

ĮVAIRIŲ ŠALAVIJO RŪŠIŲ EKSTRAKTŲ ANTIOKSIDACINĖS SAVYBĖS, FITOCHEMINĖ SUDĖTIS IR JŲ PRITAIKYMO GALIMYBĖS

dr. Vaida Makaravičienė
Šv. Ignaco Lojolos kolegija

ANOTACIJA

Naujų funkcionaliųjų maisto komponentų ir jų gamtinių žaliavų paieška, bei išsamus apibūdinimas ir panaudojimo galimybių įvertinimas – viena iš šiuo metu perspektyviausių maisto mokslo sričių. Iki šiol jau atliktais

tyrimais įrodyta, kad augalinės kilmės komponentai pasižymi gydomosiomis ir prevencinėmis savybėmis prieš epidemiologinį mastą įgavusius susirgimus – vėžį, širdies ir kraujagyslių ligas ir kt. Todėl šio tyrimo tikslas yra įsisavinti naujus fitokomponentų bioaktyvumo įvertinimo metodus ir juos taikant kartu su šiuo metu įsisavintais metodais išsamiai ištirti pasirinktų *Salvia* augalų rūšių fitocheminę sudėtį, antioksidacines bei kitas sveikatai naudingas savybes ir įvertinti jų panaudojimo funkcionaliųjų maisto produktų ar maisto papildų gamybai perspektyvas. Ekstraktų sudėtis bus tiriama skysčių chromatografijos (ypač didelio slėgio – UPLC) metodais su įvairiais detektoriais (hibridiniu kvadrupolio-skriejimo laiko masių analizatoriumi, UV metodais). Bus įvertintas kiekvieno ekstrakto fitocheminis profilis ir nustatyti dominuojantys junginiai. Bus pritaikyta plonasluoksnės, kolonėlinės (flash) chromatografijos metodai, kurie taip pat padės tolesniam nežinomų junginių skirstymui ir identifikavimui. Įvertinus visas šias šalavijo ekstraktų savybes teoriškai bus įvertinta ekstraktų pritaikymo galimybės maisto papildų ar funkcionaliojo maisto ingredientų kūrimui. Biologiškai veiklių sudedamųjų dalių pridėjimas į maistą yra vienas pagrindinių būdų plėtoti funkcinius maisto produktus. Maisto produktas praturtinamas ir, patekęs į kūną, atlieka sveikatai palankius fiziologinius pokyčius: padeda pašalinti laisvųjų radikalų perteklių žmogaus organizme, pasižymi stipriais farmakologiniais poveikiais ar padeda pašalinti toksinus. Apibendrinant galima teigti, kad įvairūs šalavijo ekstraktai sukaupia vertingų biologiškai veiklių medžiagų, kurios turi teigiamą poveikį sveikatai. Galima prognozuoti, kad šios šalavijo rūšys gali būti auginamos ir taikomos funkcionaliojo maisto ar maisto papildų gamyboje.

Raktiniai žodžiai: šalavijas, antioksidacinis aktyvumas, fitocheminė sudėtis, funkcionalusis maistas.

Įvadas

Temos aktualumas. Augalų karalija yra vienas iš svarbiausių natūralių antioksidantų šaltinių (Maestri ir kiti, 2006), kuriuos galima pritaikyti kaip sveikatai naudingus ingredientus funkciniams maisto produktams ar papildams kurti. Remiantis statistikos duomenimis, šiuo metu daugiau nei 30 % visų išrašomų vaistų visame pasaulyje yra augalinės kilmės (Schmidt ir kiti, 2008). „Natūralumas“ yra vienas iš svarbiausių veiksnių vertinant pagal tai, kam vartotojas teikia pirmenybę, rinkdamiesi įvairius žmonėms vartoti skirtus produktus. Todėl nuolat didėja susidomėjimas sistemingesniu ir visapusišku mažiau ištirtų augalų rūšių charakterizavimu (Abdille ir kiti, 2005). Šie moksliniai tyrimai yra labai reikalingi kuriant naujus ir natūralius preparatus, kurie galėtų suteikti maisto produktams įvairiapusę naudą, t. y. sustiprinti sveikatai teikiamą naudą ir suteikti antioksidacinę apsaugą (Yao ir kiti, 2004); pastaruoju metu juos galima laikyti perspektyviomis alternatyvomis šiuo metu plačiai vartojamiems sintetiniams maisto papildams, tokiems kaip butilintas hidroksitoluenas (BHT), butilintas hidroksianizolis (BHA), benzoatai ir kiti, kurių vartotojas vis dažniau atsisako, nes nerimauja dėl jų saugos (Mikalauskas, 2006).

Tyrimo problema. Lūpažiedžių (lot. *Lamiaceae*) šeimos žolelės yra vienos iš populiariausių aromatinių, vaistinių ir prieskoninių augalų, daugelis jų yra plačiai ištirtos, ir nurodoma, kad juose susikaupia didelis eterinių aliejų, stiprių fenolinių antioksidantų ir kitų vertingų sudedamųjų dalių kiekis. Vaistinis šalavijas (lot. *S. officinalis*) yra nuodugniausiai ištirta *Salvia* rūšis, o štai informacijos apie daugelį kitų *Salvia* rūšių yra gana mažai. Norint užpildyti šią spragą, pasirinkta 6 skirtingos šalavijo rūšys: *S. amplexicaulis*, *S. austriaca*, *S. forsskaolii*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, *S. officinalis*. *S. officinalis* į mokslinius tyrimus įtrauktas palyginimo tikslais.

