, 32(1), 1174–1182 [žiūrėta 2022-09-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1368019>
 104. LOEWI, Otto. Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC, December 1921, 189(1), 239–242 [žiūrėta 2022-09-16]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/bf01738910>
 105. ChEBI. Chemical Entities of Biological Interest. [žiūrėta 2022-08-24]. Prieiga per: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/15355>
 106. KATZ B. R. MILEDI. The binding of acetylcholine to receptors and its removal from the synaptic cleft. *Journal of Physiology* [interaktyvus]. Wiley, June 1973, 231(3), 549–573 [žiūrėta 2022-08-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010248>
 107. COLOVIĆ Mirjana B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current neuropharmacology* [interaktyvus]. Bentham Science Publishers Ltd., May 2013, 11(3), 315–335 [žiūrėta 2021-10-12]. ISSN 1875-6190. Prieiga per: <https://doi.org/10.2174/1570159x11311030006>
 108. JOPE, Richard S. High affinity choline transport and acetylCoA production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. *In Brain Research Reviews*

- [interaktyvus]. Elsevier BV, December 1979, 1(3), 313–344 [žiūrėta 2022-10-28]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(79\)90009-2](https://doi.org/10.1016/0165-0173(79)90009-2)
109. KÖNIG, Magdalena et al. Increased Cholinergic Response in α -Synuclein Transgenic Mice (h- α -synL62). In *ACS Chemical Neuroscience* [interaktyvus]. American Chemical Society (ACS), September 2018, 10(4), 1915–1922 [žiūrėta 2022-10-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.8b00274>
 110. SULTZER, David L., et al. Cholinergic receptor binding in unimpaired older adults, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease dementia. *Alzheimer's Research & Therapy* [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC, February 2022, 14(25), 1–15 [žiūrėta 2022-08-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00954-w>
 111. PICCIOTTO, Marina R., Michael J. HIGLEY and Yann S. MINEUR. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* [interaktyvus]. Cell press journal, October 2012, 76(1), 116–129 [žiūrėta 2022-08-24] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>
 112. LAZAREVIC-PASTI, Tamara et al. Modulators of acetylcholinesterase activity: from alzheimer's disease to anti-cancer drugs *Current Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. Bentham Science Publishers Ltd., October, 2017, 24(30), 3283–3309 [žiūrėta 2022-10-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2174/0929867324666170705123509>
 113. MURRAY, Paula A., et al. Natural AChE Inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Current Neuropharmacology* [interaktyvus]. Bentham Science Publishers, June 2013, 11, 388–413 [žiūrėta 2022-02-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2174/1570159x11311040004>
 114. SANTOS, Thaiane Coelho dos, Thaís Mota GOMES, Bruno Araújo Serra PINTO, Adriana Leandro CAMARA and Antonio Marcus de Andrade PAES. Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy. *Frontiers in Pharmacology* [interaktyvus]. Frontiers Media SA, October 2018, 9 [žiūrėta 2022-09-16]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01192>
 115. HEINRICH, Michael. Galanthamine from Galanthus and other Amaryllidaceae – chemistry and biology based on traditional use. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* [interaktyvus]. Elsevier, 2010, 68, 157–165 [žiūrėta 2022-08-12]. ISSN 1099-4831. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/s1099-4831\(10\)06804-5](https://doi.org/10.1016/s1099-4831(10)06804-5)
 116. HEO, Ho J., et al. Naringenin from Citrus junos has an inhibitory effect on acetylcholinesterase and a mitigating effect on amnesia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* [interaktyvus]. Karger, March 2004, 17(3), 151–157 [žiūrėta 2022-04-15]. ISSN 1420-8008 (Print). Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1159/000076349>
 117. LI, Sainan et al. On-line coupling pressurised liquid extraction with two-dimensional counter current chromatography for isolation of natural acetylcholinesterase inhibitors from *Astragalus membranaceus*. *Phytochemical Analysis* [interaktyvus] Wiley, November 2020, 32(4), 640–653 [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/pca.3012>
 118. ORHAN, Ilkay, et al. Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2007, 62(11-12), 829-832. ISSN 1865-7125. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2007-11-1210>

119. KHAN, Mahmud Tareq Hassan, I. ORHAN, F.S. ŞENOL, M. KARTAL, B. ŞENER, M. DVORSKÁ, K. ŠMEJKAL and T. ŠLAPETOVÁ. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-Biological Interactions* [interaktyvus]. Elsevier BV, October 2009, 181(3), 383–389 [žiūrėta 2022-06-16]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2009.06.024>
120. SHAH Kamaruddin K. M., Hasnah Mohd SIRAT, Shajarahtunnur JAMIL. Cholinesterase inhibitors from heartwood of *Artocarpus fulvicortex* F. M. Jarret (Moraceae). *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)* [interaktyvus]. May 2016, 78(6), 185–189 [žiūrėta 2022-09-23]. eISSN 2180–3722.
121. SEKEROGLU, Nazim and Sevgi GEZICI. Original article *Astragalus neurocarpus* Bioss. as a potential source of natural enzyme inhibitor associated with Alzheimer's and Parkinson diseases along with its rich polyphenolic content and antioxidant activities. *Annals of phytomedicine: an international journal* [interaktyvus]. Ukaaz Publications, June 2019, 8(1), 82–87 [žiūrėta 2022-04-19]. ISSN: 2278-9839. Prieiga per: <https://doi.org/10.21276/ap.2019.8.1.9>
122. The Enzyme List. EC 3 – Metalloproteases. In: NC-IUBMB Enzyme Nomenclature. Prieiga per: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3/4/15/1.html>
123. FERREIRA, S. H. A. Bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *British journal of pharmacology and chemotherapy* [interaktyvus]. London: British Medical Association, February 1965, 24(1), 163–169 [žiūrėta 2022-04-22]. ISSN 0366-0826. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x>
124. HSU, Feng L., et al. Both dioscorin, the tuber storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. Tainong No. 1), and its peptic hydrolysates exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. American Chemical Society (ACS), October 2002, 50(21), 6109–6113 [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf0203287>
125. DASKAYA-DIKMEN, Ceren et al. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants. *Nutrients* [interaktyvus]. MDPI AG, March 2017, 9(4), 316 [žiūrėta 2022-04-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/nu9040316>
126. LIU, Ju C., et al. Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Life Sciences* [interaktyvus]. Elsevier BV, August, 2003, 73(12), 1543–1555 [žiūrėta 2022-04-22]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00481-8](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00481-8)
127. ZHOU, Jiaju, Guirong XIE ir Xinjian YAN. Encyclopedia of traditional Chinese medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications [interaktyvus]. *Isolat Compound N-S*. Springer Berlin Heidelberg, eBook, 2011, 4, [žiūrėta 2022-04-15]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-16779-9>
128. ZHOU, Jiaju, Guirong XIE ir Xinjian YAN. Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines – Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications [interaktyvus]. *Isolat Compound AB*. Springer Berlin Heidelberg. 2011, 1, p. 263 [žiūrėta 2022-04-15]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-16747-8>
129. LEE, Mei Hsien et al. The mucilage of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. October 2003, 44(4), 267–273. ISSN 0006-8063.