Tyrimo objektas – tyrimams atlikti pasirinktas daugiametis žolinis notrelinių (lot. *Lamiaceae*) šeimos augalas – šalavijas (lot. *Salvia*). Tyrimams atlikti naudojama 6 šios genties augalų rūšių: *S. amplexicaulis*, *S. austriaca*, *S. forsskaolii*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, *S. officinalis*. Tyrimams skirti augalai išauginti Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sode, vaistinių ir prieskoninių augalų kolekcijoje. Prieš atliekant tyrimus augalai buvo susmulkinti smulkintuvu, naudojant 0,5 mm akučių dydžio sietą. Susmulkinti augalai laikomi sandariai uždarytuose stikliniuose induose, vėsioje, tamsioje ir sausame kambarėje.

Tyrimo tikslas – įvertinti mažai tirtų šalavijo augalų rūšių ekstraktų antioksidacines savybes bei fenolinių junginių sudėtį, jų išskyrimui naudojant skirtingo poliškumo tirpiklius bei teoriškai įvertinti šalavijo panaudojimo galimybes funkcionaliųjų maisto ingredientų sukūrimui.

Tyrimo uždaviniai:

1. Nustatyti skirtingų ekstrakcijos metodų ir tirpiklių įtaką tirpių frakcijų išskyrimui iš 6 pasirinktų šalavijo rūšių. Įvertinant gautų ekstraktų išeigas.
2. Įvertinti tirpių frakcijų, gautų skirtingais metodais iš 6 šalavijo rūšių, antioksidacinį aktyvumą, taikant įvairius *in vitro* antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodus.
3. Nustatyti fenolinių jungių sudėtį šalavijo rūšių ekstraktuose.
4. Nustatyti kiekybinę fenolinių junginių sudėtį.
5. Remiantis gautais eksperimentiniais rezultatais, teoriškai įvertinti šalavijo ekstraktų potencialą kurti funkcionaliuosius sveikatai naudingus ingredientus.

Tyrimo metodai: Iškeltiems tikslams įgyvendinti buvo pritaikyti aplinkai draugiški medžiagų išskyrimo metodai: superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu (SKE-CO₂) ir pagreitintos ekstrakcijos, naudojant skirtingo poliškumo tirpiklius, deriniai. Ekstrahavimas atliktas anglies dvideginiu, tada 96 % etanolio ir galiausiai vandeniu (poliškiausiu tirpikliu). Ekstrahavimas anglies dvideginiu atliktas norint pašalinti lipofilinius junginius.

Etanolinių ir vandeninių ekstraktų savybės įvertintos taikant įvairius antioksidacinio aktyvumo (AA) tyrimų metodus *in vivo*. Atliekant tyrimą buvo taikyti trys metodai: bendro fenolinių junginių kiekio (BFJK) nustatymas, deguonies radikalų sujungimo gebos nustatymas (ORAC) ir vienas radikalų sujungimo gebos nustatymo metodas (ABTS^{•+}). Norint atlikti išsamų ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimą, būtina remtis keliais metodais.

Pasirinktų augalų fitocheminės sudėties analizei atlikti bei pagrindiniams jų junginiams identifikuoti naudojami šiuolaikiški chromatografijos ir masių spektrometrijos metodai: fenoliniai junginiai *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktuose nustatyti taikant ultraefektyviąją skysčių chromatografiją su kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (UESCh-Q/TOF). Taikant ultraefektyviąją skysčių chromatografiją su trijų

kvadrupolių masių spektrometru (UESCh-TQ-S) nustatyta fenolinių junginių kiekybinė sudėtis.

Koreliacijos koeficientai nustatyti ir kiti papildomi skaičiavimai atlikti *MS Excel* programa.

1. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

1.1. Įvairių šalavijo rūšių augalų ekstrakcija

Šalavijo ekstraktai išskirti žaliavą nuosekliai ekstrahuojant didėjančio poliškumo ir aplinkai draugiškais tirpikliais: ekstrahavimas atliktas SKE-CO₂, tada 96 % etanolio ir galiausiai vandeniu. Nustatyta, kad visų tirtų augalo rūšių ekstraktų išeiga atitinkamai priklauso nuo ekstrakcijai atlikti pasirinkto tirpiklio. Didžiausios išeigos buvo gautos ekstrahuojant vandeniu – vidutiniškai 31,0 – 43,7 proc. (1 lentelė). Etanolinių ekstraktų išeigos buvo mažesnės, atitinkamai 25,5 – 36,2 proc. Ekstrahavimas SKE-CO₂ atliktas siekiant pašalinti lipofilinius junginius. SKE-CO₂ gautų ekstraktų išeigos nevertintos. Ekstraktai, gauti naudojant etanolio ir vandens tirpiklius, atitinkamai žymimi prie šalavijo rūšies pirmųjų raidžių pridėdant naudoto tirpiklio pirmą raidę: *S. amplexicaulis* Lam. (SAM-E, W), *S. austriaca* L. (SAu-E, W), *S. forsskaolii* L. (SF-E, W), *S. glutinosa* L. (SG-E, W), *S. nemorosa* L. (SN-E, W), *S. officinalis* L. (SO-E, W).

1.2. Įvairių šalavijo rūšių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas skirtingose *in vitro* modelinėse sistemose

Tirtų augalų antioksidacinio aktyvumui įvertinimui taikyti įvairūs antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodai (Allahghadri ir kiti, 2010). Antioksidacinis aktyvumas išreikštas tiek sauso ekstrakto masei, tiek sausos žaliavos medžiagos masei. Šie parametrai suteikia daug vertingos informacijos interpretuojant gautus duomenis. Vieni ekstraktai gali pasižymėti stipriomis antioksidacinio aktyvumo (AA) savybėmis, o jų išgaunamas kiekis gali būti nedidelis. Gali būti ir priešingai – kai ekstrakto aktyvumas yra mažas, o ekstrakto išeiga – didelė. AA matavimų rezultatai pateikti 1 lentelėje.

Šalavijo ekstraktų antioksidacinė galia priklauso nuo jų fitocheminės sudėties – struktūros ir kiekio, ypač polifenolinių junginių, iš kurių svarbiausi fenolinės rūgštys ir flavonoidai (Gryszczynska ir kiti, 2015). Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) tiriamuosiuose ekstraktuose svyravo plačiu intervalu – nuo 1,72 iki 43,65 mg GRE/g SM. Didesniu BFJK pasižymėjo etanoliniai ekstraktai (21,35 – 43,65 mg GRE/g SM), palyginti su vandeniniais (1,72 – 7,17 mg GRE/g SM). Etanolio išskirti ekstraktai galėtų būti geri natūralių antioksidantų šaltiniai. AA pasiskirstymas ekstraktuose išliko panašus toliau tiriant skirtingas šalavijo rūšis ABTS^{•+} ir ORAC metodais. ABTS^{•+} modelinėje sistemoje etanolinių ekstraktų AA svyravo nuo 684 iki 1177 μmol TE/g ekstrakto ir atitinkamai nuo 201 iki 391 μmol TE/g SM. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo etanoliniai *S. austriaca* ir *S. amplexicaulis* ekstraktai, kurių vertės atitinkamai buvo 684 ir 1177 μmol TE/g ekstrakto. Matuojant ORAC vertes tarp ekstraktų, išgautų skirtingais tirpikliais, didesniu deguonies radikalų sujungimo aktyvumu pasižymėjo etanoliniai šalavijo ekstraktai (iki 4735 μmol TE/g ekstrakto ir atitinkamai 1370 μmol TE/g SM), palyginti su vandeniniais (iki 1339 μmol TE/g ekstrakto ir atitinkamai 485 μmol TE/g SM). Įvertinus gautus rezultatus

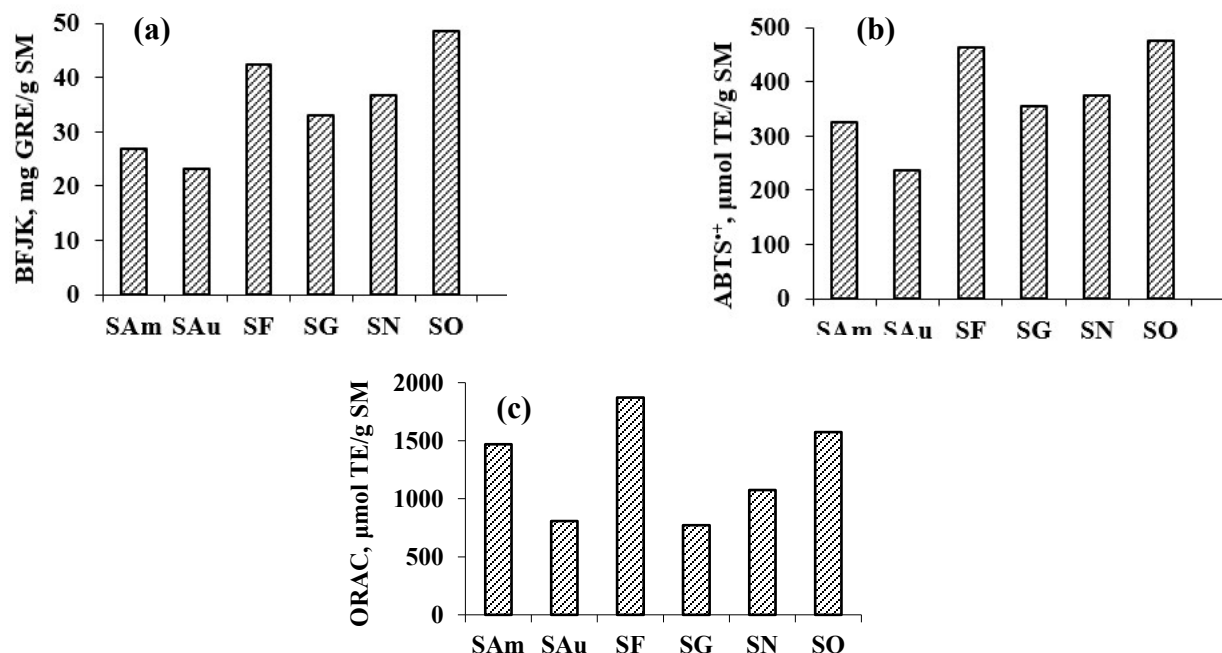
matyti, kad tirti ekstraktai gali sujungti laisvuosius radikalus, tačiau jų antioksidacinis aktyvumas labai priklauso nuo juose esančių aktyvių junginių kiekio. Poliškesniais tirpikliais išgautų ekstraktų radikalų sujungimo geba (RSG) buvo didesnė. Manoma, kad didesne RSG pasižymi fenoliniai junginiai, turintys laisvų prie benzeno žiedo prisijungusių hidroksilo grupių (Farhat ir kiti 2013). Todėl galime teigti, kad tokių junginių RSG yra didesnė.