130. SEO, Tae J., et al. Evaluation of angiotensin-converting enzyme Inhibitory activity of some chinese herb. In: *Proceedings of the KSCN Conference*. The Korean Society of Community Nutrition, 2005. p. 179.
131. BISSWANGER, Hans. *Practical Enzymology*, Third Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2019. ISBN 978-3-527-34604-2
132. MAX, Jean-Joseph, Fatma MEDDEB-MOUELHI, Fatma, Marc BEAUREGARD and Camille CHAPADOS. Multi-wavelength dye concentration determination for enzymatic assays: evaluation of chromogenic para-nitrophenol over a wide pH range. *Applied spectroscopy* [interaktyvus]. SAGE Publications, December 2012, 66(12), 1433–144 [žiūrėta 2022-07-08] Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1366/12-06715>
133. PALA, Laura, Teja SIREC and Urs SPITZ. Modified enzyme substrates for the detection of bacteria: a review. *Molecules* [interaktyvus]. MDPI AG, August, 2020, 25(16), 3690 [žiūrėta 2022-07-09]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25163690>
134. Sigma-Aldrich protocol. Enzymatic Assay of α -GLUCOSIDASE (EC 3.2.1.20). *p*-Nitrophenyl α -D-Glucoside as substrate. Sigma-Aldrich. Sigma-Aldrich. [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per internetą: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocol/enzymatic-assay-of-a-glucosidase.html>
135. TRIFANOVA, Dora et al., Phytochemical constituents of pressurized liquid extract from *Ziziphus jujuba* Mill. (Rhamnaceae) fruits and *in vitro* inhibitory activity on α -glucosidase, pancreatic α -amylase and lipase. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* [interaktyvus]. April 2021, 27(2), 391–402 [žiūrėta 2023-03-15]. Prieiga per: <http://agrojournal.org/27/02-22.pdf>
136. STOILOVA, Ivanka et al. Constituents and *in vitro* anti-diabetic properties of *Ziziphus jujuba* (Rhamnaceae) Fruits. *Journal of pharmacognosy and phytochemical research* [interaktyvus]. Labs Pvt. Ltd, February 2017, 9, 150–158 [žiūrėta 2022-05-11]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.25258/phyto.v9i2.8056>
137. BIGGS, A. I. A spectrophotometric determination of the dissociation constants of *p*-nitrophenol and papaverine. *Royal Society of Chemistry*. In Transactions of the Faraday Society, January, 1954, 50, 800–802 [žiūrėta 2022-10-23]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1039/tf9545000800>
138. SYEDD-LEÓN, Randall, et al. Revisiting the fundamentals of *p*-nitrophenol analysis for its application in the quantification of lipases activity. *A graphical update*. [interaktyvus]. Unicienica, July 2020, 34(2), 31–43 [žiūrėta 2022-07-07]. ISSN 2215-3470. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.15359/ru.34-2.2>
139. ELLMAN, George L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* [interaktyvus]. Elsevier BV, July 1961, 7(2), 88–95 [žiūrėta 2021-10-08]. Prieiga per: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
140. CUSHMAN, D.W. and H.S. CHEUNG. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* [interaktyvus]. Elsevier BV. July 1971, 20(7), 1637–1648 [žiūrėta 2022-10-05]. ISSN 0006-2952. Prieiga per: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90292-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(71)90292-9)
141. HAYAKARI Makoto, Yoshikazu KONDO and Hiroshi IZUMI. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry* [interaktyvus]. Elsevier, February 1978, 84(2), 361–369 [žiūrėta 2022-10-05]. ISSN 0003-2697. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90053-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90053-2)
142. HOLMQUIST, Barton, Peter BÜNNING and James F. RIORDAN. A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Analytical*

- biochemistry* [interaktyvus]. Elsevier BV, June 1979. 95(2), 540–548 [žiūrėta 2022-10-05]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90769-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90769-3)
143. RONCA-TESTONI, Simonetta. Direct spectrophotometric assay for angiotensin-converting enzyme in serum. *Clinical Chemistry*. June 1983, 29(6), 1093-1096.
 144. NEELS, H. M., VAN SANDE, M. E., & SCHARPE, S. L. Sensitive colorimetric assay for angiotensin converting enzyme in serum. *Clinical chemistry*, July 1983, 29(7), 1399–1403. Prieiga per: <https://doi.org/10.1093/clinchem/29.7.1399>
 145. Sigma-Aldrich protocol. Enzymatic assay of α -Amylase (EC 3.2.1.1). Sigma-Aldrich. [žiūrėta 2022-04-19]. Prieiga per: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocol/enzymatic-assay-of-a-amylase.html>
 146. VERMEIRSSSEN, Vanessa, John VAN CAMP and Willy VERSTRAETE. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [interaktyvus]. Elsevier BV, March 2002, 51(1), 75–87 [žiūrėta 2021-05-12]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(02\)00006-4](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(02)00006-4)
 147. EYER, Peter et al. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical Biochemistry* [interaktyvus]. Elsevier BV, January 2003, 312(2), 224–227 [žiūrėta 2021-08-05] Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(02\)00506-7](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00506-7)
 148. DONATH-NAGY Gabriella, Vancea SZENDE, Silvia IMRE Comparative study if captopril Derivatization Reaction by LC-UV, LC-MS and CE-UV methods. *Croatica Chemica Acta* [interaktyvus]. Croatian Chemical Society, 2011, 84, 423–427 [žiūrėta 2022-10-31]. ISSN 0011-1643. Prieiga per : <http://dx.doi.org/10.5562/cca1787>
 149. LINEWEAVER, Hans and Dean BURK. The Determination of Enzyme Dissociation Constants *Journal of American Chemical Society* [interaktyvus]. American Chemical Society (ACS), March 1934, 56 (3), 658–666. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>
 150. BERG Jeremy J., Johan L. TYMOCZKO, L. STRYER. *Biochemistry*: in Appendix: Vmax and KM can be determined by double-reciprocal plots [interaktyvus]. 5th ed. New York: W H Freeman, 2002. [žiūrėta 2020-02-09]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22557/>
 151. KIRVELIS Dobilas. Biofizika. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 2007. ISBN 978-9955-33-055-4
 152. ENGEL, Paul C. Chapter 3 Enzyme kinetics. *The New Comprehensive Biochemistry* [interaktyvus]. Elsevier 1984, 6, 73–110 [žiūrėta 2020-01-12]. ISSN 0167-7306. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/s0167-7306\(08\)60374-9](https://doi.org/10.1016/s0167-7306(08)60374-9)
 153. Waters ACQUITY UPLC System. Ultra Performance LC Separation Science Redefined. (Part Number 720001136EN), 2005 [žiūrėta 2022-04-24]. Prieiga per: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001136en.pdf>
 154. PRICE, Elliott J. et al. Metabolite profiling of *Dioscorea* (yam) species reveals underutilised biodiversity and renewable sources for high-value compounds. *Scientific Reports* [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC, July 2016, 6(1), 29136 [žiūrėta 2020-11-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/srep29136>
 155. SHI, Wei et al. Discovery of hepatotoxic equivalent combinatorial markers from *Dioscorea bulbifera* tuber by fingerprint-toxicity relationship modeling. *Scientific Reports* [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC, January 2018, 8, 462 [žiūrėta 2022-05-12]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-18929-z>