1 lentelė. BFJK ir antioksidacinis aktyvumas skirtinguose *Salvia genties* augalų rūšių ekstraktuose

		ABTS ^{•+} , μmol TE/g		ORAC, μmol TE/g		BFJK, mg GRE/g	
		Sauso ekstrakto	Sausos medžiagos	Sauso ekstrakto	Sausos medžiagos	Sauso ekstrakto	Sausos medžiagos
SAm-E	25,5	1177	300	4735	1208	97,41	24,85
SAm-W	32,4	79,52	25,77	676	219	5,92	1,92
SAu-E	29,4	684	201	2009	591	72,57	21,35
SAu-W	40,7	85,04	34,62	482	196	4,23	1,72
SF-E	30,4	1135	345	4508	1370	116	35,19
SF-W	36,2	328	119	1339	485	19,80	7,17
SG-E	26,1	1072	279	1758	457	106	27,72
SG-W	31,0	246	76,26	897	278	16,86	5,23
SN-E	30,7	1005	308	2392	733	109	33,33
SN-W	43,7	150	65,57	718	313	7,60	3,32
SO-E	36,2	1080	391	2535	917	121	43,65
SO-W	37,7	225	84,98	1143	431	13,15	4,96

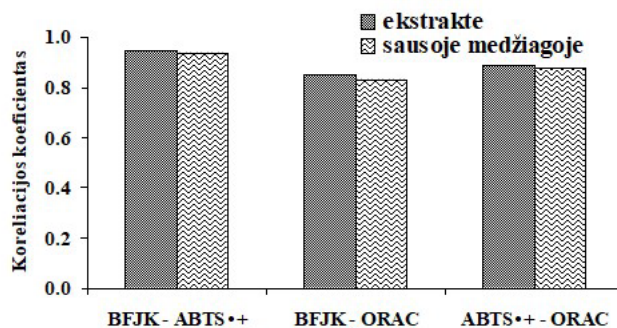
1.3. Bendras antioksidacinis aktyvumas ir gautų rezultatų koreliacija

Bendras visų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas yra pateiktas 1 pav. Šios reikšmės buvo gautos sudėjus visų ekstraktų (gautų skirtingais tirpikliais) AA, nustatytą atitinkamu metodu. Akivaizdu, kad didžiausiu BFJK kiekiu pasižymėjo *S. forsskaolii* (42,36 mg GRE/g SM) ir *S. officinalis* (48,61 mg GRE/g SM) (2 pav., a). Kitų šalavijo rūšių BFJK svyravo nuo 23,07 iki 36,65 mg GRE/g SM. *S. forsskaolii* ir *S. officinalis* taip pat pasižymėjo didžiausia bendra RSG matuojant ABTS^{•+} metodu (2 pav., b). Jų vertės atitinkamai buvo 464 ir 476 μmol TE/g SM. RSG, matuojant ORAC metodu, svyravo nuo 773 iki 1872 μmol TE/g SM (2 pav., c). Didžiausia deguonies radikalų sujungimo geba pasižymėjo *S. forsskaolii* (1872 μmol TE/g SM), *S. officinalis* (1573 μmol TE/g SM) ir *S. amplexicaulis* (1470 μmol TE/g SM) šalavijo rūšys. Visi šie gauti rezultatai puikiai parodo, kokios skirtingos yra įvairių šalavijo rūšių antioksidacinės savybės, kurios labiausiai priklauso nuo specifinių junginių ir nuo jų kiekio tiriamojoje mėginio matricioje.



1 pav. Bendras skirtingų šalavijo rūšių antioksidacinis aktyvumas, išreikštas kaip: BFJK suma (a); ABTS^{•+} radikalų sujungimo gebos suma (b); deguonies radikalo sujungimo gebos ORAC suma (c)

Eksperimento metu buvo taikomos trys pagrindinės AA nustatymo metodikos (ABTS^{•+}, ORAC, BFJK) ir naudojami trys skirtingo poliškumo tirpikliai (SKE-CO₂, 96 % C₂H₅OH, H₂O). Gautas didelis kiekis duomenų, todėl, norint maksimaliai išnaudoti AA tyrimų rezultatus, skirtingomis metodikomis gauti duomenys buvo palyginti tarpusavyje ir nustatyti jų koreliacijos koeficientai (2 pav.).

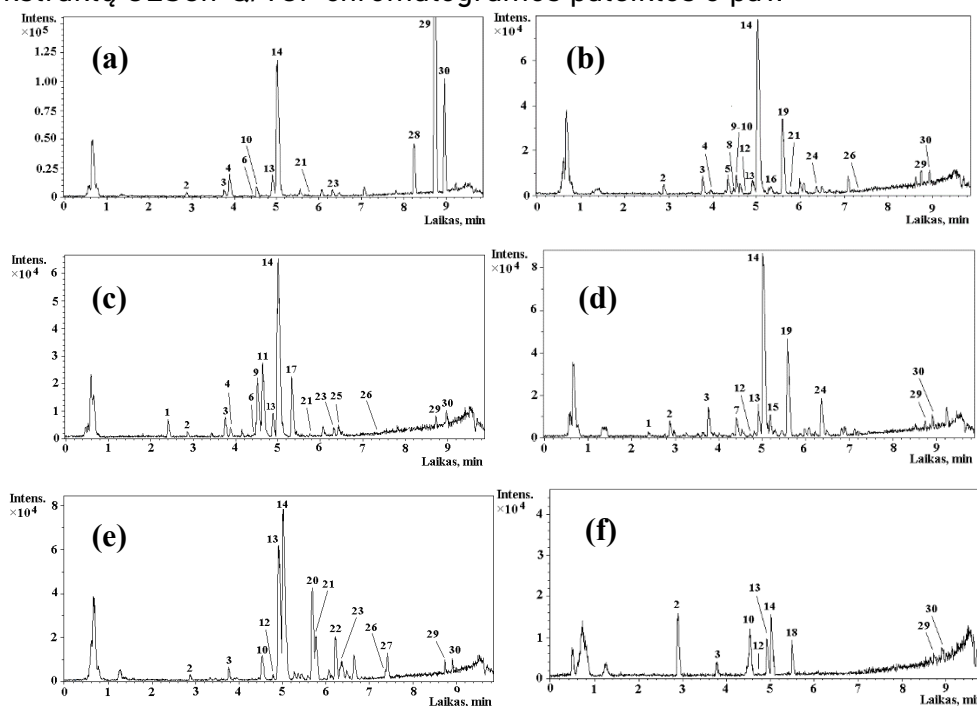


2 pav. Koreliacijos koeficientai tarp skirtingų antioksidacinio aktyvumo matavimo metodų

Pastebėtas stiprus koreliacinis ryšys tarp BFJK ir ekstraktų AA verčių: BFJK ir ABTS^{•+}, R²=0,942; BFJK ir ORAC, R²=0,847 bei ABTS^{•+} ir ORAC, R²=0,884. Galima teigti, kad BFJK gerai apibūdina skirtingų šalavijo rūšių ekstraktų *in vitro* antioksidacinį aktyvumą.

1.4. Fenolinių junginių kokybinis įvertinimas skirtinguose *Salvia* genties augalų rūšyse UESCh-Q/TOF metodu

Šalavijo ekstraktai buvo tirti efektyviosios skysčių chromatografijos sistemomis, naudojant UV ir MS detektorius. Tirtuose šalavijo ekstraktuose esantys fenoliniai junginiai buvo nustatyti UESCh-MS metodu, palyginus gautų junginių molekulinės masės, jų formules bei sulaikymo laikus su standartinių junginių spektriniais duomenimis. Jei junginių nepavyko identifikuoti pagal tyrimo metu naudotus standartus, papildomai buvo atliktas MS/MS fragmentavimas. Šie junginiai buvo identifikuoti preliminariai, lyginant gautus MS/MS fragmentus su literatūroje aprašytomis spektrinėmis charakteristikomis (2 lent.). Šalavijo ekstraktų UESCh-Q/TOF chromatogramos pateiktos 3 pav.



3 pav. Šalavijo ekstraktų chromatogramos, gautos UESCh-Q/TOF: (a) SO-E; (b) SAM-E; (c) SG-E; (d) SN-E; (e); SAu-E; (f) SF-W

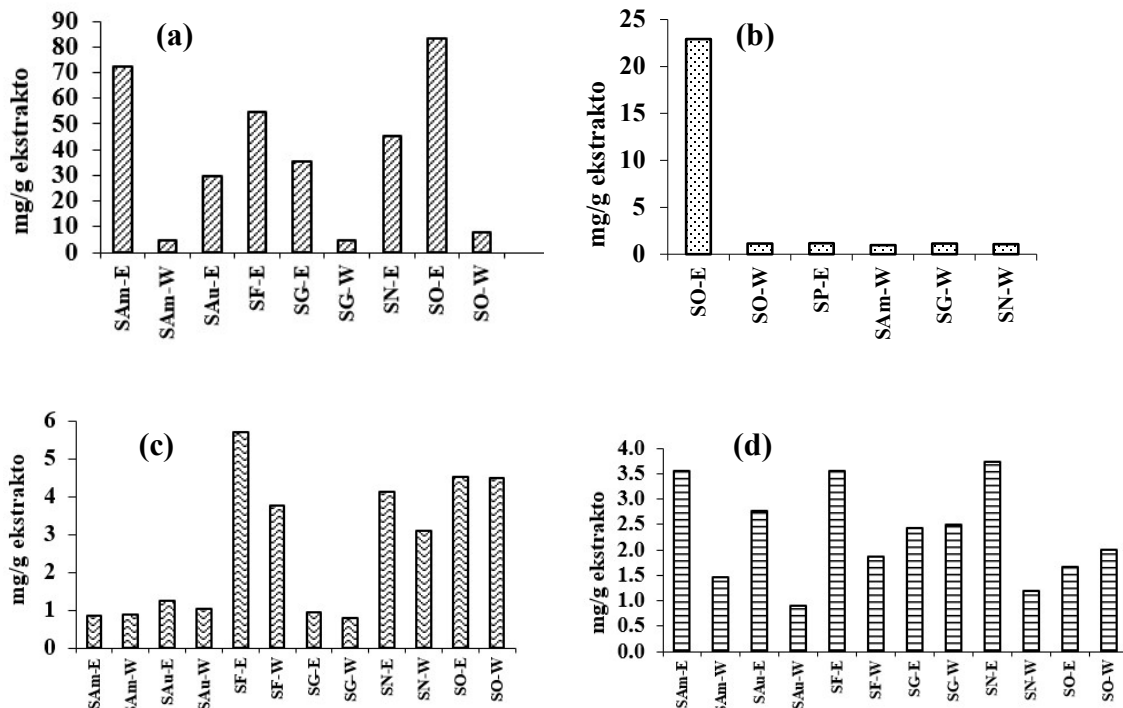
2 lentelė. *Salvia* genties augaluose atskirti junginiai UESCh-Q/TOF metodu

Nr.	Junginys	Molekulinė formulė	MS fragmentai
1.	Nežinomas junginys	$C_9H_{18}O_8$	133, 135, 161, 181
2.	Hidroksifenilpropiono rūgštis ^b	$C_9H_{10}O_5$	109, 123, 135, 151, 179
3.	Kavos rūgštis ^a	$C_9H_8O_4$	nd
4.	Nežinomas junginys	$C_{18}H_{28}O_9$	135, 163, 179, 207, 311
5.	Rutinas ^a	$C_{27}H_{30}O_{16}$	301
6.	Etilgalatas ^a	$C_9H_{10}O_5$	124, 125, 167
7.	Kaempferol- <i>O</i> -rutinozidas ^b	$C_{27}H_{30}O_{15}$	285