156. ZHOU, Li, et al. Identification of phenolic components in the root and leaf of purple yam (*Dioscorea alata*) by UHPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Modern Food Science and Technology* [interaktyvus]. November, 2016, 32(11), 310–315 [žiūrėta 2022-02-06]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.046>
157. BJ, H., et al. [Studies on an aqueous soluble active constituent of Chuan-Shan-Long (*Dioscorea nipponica* Makino). I. Isolation and identification of *p*-hydroxy benzyl tartaric acid (piscidic acid) (author's transl)]. *Acta pharmaceutica Sinica*, 1980,15, 764–765.
158. LEBOT, V., R. MALAPA, T. MOLISALÉ Development of HP-TLC method for rapid quantification of sugars, catechins, phenolic acids and saponins to assess Yam (*Dioscorea* spp.) tuber flour quality. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* [interaktyvus]. Cambridge University Press (CUP), October, 2018, 17(1), 62–72 [žiūrėta 2021-05-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1017/s1479262118000333>
159. WAN, Debin et al. Differentiation of glucose-containing disaccharides isomers by fragmentation of the deprotonated non-covalent dimers using negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*, [interaktyvus]. Elsevier BV, October 2013, 115, 870–875 [žiūrėta 2022-01-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.055>
160. PARVEEN, Ifat et al. Extraction, structural characterisation and evaluation of hydroxycinnamate esters of orchard grass (*Dactylis glomerata*) as substrates for polyphenol oxidase. *Phytochemistry* [interaktyvus]. Elsevier BV, November 2008, 69(16), 2799–2806 [žiūrėta 2020-03-07]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.08.019>
161. XUE, Meng et al. Stability and degradation of caffeoylquinic acids under different storage conditions studied by high-performance liquid chromatography with photo diode array detection and high-performance liquid chromatography with electrospray ionization collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Molecules* [interaktyvus]. 2016, 21(7), 948 [žiūrėta 2022-08-14]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules21070948>
162. AMMAR, Sonda et al. New insights into the qualitative phenolic profile of *Ficus carica* L. fruits and leaves from Tunisia using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and their antioxidant activity. *Royal Society of Chemistry, Advances* [interaktyvus]. 2015, 5(26), 20035–20050 [žiūrėta 2021-11-06]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1039/c4ra16746e>
163. ABLAJAN, Keyume, Anagu, TUOHETI. Fragmentation characteristics and isomeric differentiation of flavonol *O*-rhamnosides using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [interaktyvus]. Wiley, November 2012, 27(3) 451–460. [žiūrėta 2022-01-11]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.6476>
164. KHOO, Hock Eng, Azrina AZLAN and Noor Atiqah Aizan ABD KADIR. Fatty acid profile, phytochemicals, and other substances in *Canarium odontophyllum* fat extracted using supercritical carbon dioxide. *Frontiers in Chemistry* [interaktyvus]. Frontiers Media SA, January 2019, 7(5), 1–15 [žiūrėta 2021-01-08]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2019.00005>
165. WANG, Jinfeng et al. Analysis of chemical constituents of *Melastoma dodecandrum* Lour. by UPLC-ESI-Q-Exactive Focus-MS/MS. *Molecules* [interaktyvus], MDPI

- AG, March 2017, 22(3), 476 [žiūrėta 2022-01-03]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22030476>
166. ZENG, Xiaoxuan, Dahui LIU, Luqi HUANG. Metabolome profiling of eight Chinese Yam (*Dioscorea polystachya* Turcz.) varieties reveals metabolite diversity and variety specific uses. *Life* [interaktyvus]. MDPI AG, July 2021, 11(7), 687 [žiūrėta 2022-06-03]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/life11070687>
 167. QIN, Hailin, Dequan YU. 3.11 Sterodal saponins. In *1H NMR Handbook of Natural Products: Saponins*; De Gruyter: Berlin, Germany; Boston, MA, USA, 2021, 2, 349–486 [žiūrėta 2022-10-13]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1515/9783110631555-011>
 168. XIE, Tong et al. Rapid identification of ophiopogonins and ophiopogonones in *Ophiopogon japonicus* extract with a practical technique of mass defect filtering based on high resolution mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* [interaktyvus]. Elsevier BV, March 2012, 1227, 234–244 [žiūrėta 2022-02-09]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.017>
 169. HAMED, Arafa I., et al. Steroidal saponins from the aerial parts of *Tribulus pentandrus* Forssk. *Phytochemistry* [interaktyvus]. Elsevier, November, 2004, 65(21), 2935–2945 [žiūrėta 2022-01-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.07.003>
 170. SERTIĆ, Miranda et al. Analysis of aucubin and catalpol content in different plant parts of four *Globularia* species. *Journal of Applied Botany and Food Quality* [interaktyvus]. May, 2015, 88, 209–214. Prieiga per: <https://ojs.openagrar.de/index.php/JABFO/article/view/4543>
 171. LIU, Jin Song et al. Chemical constituents from fresh tubers of *Dioscorea bulbifera*. *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica* [interaktyvus]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, February, 2017, 42(3), 510–516 [žiūrėta 2022-07-18]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.2017.0009>
 172. SUN, Yong, et al. Rapid characterization of chemical constituents in *Radix Tetrastigma*, a functional herbal mixture, before and after metabolism and their antioxidant/antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods* [interaktyvus]. Elsevier BV, October 2015, 18, 300–318 [žiūrėta 2022-04-19]. ISSN 1756-4646. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.009>
 173. DUEÑAS, Montserrat et al. Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC–DAD–ESI/MS. *European Food Research and Technology* [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC, January 2008, 227(4), 1069–1076 [žiūrėta 2020-12-07]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0821-2>
 174. LI, Rui et al. ESI-QqTOF-MS/MS and APCI-IT-MS/MS analysis of steroid saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica*. *Journal Mass Spectrometry* [interaktyvus]. Wiley, January, 2006, 41(1), 1–22. ISSN 1076-5174. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/jms.988>
 175. ADENIRAN, A. A., and M. A. SONIBARE. In vitro antioxidant activity, brine shrimp lethality and assessment of bioactive constituents of three wild *Dioscorea* species. *Journal of Food Measurement and Characterization* [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC, November 2017, 11(2), 685–695 [žiūrėta 2022-01-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9438-5>
 176. OZO, O.N., J.C. CAYGILL and D.G. COURSEY. Phenolics of five yam (*dioscorea*) species. *Phytochemistry* [interaktyvus]. Elsevier BV, January 1984, 13(2), 329 – 331 [žiūrėta 2022-06-16]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)80327-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)80327-1)

177. DEY, Priyankar et al. Evaluation of anti-inflammatory activity and standardisation of hydro-methanol extract of underground tuber of *Dioscorea alata*. *Pharmaceutical Biology* [interaktyvus]. Informa UK Limited, February 2016, 54(8), 1474–1482 [žiūrėta 2022-06-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1104702>
178. ZHANG, Yi et al. Anti-inflammatory steroids from the rhizomes of *Dioscorea septemloba* Thunb. *Steroids* [interaktyvus]. Oxford: Elsevier Science, 2016, 112, 95–102 [žiūrėta 2022-02-04]. ISSN 0039-128X. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2016.05.007>
179. LYSIUK, Roman et al. GLC/MS – determination of monosaccharides contents in above-ground portions of *Astragalus glycyphyllos* L [interaktyvus]. *Forum*, December, 2015, 6(6), 66–69.
180. AZIMOVA, Shakhnoza S. (ed.). *Natural Compounds* [interaktyvus]. Springer New York, 2013. ISBN 978-1-4614-0537-5. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0537-5>
181. WANG, Yulin; BA, Ying. Studies on the chemical constituents of Radix astragali and their inhibitory effect on HepG2 proliferation. *Biomedical Research-India* [interaktyvus]. 2015, 26(2), 393–398 [žiūrėta 2022-11-27]. ISSN 0970-938X. Prieiga per: <http://www.biomedres.info>
182. The Enzyme List. Carbohydrate-Active Enzymes Database [žiūrėta 2022-04-22]. Prieiga per internetą: <https://www.cazy.org/GH13.html>
183. GUO, Xuan Xiao et al. Extracts inhibit diabetes-related enzymes and protect HepG2 cells against oxidative stress and insulin resistance induced by FFA. *Food Science and Technology Research* [interaktyvus]. Japanese Society for Food Science and Technology, 2015, 21(5), 677–683 [žiūrėta 2022-10-15]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3136/fstr.21.677>
184. ACHARYA, K. Ravi et al. Ace revisited: A new target for structure-based drug design. *Nature reviews drug discovery* [interaktyvus]. Springer Science and Business Media LLC, November 2003, 2(11), 891–902 [žiūrėta 2022-11-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/nrd1227>
185. CHEN, Ping et al. Captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, attenuates the severity of acute pancreatitis in rats by reducing expression of matrix metalloproteinase 9. *The Tohoku journal of experimental medicine* [interaktyvus]. Tohoku University Medical Press, June, 2006, 209(2), 99–107 [žiūrėta 2022-11-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1620/tjem.209.99>
186. TENFEN, Adrielli et al. Phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS of six Brazilian *Eugenia* species and their potential as cholinesterase inhibitors. *Natural Product Research* [interaktyvus]. Informa UK Limited, November 2021, 35(15), 2608–2611 [žiūrėta 2022-04-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1686369>
187. BENNETT, Aaren. *Enzyme Kinetics and Regulation*. Scientific e-Resources, 2018

INFORMACIJA APIE AUTORE

Vardas, Pavard:

2008 m.