8.	Hiperozidas ^a	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	301
9.	Nežinomas junginys	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	285
10.	Luteolin-7-O-β-D-gliukuronidas ^a	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	285
11.	Isoramnetin-gliukozidas ^b	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	299, 300, 315
12.	Kvercetin3-gliukuronidas ^a	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	161, 301, 315, 359
13.	Apigenin-7-O-β-D-gliukuronidas ^a	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	269
14.	Rozmarinų rūgštis ^a	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	161, 179, 197
15.	Nežinomas junginys	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₃	133, 135, 161, 179, 295, 359
16.	Hidroksibenzoinė rūgštis ^b	C ₇ H ₆ O ₃	93, 108
17.	Nežinomas junginys	C ₁₈ H ₂₆ O ₉	137, 179
18.	Salvianolinė rūgštis A ^b	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	135, 185, 295, 313, 461
19.	Metilrozmarinatas ^b	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	135, 175, 179, 197
20.	Luteolinas ^a	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	133, 151, 197, 213
21.	3',4',5,7-Tetrahidroksi-3-metoksiflavonas ^a	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	297
22.	Apigeninas ^a	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	117, 151
23.	Diosmetinas ^a	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	285
24.	Nežinomas junginys	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₂	133, 135, 161, 359
25.	5, 7, 2'-Trihidroksi-5',6'-dimetoksiizoflavonas ^b	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	135, 165, 180, 195, 316
26.	Ramnetinas ^a	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	83, 145, 187
27.	Genkvaninas ^b	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	151, 211, 239, 268
28.	Karnozolis ^a	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	285
29.	Karnozo rūgštis ^a	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	244, 287
30.	Metilkarnozatas ^b	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	283, 286, 301
^a Identifikuota naudojant standartą.			
^b Identifikuota naudojantis literatūros duomenimis bei ChemSpider duomenų baze.			

1.5. Identifikuotų fenolinių junginių kiekybinis įvertinimas skirtinguose šalavijo augalų rūšyse UESCh-TQ-S metodu

Taikant ultraefektyviąją skysčių chromatografiją su trijų kvadrupolių masių spektrometru (UESCh-TQ-S) kiekybiškai įvertinti 4 junginiai skirtinguose šalavijo ekstraktuose pagal jų etaloninius standartus. Nustatyta, kad rozmarinų, karnozo ir kavos rūgštys bei apigenin-7-O-β-D-gliukuronidas yra dominuojantys įvairių šalavijo rūšių junginiai (4 pav.).



4 pav. Pagrindinių junginių kiekiai įvairiose *Salvia genties* augalų rūšyse (mg/g ekstrakto): (a) rozmarinų rūgštis; (b) karnozinės rūgštis; (c) apigenin-7-O-β-D-gliukuronido; (d) kavos rūgštis

Dominuojantis junginys visuose šalavijo ekstraktuose buvo rozmarinų rūgštis. Rozmarinų rūgštis kiekis ekstraktuose svyravo nuo 4,50 iki 82,99 mg/g ekstrakto. Didžiausias kiekis rozmarinų rūgštis nustatytas *S. officinalis*, *S. amplexicaulis*, *S. forsskaolii* ir *S. nemorosa* šalavijo rūšių ekstraktuose. Karnozinė rūgštis skirtinguose šalavijo rūšių ekstraktuose svyravo nuo 0,97 iki 22,93 mg/g ekstrakto. Didžiausias kiekis karnozinės rūgštis rastas etanoliniame ir vandeniniame *S. officinalis* ekstrakto (82,99 mg/g ekstrakto). Apigenin-7-O-β-D-gliukuronido koncentracija skirtingose šalavijo rūšių ekstraktuose taip pat didelė. Jo kiekis šalavijo ekstraktuose svyravo nuo 0,80 iki 5,71 mg/g ekstrakto. Didžiausiu jo kiekiu pasižymėjo etanolinis *S. forsskaolii* (5,71 mg/g ekstrakto) ekstraktas, etanolinis bei vandeninis *S. officinalis* ekstraktas. Lyginant šių junginių kiekybinę analizę su literatūroje pateikta, rezultatai skyrėsi. Tokius kiekybinius skirtumus gali nulemti skirtingi fenolinių junginių išgavimo būdai, ekstrakcijos sąlygos, taip pat įtakos gali turėti ir augalo auginimo vieta. Kavos rūgštis koncentracija įvairiose šalavijo rūšyse buvo nustatyta taip pat didelė: nuo 0,91 iki 3,72 mg/g ekstrakto. Didžiausias kavos rūgštis kiekis nustatytas etanoliniuose *S. nemorosa*, *S. forsskaolii*, *S. amplexicaulis*, *S. austriaca* šalavijo rūšių ekstraktuose.

Iš gautų rezultatų galima daryti išvadą, kad šalavijo ekstraktai gali būti puikus antioksidantų šaltinis (Yanishlieva ir kiti, 2001).