2008/04/22

Darbo patirtis:

Nuo /2008/09 iki dabar

Nuo 2012 iki dabar

Aušra Adomėnienė

Suteiktas farmacijos magistro kvalifikacinis laipsnis ir vaistininko profesinė kvalifikacija
MA Nr. 0001338

Kauno medicinos universitetas, Farmacijos
fakultetas

Vaistininko praktikos licencija BB000174

Lektorius, Medicinos fakultetas, Kauno
kolegija

Vaistininkas, "BENU vaistinė, LIETUVA,
UAB", Kaunas

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Mokslinės publikacijos disertacijos tema, paskelbtos mokslinės informacijos duomenų bazės „Clarivate Analytics WOS“ sąrašo leidiniuose:

1. ADOMĖNIENĖ, Aušra and Petras Rimantas, VENSKUTONIS. Enzyme inhibitory activity of *Dioscorea nipponica* Makito hydroethanolic extracts of leaves and tubers in relation to their major secondary metabolites // Food bioscience. Amsterdam: Elsevier, 2022, vol. 50, pt. A, art. no. 102059, p. 1-13. ISSN 2212-4292. eISSN 2212-4306. (I.F: 5,318).
2. ADOMĖNIENĖ, Aušra, Audrius PUKALSKAS, Ona RAGAŽINSKIENĖ and Petras Rimantas VENSKUTONIS. Health beneficial phytochemicals in *Dioscorea caucasica* Lipsky leaves and tubers and their inhibitory effects on physiologically important enzymes. *Plants*. 2022, 11(10), 1341. ISSN 2223-7747. (I.F: 4,658)
3. ADOMĖNIENĖ, Aušra and Petras Rimantas, VENSKUTONIS *Dioscorea* spp.: comprehensive review of antioxidant properties and their relation to phytochemicals and health Benefits // *Molecules*. Basel: MDPI, 2022, vol. 27, iss. 8, art. no. 2530, p. 1-34. ISSN 1420-3049. (I.F: 4,927).

Kitos mokslinės publikacijos ne disertacijos tema, paskelbtos mokslinės informacijos duomenų bazės „Clarivate Analytics WOS“ sąrašo leidiniuose:

1. SLAPŠYTĖ, Gražina, Veronika DEDONYTĖ, Aušra ADOMĖNIENĖ, Juozas Rimantas, LAZUTKA, Jūratė KAZLAUSKAITĖ, Ona, RAGAŽINSKIENĖ, Petras Rimantas VENSKUTONIS. Genotoxic properties of *Betonica officinalis*, *Gratiola officinalis*, *Vincetoxicum luteum* and *Vincetoxicum hirundinaria* extracts // *Food and Chemical Toxicology*. Oxford: Elsevier, 2019, vol. 134, art. no. 110815, p. 1-10. ISSN 0278-6915. eISSN 1873-6351. (I.F: 4,679)

Kitos mokslinės publikacijos disertacijos tema, paskelbtos kituose recenzuojamuose mokslo leidiniuose. Nacionalinėse (Lietuvos) leidyklose.

1. ADOMĖNIENĖ, Aušra, Rita KAZERNAVIČIŪTĖ, Petras Rimantas, VENSKUTONIS. Vaistinių augalų paieška cukrinio diabeto prevencijai // *Sveikatos mokslai = Health sciences in Eastern Europe*. Vilnius: Sveikatos mokslai. 2020, t. 30, Nr. 6, p. 65-68. ISSN 1392-6373. [Index Copernicus].

Pranešimai disertacijos tema, išspausdinti Lietuvos ir užsienio pranešimų medžiagoje:

1. VENSKUTONIS, Petras Rimantas, Aušra ADOMĖNIENĖ, Jorūnė ZANDOVAITĖ, Audrius PUKALSKAS. Phytochemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Dioscorea caucasica* leaves and tubers // IUFoST 2022 Singapore: 21st world congress of food science &

technology "Future of food: innovation, sustainability & health", 31 October - 3 November 2022. Singapore, 2022, 10, p. 145.

2. VENSKUTONIS, Petras Rimantas, Aušra ADOMĖNIENĖ, Audrius PUKALSKAS, Ona RAGAŽINSKIENĖ. Phytochemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Dioscorea caucasica* and *D. nipponica* leaf and tuber extracts // 2022 annual conference & exhibition: Functional foods, nutraceuticals, natural health products, and dietary supplements: October 2-5, Istanbul, Turkey: book of abstracts. Istanbul : ISNFF. 2022, P60, p. 103.
3. ADOMĖNIENĖ, Aušra, Petras Rimantas, VENSKUTONIS. α -glucosidase inhibitory activity of *Astragalus glycyphyllos* ethanolic extract // FoodBalt 2021: 14th Baltic conference on food science and technology "Sustainable food for conscious consumer": abstract book / editor: Mari-Liis Kutti. Tallinn : Center of Food and Fermentation Technologies. 2021, p. 98.
4. ADOMĖNIENĖ, Aušra, Petras Rimantas, VENSKUTONIS. Enzyme inhibitory activity of hydroethanolic extract of yam (*Dioscorea caucasica* Lipsky) leaves // Chemistry and chemical technology: Lithuanian chemists conference, 2019 May 16, Lithuanian Academy of Sciences, Vilnius: conference book. Vilnius: Vilnius University, 2019, p. 22. eISBN 9786090701676.
5. ADOMĖNIENĖ, Aušra, Renata, BARANAUSKIENĖ, Petras Rimantas, VENSKUTONIS. Enzyme inhibitory activity and total phenolic content of yam extracts // Foodbalt 2019: 13th Baltic conference on food science and technology "Food. Nutrition. Well-being" and NEEFOOD 2019: 5th North and East European congress on food: Jelgava May 2-3, 2019: abstract book / Latvia University of Life Sciences and Technologies. Faculty of Food Technology. Jelgava: LLU, 2019, P41., p. 123. ISBN 9789984483177.
6. ADOMĖNIENĖ, Aušra, Rita, KAZERNAVIČIŪTĖ, Audrius PUKALSKAS, Ona, RAGAŽINSKIENĖ, Petras Rimantas VENSKUTONIS. Bioactives and phytochemical composition of *Dioscorea nipponica* Makino and *D. caucasica* Lipsky extracts as possible sources of functional ingredients // International conference and exhibition on nutraceutical and functional foods 2018: October 14-17, 2018 Vancouver, BC, Canada. ISNFF, 2018, p. 134.
7. ADOMĖNIENĖ, Aušra, Petras Rimantas, VENSKUTONIS. Natural agents for the inhibition for enzymes responsible for hyperglycemia // FoodBalt – 2018: 12th Baltic conference on food science and technology "Food R&D in the Baltics and beyond", May 17-18, 2018 Kaunas, Lithuania: abstract book / Kaunas University of Technology. Department of Food Science and Technology. Kaunas : Kauno technologijos universitetas, 2018, PP18., p. 71. eISBN 9786090214626.

Kitos konferencijos

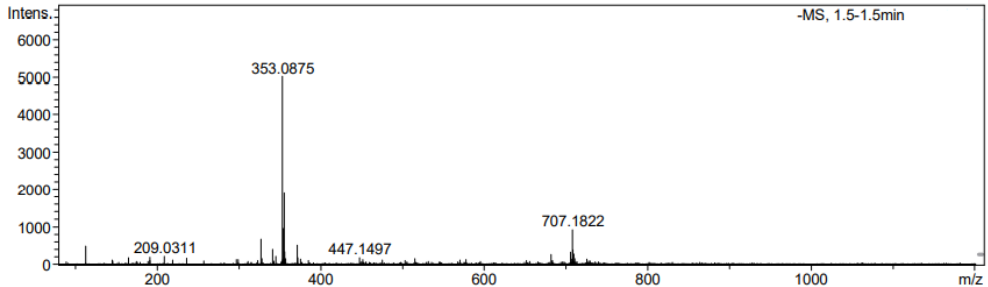
1. ADOMĖNIENĖ, Aušra, Renata, BARANAUSKIENĖ, Petras Rimantas, VENSKUTONIS. Enzyme inhibitory activity and total phenolic content of yam extracts // Technorama 2019: from vision to innovation!, May 9, 2019, innovation catalogue. [Kaunas]: KTU. 2019, project no. 34, p. 21.