2. Teorinis šalavijo panaudojimo galimybių kuriant funkcionaliuosius sveikatai naudingus ingredientus įvertinimas

Aromatiniai augalai ir prieskoninės žolės kaupia įvairias fitochemines medžiagas, kurios yra svarbus funkcinį ingredientų šaltinis (Lopresti, 2017). Biologiškai veiklių sudedamųjų dalių pridėjimas į maistą yra vienas pagrindinių būdų plėtoti funkcinį maisto produktą. Maisto produktas praturtinamas ir, patekęs į organizmą, atlieka sveikatai palankius fiziologinius pokyčius (Bettaieb ir kiti, 2010). Remiantis Peterseno and Simmondso, 2003 išleista publikacija, galima teigti, kad rozmarino rūgšties antioksidacinės savybės yra labai stiprios ir gali padėti pašalinti laisvųjų radikalų perteklių žmogaus kūne, kavos rūgšties vaidmuo širdies ir kraujagyslių sistemos ir tam tikrų vėžio formų prevencijos srityje taip pat yra išsamiai aprašytas (Chang ir kiti, 2010), apigenin-7-gliukoronidas taip pat pasižymi stipriais farmakologiniais poveikiais, tarp jų ir antioksidaciniu (Viuda-Martos ir kiti, 2011).

Apibendrinant galima teigti, kad įvairūs šalavijo ekstraktai sukaupia vertingų biologiškai veiklių medžiagų, kurios turi teigiamą poveikį sveikatai (Wu ir kiti, 2012). Galima prognozuoti, kad šios šalavijo rūšys gali būti auginamos ir taikomos funkcionaliojo maisto ar maisto papildų gamyboje.

Išvados

1. Iš 6 *Salvia genties* augalų rūšių išskirta po dvi frakcijas (kiekvienos rūšies), atliekant pakopinę aukšto slėgio ekstrakciją su superkritiniu CO₂, 96 % etanolio ir vandeniu. Vandeninių ekstraktų išeigos (31,0–43,7 proc.) buvo didesnės, palyginti su išeigomis ekstraktų, gautomis naudojant 96 % etanolį (25,5–36,2 proc.). Ekstrahavimas SKE-CO₂ atliktas siekiant pašalinti lipofilinius junginius. SKE-CO₂ gautų ekstraktų išeigos nevertintos.
2. 6 *Salvia genties* augalų rūšių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo įvertintas naudojant BFJK, ABTS^{•+} ir ORAC tyrimo metodus. Etanoliniai *Salvia genties* augalų rūšių ekstraktai pasižymėjo daug didesniu antioksidaciniu aktyvumu ir bendruoju fenolių junginių kiekiu nei ekstraktai, išskirti naudojant vandenį. Stipri koreliacija ($r^2=0,812-0,942$) nustatyta tarp BFJK ir in vitro antioksidacinio aktyvumo vertinimo metodų ABTS^{•+} ir ORAC.
3. Rozmarinų, karnozo ir kavos rūgštys bei apigenin-7-O-β-D-gliukuronidas yra dominuojantys junginiai tirtuose *Salvia genties* augalų rūšių ekstraktuose, kurie gali puikus natūralių antioksidantų šaltinis.
4. Rozmarinų rūgštis nustatyta kaip dominuojantis junginys (iki 82,99 mg/g ekstrakto) įvairiuose *Salvia genties* augalų rūšių ekstraktuose, ypač etanoliniuose. Apigenin-7-O-β-D-gliukuronido (iki 5,71 mg/g ekstrakto), kavos (3,72 mg/g ekstrakto) ir karnozo (iki 22,93 mg/g ekstrakto) rūgščių taip pat nustatyti dideli kiekiai daugumoje *Salvia genties* augalų rūšių. Naudojant etaloninius junginius, *Salvia genties* augalų rūšių ekstraktuose iš viso identifikuota 15 junginių, 4 iš jų buvo įvertinti kiekybiškai. Papildomai kai kurie junginiai buvo identifikuoti preliminariai pagal gautus MS fragmentus ir palyginus juos su literatūroje aprašytais spektrinėmis charakteristikomis.

5. Apibendrinant tyrimo rezultatus nustatyta, kad etanoliniai *S. officinalis*, *S. amplexicaulis*, *S. nemorosa* ir *S. forsskaolii* ekstraktai sukaupia nemažai vertingų biologiškai veiklių medžiagų. Remiantis teorinėmis žiniomis apie teigiamą biologiškai veiklių medžiagų poveikį sveikatai, galima prognozuoti, kad šios šalavijo rūšys gali būti auginamos ir pritaikytos gaminant funkcionalųjį maistą ar maisto papildus.

Literatūra

1. Abdille, M.H., Singh, R.P., Jayaprakasha, G.K., Jena, B.S. (2005). Antioxidant Activity of the Extracts from *Dillenia Indica* Fruits. *Food Chemistry*. 2005, 90(4), 891–896.
2. Allahghadri, T., Rasooli, I., Owlia, P., Nadooshan, M.J., Ghazanfari, T., Taghizadeh, M. ir Astaneh, S.D.A. (2010). Antimicrobial Property, Antioxidant Capacity, and Cytotoxicity of Essential Oil from Cumin Produced in Iran. *Journal of Food Science*. 75(2), H54–H61.
3. Bettaieb, I., Bourgou, S., Wannes, W.A., Hamrouni, I., Limam, F., Limam, B. (2010). Essential Oils, Phenolics, and Antioxidant Activities of Different Parts of Cumin (*Cuminum Cyminum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(19), 10410–10418.
4. Chang, W.C., Hsieh, C.H., Hsiao, M.W., Lin, W.C., Hung, Y.C., Ye, J.C. 2010. Caffeic Acid Induces Apoptosis in Human Cervical Cancer Cells through the Mitochondrial Pathway. *The Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 49(4), 19–424.
5. Farhat, M., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. A. ir Jordán, M. J. (2013). Phytochemical Composition and in Vitro Antioxidant Activity of By-Products of *Salvia Verbenaca* L. Growing Wild in Different Habitats. *Industrial Crops and Products*. 2013, 49, 373–379.
6. Gryszczynska, A., Opala, B., Lowicki, Z., Dreger, M., Gorska-Paukszta, M., Szulc, M., Kaminska, E., Litwin, E., Struzik, P., Dyr, W., Wyszogrodzka, E., Mikolajczak, P.L. (2015). Bioactive Compounds Determination in the Callus and Hydroalcoholic Extracts from *Salvia Miltiorrhiza* and *Salvia Przewalskii* – Preliminary Study on Their Anti-Alcoholic Activity Effects. *Phytochemistry Letters*. 11, 399–403.
7. Lopresti, A.L. (2017). *Salvia* (Sage): a Review of Its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. *Drugs in R&D*. 17(1), 53–64.
8. Maestri, D.M., Nepote, V., Lamarque, A.L. ir Zygadlo, J.A. (2006). Natural Products as Antioxidants. *Phytochemistry: Advances in Research*. 105–135.
9. Mikalauskas, G. (2006). Screening, Isolation and Evaluation of Antioxidative Compounds from *Geranium Macrorrhizum*, *Potentilla Fruticosa* and *Rhaponticum Carthamoides*. Holland, Wageningen. Thesis Wageningen University, pp. 1–155.
10. Petersen, M. ir Simmonds, M.S.J. (2003) Rosmarinic Acid. *Phytochemistry*. 62(2), 121–125.
11. Schmit, B., Ribnický, D.M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W.T. ir Raskin, I.A (2008). Natural History of Botanical Therapeutics. *Metabolism*. 57(1), S3–S9.
12. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J.A. (2011). Spices as Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(1), 13–28.

13. Wu, Y.B., Ni, Z.Y., Shi, Q.W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.C., Cong, B. (2012). Constituents from *Salvia* Species and Their Biological Activities. *Chemical Reviews*. 112(11), 5967–6026.
14. Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M. (2001). Stabilisation of Edible Oils with Natural Antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 103(11), 752–767.
15. Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomás-Barberán, F.A., Datta, N., Singanusong R., Chen S.S. (2004). Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*. 59(3), 113–122.

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF EXTRACTS OF THE GENUS *SALVIA*, PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND THEIR APPLICATION POSSIBILITIES

dr. Vaida Makaravičienė

Summary

Botanicals are among the most important sources of natural antioxidants and other valuable phytochemicals which may find applications as novel food additives or bioactive ingredients for functional foods and nutraceuticals. In addition, more than 30 % of the pharmaceutical drugs prescribed worldwide are derived from the plant sources (Schmidt ir kiti, 2008). Moreover, 'naturalness' has become one of the most important factors for the consumer's preferences in choosing various products for human consumption. Therefore, the interest in a more systematic and comprehensive characterisation of less studied plant species has been systematically increasing. Such studies are necessary for developing new natural preparations which might impart double benefits to foods, i.e. by not only enhancing their health benefits but also by providing antioxidant and antimicrobial protection; in the latter case, they may be considered as promising alternatives for such currently widely used synthetic food additives as butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), benzoates and others which are prominently becoming more and more refused by the consumers due to safety concerns.

Lamiaceae family herbs are among the most popular aromatic, medicinal and spicy plants, many of which have been extensively studied and reported to accumulate high amounts of essential oils, strong phenolic antioxidants and other valuable constituents. Some species of 'sage' (the common name used for many genus *Salvia* plants) have also been widely used in cosmetics, perfumery, soft drinks and various foods. *S. officinalis* are the most thoroughly studied *Salvia* species, whereas the information about many other *Salvia* species is rather scarce. To fill this gap, 6 different *Salvia* spp. plants, namely *S. amplexicaulis*, *S. austriaca*, *S. forsskaolii*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, *S. officinalis* have been selected. *S. officinalis* is used in our study mainly for comparison purposes.

The aim of this work was to investigate phytochemical composition of volatile and polyphenolic compounds and antioxidant potential of various plant species of the genus *Salvia* using different extraction methods and different polarity solvents for their processing and to assess theoretically the potential of their wider application in the preparation of functional ingredients with health benefits.

The following objectives were outlined in order to achieve this aim:

1. To evaluate the applicability and effectiveness of various extraction methods and solvents for the separation of different polarity soluble fractions from 6 *Salvia* spp. plants and to assess their yields.

2. To evaluate the antioxidant potential of soluble fractions isolated from 6 *Salvia* spp. plants by various methods using radical scavenging and other antioxidant capacity measurement assays.
3. To determine the content of total phenolics in soluble fractions isolated from 6 *Salvia* spp. plants.
4. To determine the content of total phenolics in soluble fractions isolated from 6 *Salvia* spp. plants by employing various methods and to evaluate their composition by using the chromatographic and mass spectrometric methods.
5. On the basis of the obtained experimental results, to theoretically evaluate the prospects of application of *Salvia* extracts in the preparation of functional ingredients with health benefits.

It was established that ethanolic extracts of *S. officinalis*, *S. amplexicaulis*, *S. nemorosa*, *S. forsskaolii* and *S. pratensis* are rich in bioactive compounds; these results are practically important for further valorisation of the use of plant extracts as a source of natural antioxidants in the food industry as they may serve for food enrichment with bioactive compounds. The chromatographic data of *S. amplexicaulis*, *S. austriaca*, *S. forsskaolii*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa* and *S. officinalis* extracts obtained by using different extraction methods provide important information on the variations in their phytochemical composition. This information is useful for the industry in terms of the selection of the proper *Salvia* spp. and extraction solvent thus ensuring the highest recovery of bioactive compounds.

Keywords: *Salvia* spp., antioxidant activity, phytochemical composition, functional food