PADĖKA

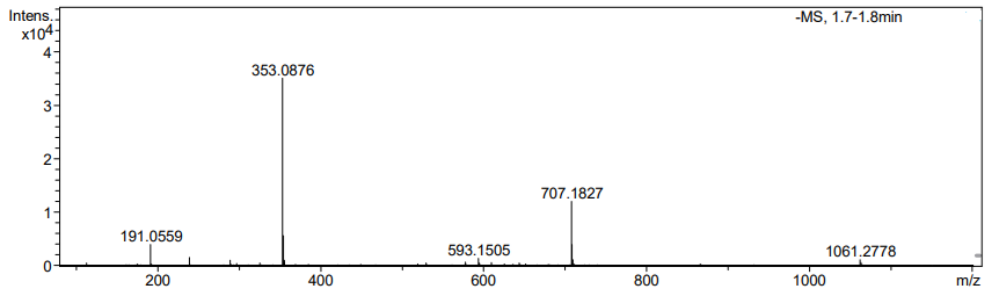
Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui prof. dr. Petriui Rimantui Venskutoniui už suteiktą galimybę atlikti darbą ir tobulėti, už vertingus patarimus darbo metu, už pastabumą ir kantrybę. Dėkoju Cheminės technologijos fakulteto Maisto mokslo ir technologijos katedros doc. dr. R. Degutytei ir Vytauto Didžiojo universiteto Instrumentinės analizės atviros prieigos centro doc. dr. M. Stankevičiui už kruopštų šio darbo peržiūrėjimą, už tikslias pastabas ir vertingus pasiūlymus. Dėkoju artimiesiems už kantrybę.

PRIEDAI

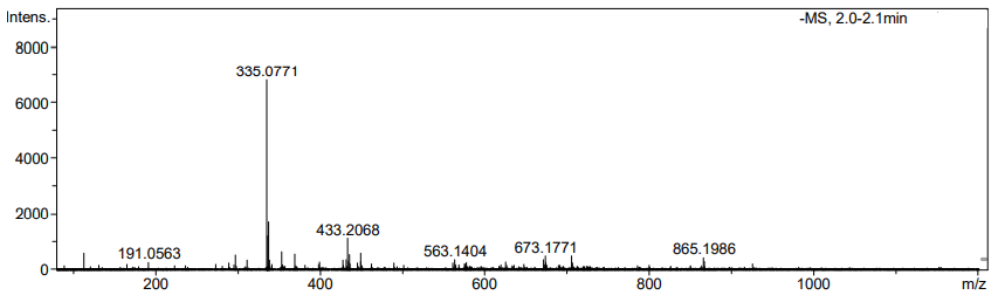
1 priedas. Kaukazinės dioskorėjos (*Dioscorea caucasica* Lipsky) chromatogramos, gautos UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



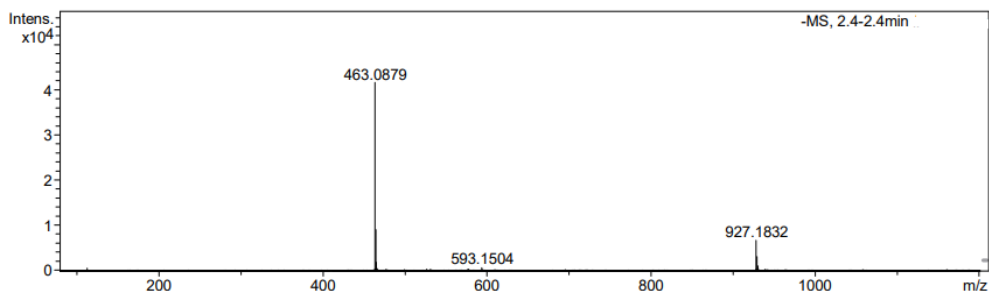
1 pav. 3-*O*-kafeoilchino rūgšties (m/z 353,0875; [C₁₆H₁₇O₉]⁻) MS spektras, nustatytas *D. caucasica* lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



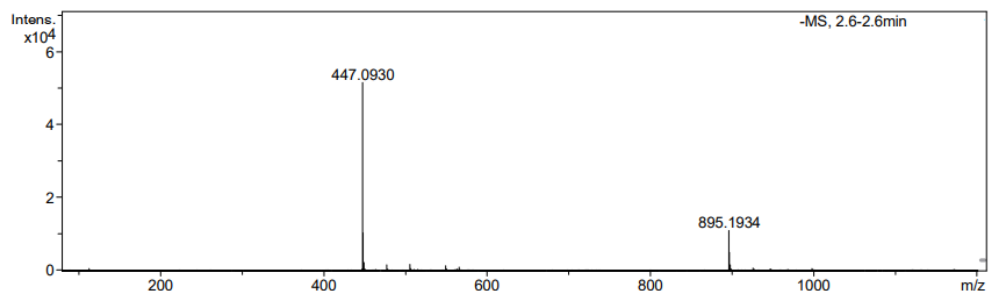
2 pav. 5-*O*-kafeoilchino rūgšties (m/z 353,0876; [C₁₆H₁₇O₉]⁻) MS spektras, nustatytas *D. caucasica* lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



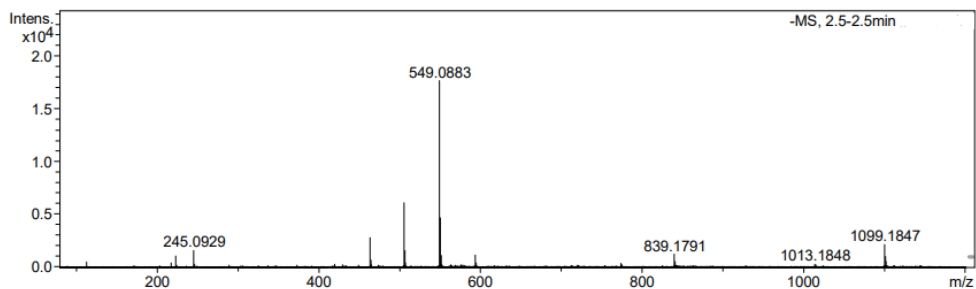
3 pav. Kafeoilšikimo rūgšties (m/z 335,0771; [C₁₆H₁₅O₈]⁻) MS spektras, nustatytas *D. caucasica* lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



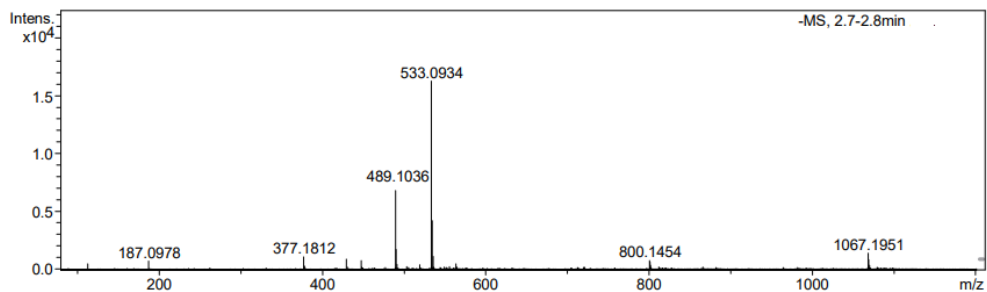
4 pav. Kvercetin-3-*O*-gliukozido (izokvercitrino) (m/z 463,0879; [C₂₁H₁₉O₁₂]⁻) MS spektras, nustatytas *D. caucasica* lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



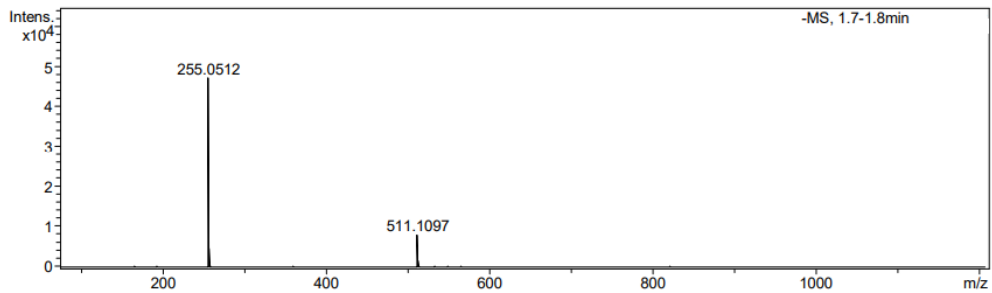
5 pav. Kvercetin-3-*O*-ramnozido (kvercitrino) (m/z 447,0930; [C₂₁H₁₉O₁₁]⁻) MS spektras, nustatytas *D. caucasica* lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



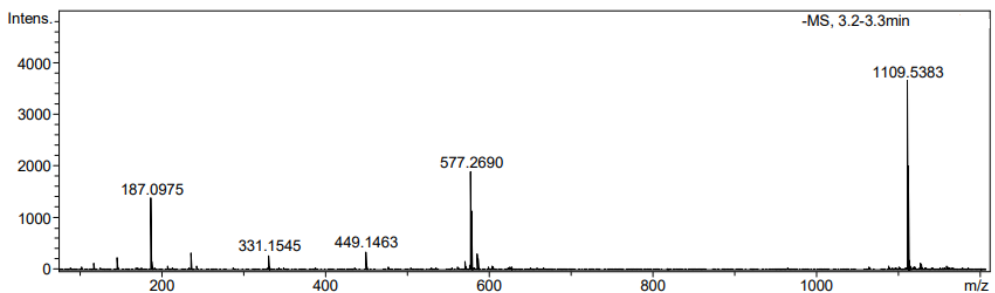
6 pav. Kvercetin-*O*-malonil(heksozido) (m/z 549,0883; [C₂₄H₂₁O₁₅]⁻) MS spektras, nustatytas *D. caucasica* lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



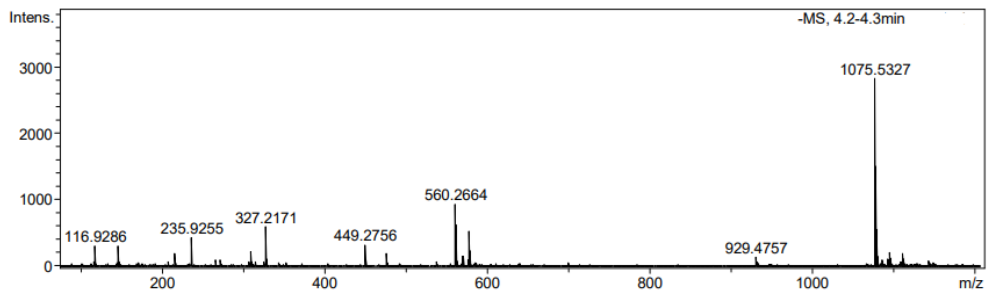
7 pav. Kvercetin-*O*-malonil(ramnozido) (m/z 533,0934; [C₂₄H₂₁O₁₄]⁻) ir kvercetin-3-*O*-acetil(ramnozido) (m/z 489,136; [C₂₃H₂₁O₁₂]⁻) MS spektrai, nustatyti *D. caucasica* lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



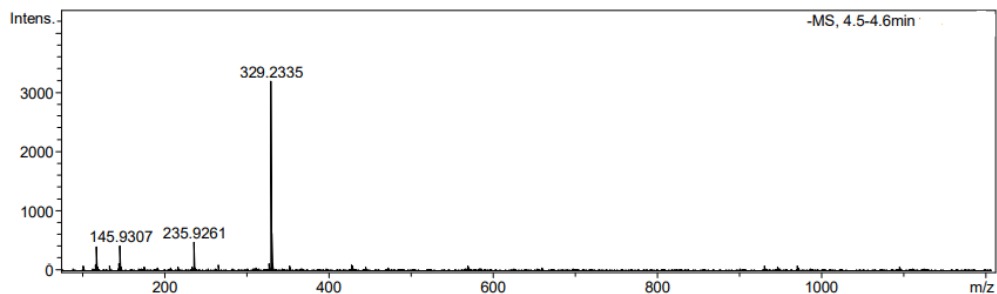
8 pav. Piscido rūgšties (m/z 255,0512; [C₁₁H₁₁O₇]⁻) MS spektras, nustatytas *D. caucasica* šakniastiebių ekstrakto UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



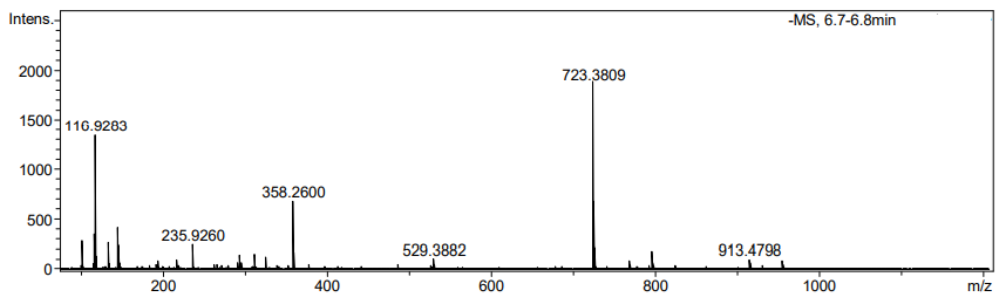
9 pav. Steroidinio saponino izomero (m/z 1109,5383; [C₅₂H₈₅O₂₅]⁻) MS spektras, nustatytas *D. caucasica* šakniastiebių ekstrakto UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



10 pav. Steroidinio saponino (angl. *ophiopogonin derivative*) (m/z 1075,5327; [C₅₂H₈₃O₂₃]⁻) MS spektras, nustatytas *D. caucasica* šakniastiebių ekstrakto UESC/Q-TOF-MS/MS metodu

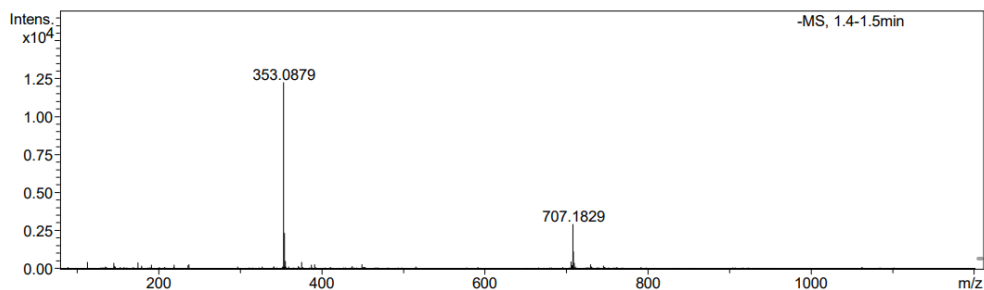


11 pav. Trihidroksioktadeceno rūgšties (m/z 329,2335; $[C_{18}H_{33}O_5]^-$) MS spektras, nustatytas *D. caucasica* šakniastiebių ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu

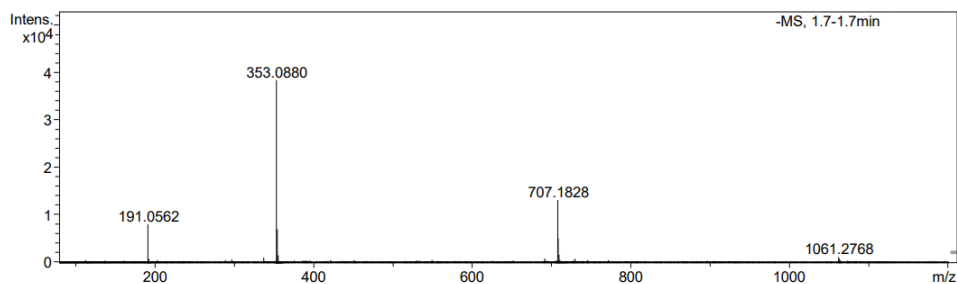


12 pav. Hidroksidodekanoilkarnitino esterio (m/z 358,2600; $[C_{19}H_{36}NO_5]^-$) ir nežinomo jungino (galaktolipido) (m/z 723,3809; $[C_{35}H_{59}O_{16}]^-$) MS spektrai, nustatyti *D. caucasica* šakniastiebių ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu

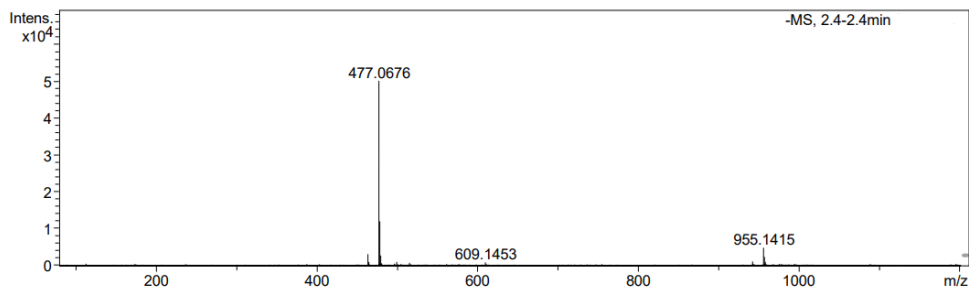
2 priedas. Niponinės dioskorėjos (*Dioscorea nipponica* Makino) chromatogramos gautos UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



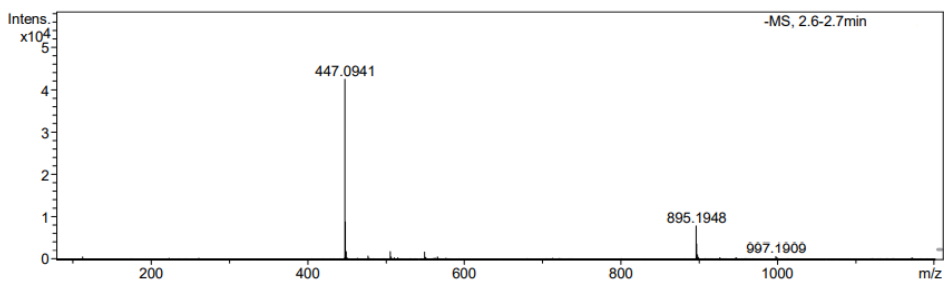
1 pav. 3-*O*-kafeoilchino rūgšties (m/z 353,0879; [C₁₆H₁₇O₉]⁻) MS spektras, nustatytas *D. nipponica* lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



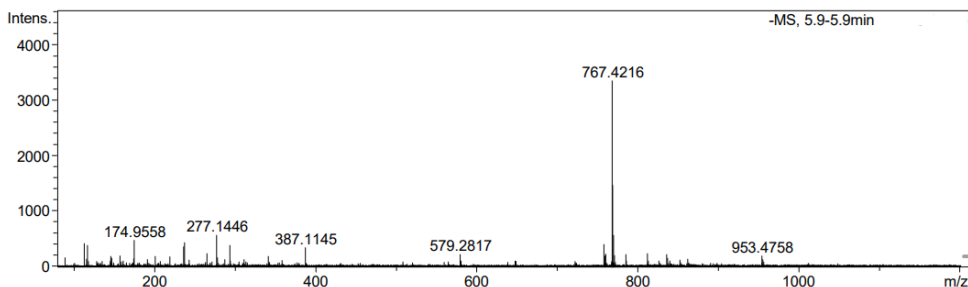
2 pav. 5-*O*-kafeoilchino rūgšties (m/z 353,0880; [C₁₆H₁₇O₉]⁻) MS spektras, nustatytas *D. nipponica* lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



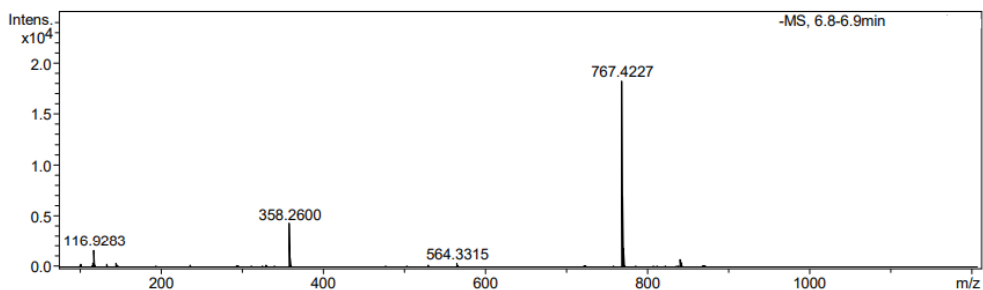
3 pav. Kvercetin-3-*O*-gliukuronido (m/z 477,0676; [C₂₁H₁₇O₁₃]⁻) MS spektras, nustatytas *D. nipponica* lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



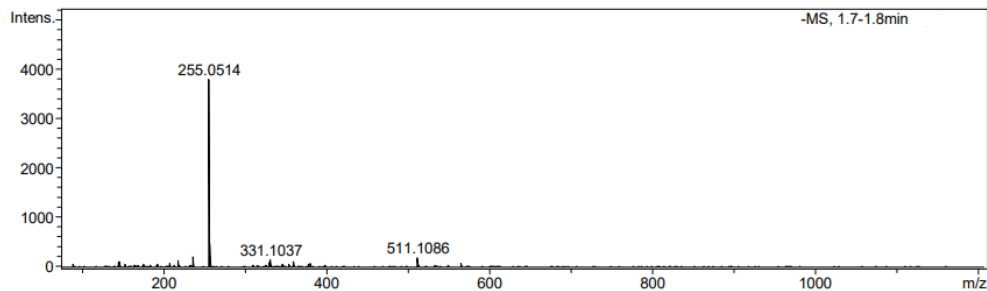
4 pav. Kvercetin-3-*O*-ramnozido (kvercitrino) (m/z 447,0941; $[C_{21}H_{19}O_{11}]^-$) MS spektras, nustatytas *D.nipponica* lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



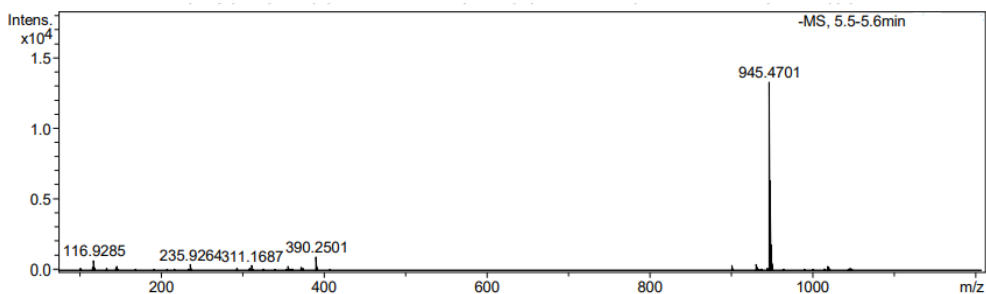
5 pav. Steroidinio glikozido pentandrozido B (m/z 767,4216; $[C_{40}H_{63}O_{14}]^-$) MS spektras, nustatytas niponinės dioskorėjos lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



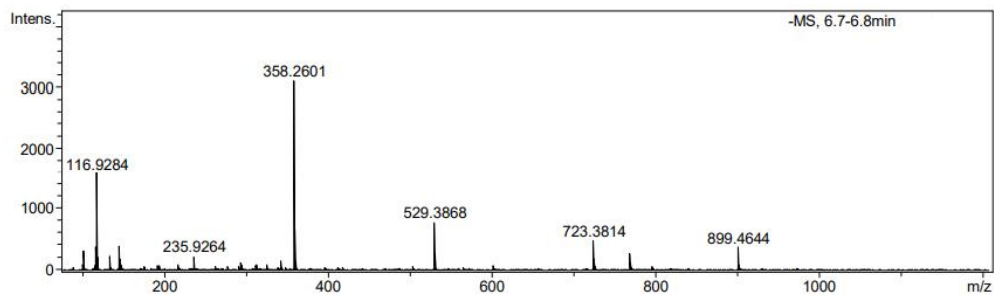
6 pav. Steroidinio glikozido pentandrozido B (m/z 767,4227; $[C_{40}H_{63}O_{14}]^-$) MS spektras, nustatytas niponinės dioskorėjos šakniastiebių ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



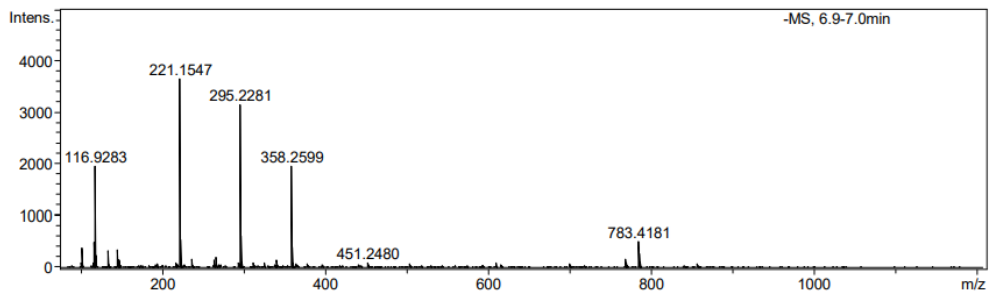
7 pav. Piscido rūgštis (m/z 255,0514; $[C_{11}H_{11}O_7]^-$) MS spektras, nustatytas *D. nipponica* šakniastiebių ekstrakto UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



8 pav. Steroidinio saponino (m/z 945,4701; $[C_{46}H_{73}O_{20}]^-$) MS spektras, nustatytas *D. nipponica* šakniastiebių ekstrakto UESC/Q-TOF-MS/MS metodu

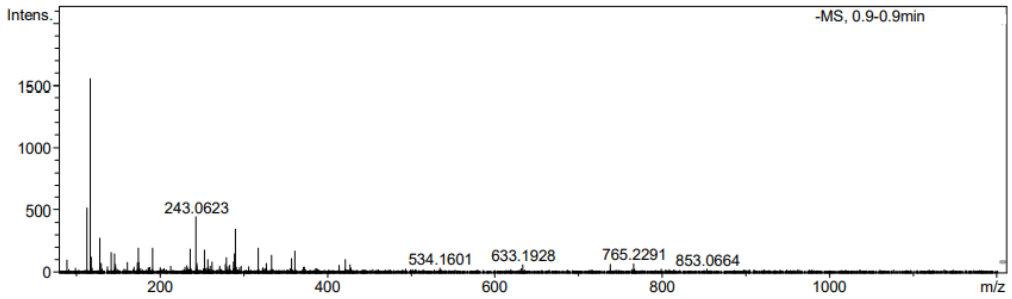


9 pav. 3-hidroksidodekanoilkarmitino (m/z 358,2601; $[C_{19}H_{36}NO_5]^-$) MS spektras, nustatytas *D. nipponica* šakniastiebių ekstrakto UESC/Q-TOF-MS/MS metodu

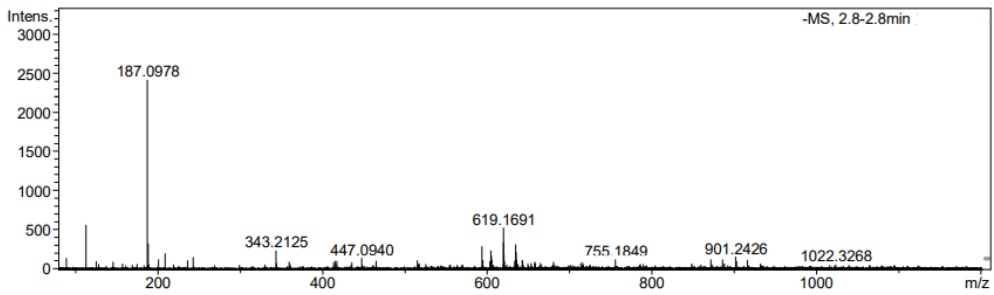


10 pav. Hidroksioktadekadieno rūgšties (m/z 295,2281; $[C_{18}H_{31}O_3]^-$) MS spektras, nustatytas *D.nipponica* šakniastiebių ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu

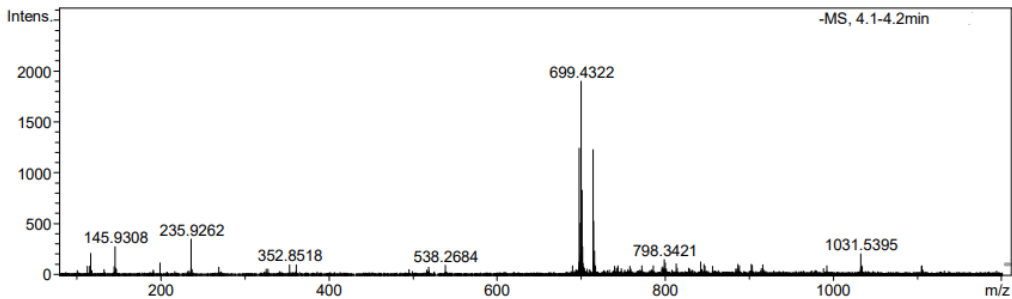
3 priedas. Salžialapės kulkšnės (*Astragalus glycyphyllos* L.) chromatogramos gautos UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



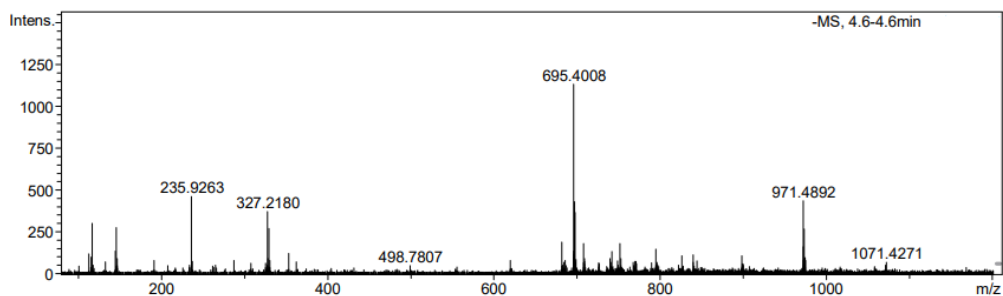
1 pav. Uridino (m/z 243,0623; $[C_9H_{11}N_2O_6]^-$) MS spektras, nustatytas *A. glycyphyllos* L. lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



2 pav. Azelaino rūgšties (m/z 187,0978; $[C_9H_{15}O_4]^-$) MS spektras, nustatytas *A. glycyphyllos* L. lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



3 pav. Cikloartano glikozido (m/z 699,4322; $[C_{37}H_{63}O_{12}]^-$) MS spektras, nustatytas *A. glycyphyllos* L. lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu



4 pav. Cikloartano glikozido (m/z 695,4008; $[C_{37}H_{59}O_{12}]^-$) MS spektras, nustatytas *A. glycyphyllos* L. lapų ekstrakte UESC/Q-TOF-MS/MS metodu

UDK 577.15+542.61+581.19](043.3)

SL 344. 2023-05-08, 23,5 leidyb. apsk. I. Tiražas 14 egz. Užsakymas 78.

Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas

Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas