ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

Π.Μ.Σ: «Κοσμητολογία-Παρασκευή και Αξιολόγηση Καλλυντικών Προϊόντων»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Φυτοχημικός χαρακτηρισμός του φυτού *Salvia verticillata* L. και μελέτη της λευκαντικής δράσης των εκχυλισμάτων του»

Λαμπρινή Σταυροπούλου

Χημικός

ΠΑΤΡΑ, 2024

MSc Program: Cosmetology-Formulation and evaluation of cosmetic products

MASTER THESIS

«Phytochemical characterization and study of the whitening activity of *Salvia verticillata* L. extracts»

Lamprini Stavropoulou

Chemist

PATRAS, 2024

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ

ΠΜΣ: «Κοσμητολογία-Παρασκευή και Αξιολόγηση Καλλυντικών Προϊόντων»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Φυτοχημικός χαρακτηρισμός του φυτού *Salvia verticillata* L. και μελέτη της λευκαντικής δράσης των εκχυλισμάτων του»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΦΩΤΕΙΝΗ ΛΑΜΑΡΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

ΣΟΦΙΑ ΧΑΤΖΗΑΝΤΩΝΙΟΥ

ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ

ΜΕΛΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΦΟΥΣΤΕΡΗΣ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ

ΜΕΛΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

«Την άνοιξη αν δεν την βρεις,
τη φτιάχνεις!»

Οδυσσέας Ελύτης

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών και εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Κοσμητολογία - Παρασκευή και Αξιολόγηση καλλυντικών προϊόντων». Μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών.

Ολοκληρώνοντας τις μεταπτυχιακές μου σπουδές, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τα άτομα που συνέβαλαν, ο καθένας με τον δικό του τρόπο, στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Πρώτη από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα Φωτεινή Λάμαρη, η οποία από την πρώτη μας επικοινωνία αφουγκράστηκε τον ενθουσιασμό μου για το αντικείμενο της φαρμακογνωσίας και μου επέτρεψε να εξελιχθώ ερευνητικά αλλά και προσωπικά ως μέλος του εργαστηρίου της. Την ευχαριστώ για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη της σε αυτό το ταξίδι της γνώσης, καθώς και την παρότρυνση της να κυνηγήσω τα όνειρά μου, ακόμη και αν αυτά έφταναν μέχρι την Γαλλία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κα Σοφία Χατζηαντωνίου, την «καρδιά» του μεταπτυχιακού προγράμματος καθώς και τον κο Εμμανουήλ Φουστέρη, μέλη της τριμελούς επιτροπής για την συμβολή τους στην παρούσα εργασία. Ακόμη, ευχαριστώ τον κο Μιχαήλ Κορνάρο, Καθηγητή του Τμήματος Χημικών Μηχανικών και την Υποψήφια Διδάκτωρ κα Πολύτιμη Παπαβασιλείου για την βοήθεια τους κατά την διάρκεια των πειραμάτων που εκπονήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τμήματος Χημικών Μηχανικών.

Επιπλέον, ένα εγκάρδιο ευχαριστώ στις φίλες και συναδέλφους μου Αναστασία και Χρύσα, με τις οποίες διανύουμε κοινή ακαδημαϊκή πορεία από το προπτυχιακό κιόλας επίπεδο, για τις αστείες, τις δύσκολες, τις ευχάριστες και τις συγκινητικές στιγμές που μοιραστήκαμε κατά την διάρκεια αυτού του ταξιδιού.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την κα Κάρμεν Σιμάλ, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας για τις συμβουλές της, την καθοδήγηση της

και την καλή της διάθεση κατά την διάρκεια αυτής της χρονιάς, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ωραίο κλίμα και τις αναμνήσεις που μοιραστήκαμε.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως μεγάλο μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας παρουσιάστηκαν στο 19ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Φαρμακευτικής Χημείας στην Πάτρα τον Μάρτιο του 2023 καθώς και στο 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εθνοφαρμακολογίας στα Ιωάννινα τον Μάρτιο του 2024. Ακόμη, σε συνεργασία με το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, συγκεκριμένα με τον Τομέα Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, εκπονήθηκαν πειράματα με σκοπό την μελέτη της γενοτοξικής και κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος των φύλλων της *Salvia verticillata* L. Τα αποτελέσματα αυτών, παρουσιάστηκαν στο 42ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ) στην Θεσσαλονίκη τον Μάιο του 2023 και δημοσιεύθηκαν στο περιοδικό Plants, στο ειδικό τεύχος «Εξελίξεις στην Χημική Ανάλυση των Φυτών».

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους για την στήριξη τους καθ' όλη την διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών σπουδών μου, καθώς και την αδελφή μου Άννα, για την υπομονή και την αγάπη της. Ένα ευχαριστώ ακόμη στους παππούδες μου στην Τήνο, για την παροχή του φυτικού υλικού του είδους *Salvia fruticosa*.

Περίληψη

Το είδος *Salvia verticillata* L. συνιστά ένα σπάνιο είδος του γένους *Salvia*, με περιορισμένες διαθέσιμες μελέτες γύρω από τη φυτοχημική του σύσταση και τις βιολογικές του ιδιότητες. Αποτελεί πηγή πολυφαινολών και λιπαρών οξέων, γεγονός που το καθιστά πολύτιμη πηγή βιοδραστικών ενώσεων για διάφορες βιομηχανίες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αξιολογήθηκαν τα φύλλα και τα άνθη ενός πληθυσμού του είδους από τα Καλάβρυτα, Αχαΐας με σκοπό την πιθανή τους αξιοποίηση από την βιομηχανία των καλλυντικών. Πιο συγκεκριμένα, το υδρομεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων αναλύθηκε με UPLC-DAD-ESI-MS, ενώ των ανθών με LC-MS, οδηγώντας στην ταυτοποίηση 28 και 34 ενώσεων αντίστοιχα, 9 εξ 'αυτών ποσοτικοποιήθηκαν με HPLC-DAD στο κάθε μέρος του φυτού. Η σύσταση τους ήταν παραπλήσια, κυρίως φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Ακόμη, τα δύο μέρη αξιολογήθηκαν ως προς το περιεχόμενο και την ποσότητα τους σε λιπαρά οξέα με την τεχνική GC-FID, εμφανίζοντας επίσης παρόμοια σύσταση. Η μόνη διαφορά ήταν το λαυρικό οξύ και το τριδεκυλικό οξύ που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα φύλλα και στα άνθη, αντίστοιχα.

Η *in vitro* αντιοξειδωτική τους δράση αξιολογήθηκε μέσω των μεθόδων FRAP, DPPH και FOLIN, καθώς και η λευκαντική δράση του εκχυλίσματος των φύλλων, μέσω της αναστολής του ενζύμου της τυροσινάσης. Η αντιοξειδωτική δράση των φύλλων και των ανθών ήταν παρεμφερής. Η διερεύνηση της επίδρασης του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος των φύλλων στο ένζυμο της τυροσινάσης ανέδειξε την λευκαντική δράση του φυτού, αφού πρώτα επιβεβαιώθηκε πως δεν δρα ως εναλλακτικό υπόστρωμα του ενζύμου. Λόγω των βιολογικών δράσεων που εμφάνισαν τα εκχυλίσματα, χρησιμοποιήθηκαν στήλες στερεάς φάσης (SPE) με σκοπό την κλασμάτωση, παραλαβή και μελέτη μεμονωμένα κάποιων ενώσεων, ωστόσο στην συγκεκριμένη εργασία έλαβε χώρα μόνο το κομμάτι της κλασμάτωσης.

Τέλος, για συγκριτικούς λόγους, αναλύθηκαν παράλληλα φύλλα ενός πληθυσμού του είδους *Salvia fruticosa* Mill. από την Τήνο, στις Κυκλάδες, το οποίο βρέθηκε να έχει χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τα εκχυλίσματα της *S. verticillata* και διαφορετική σύσταση τόσο ως προς τα πολικά μόρια όσο και προς τα λιπαρά οξέα.

Abstract

Salvia verticillata L. constitutes a rare species of the genus *Salvia*, with limited available studies on its phytochemical composition and biological properties. It is a source of polyphenols and fatty acids, making it a valuable source of bioactive compounds for various industries.

In this master's thesis, the leaves and flowers of a population deriving from Kalavryta, Achaia, were evaluated for potential valorization by the cosmetic industry. Specifically, the hydromethanolic extract of the leaves was analyzed with UPLC-DAD-ESI-MS, while the flower extract was analyzed with LC-MS, leading to the identification of 28 and 34 compounds respectively; 9 of which were quantified with HPLC-DAD in each part of the plant. Their phytochemical composition was similar, mainly phenolic acids and flavonoids. Furthermore, both parts were evaluated for their fatty acid composition using the GC-FID technique, revealing similar results. The only difference was lauric acid and tridecylic acid, which were identified only in the leaves and flowers, respectively.

Their antioxidant activity was evaluated *in vitro* using the FRAP, DPPH, and FOLIN colorimetric methods, as well as the whitening activity of the leaf extract, through the inhibition of the tyrosinase enzyme. The antioxidant activity of the leaves and flowers was similar. The investigation of tyrosinase enzyme inhibition by the hydromethanolic extract of the leaves highlighted the plant's whitening potential, after excluding the possibility of the extract acting as an alternative substrate for the enzyme. Due to the biological activities demonstrated by the extracts, solid-phase extraction (SPE) columns were used for fractionation, isolation, and study of individual compounds; however, this study only included the fractionation process.

Finally, for comparison purposes, the leaves of a population of the species *Salvia fruticosa* Mill. from Tinos, Cyclades, were analyzed in parallel. Those had lower antioxidant activity compared to the extracts of *S. verticillata* and a different composition in terms of both polar secondary metabolites and fatty acids.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες....4
Περίληψη....6
Abstract....7
1. Εισαγωγή....11
1.1 Φασκόμηλο....*11*
1.1.1 Κατανομή του γένους *Salvia* στην Ευρώπη και στην Ελλάδα....12
1.1.2 Το είδος *Salvia verticillata* L.....13
1.1.3 Το είδος *Salvia fruticosa* Mill.....14
1.2 Το είδος Salvia verticillata ως πηγή βιοδραστικών ενώσεων....*15*
1.2.1 Πηγή πολυφαινολών....15
1.2.2 Πηγή λιπαρών οξέων....16
1.3 Βιολογικές δράσεις φασκόμηλου....*18*
1.3.1 Αντιοξειδωτική δράση....18
1.3.2 Αντιφλεγμονώδης και αναλγητική δράση....20
1.3.3 Αντιμικροβιακή δράση....20
1.3.4 Αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης....21
1.3.5 Δράσεις σχετιζόμενες με την καλλυντική βιομηχανία....22
1.3.5.1 Αντιγηραντική δράση....22
1.3.5.2 Λευκαντική δράση....23
1.4 Τεχνικές εκχύλισης φυσικών προϊόντων....*25*
1.4.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση....26
1.4.1.1 Θερμοκρασία εκχύλισης....26
1.4.1.2 Σύσταση εκχυλιστικού μέσου....27
1.4.1.3 Χρόνος εκχύλισης....27
2. Σκοπός της εργασίας....28
3. Πειραματικό μέρος....30
3.1 Φυτικό υλικό....*30*
3.2 Εκχύλιση με UAE....*31*
3.2.1 Υπολογισμός της απόδοσης της εκχύλισης....32
3.3 Ποιοτική ανάλυση των πολικών συστατικών των εκχυλισμάτων της Salvia verticillata με την τεχνική LC-MS....*32*
3.3.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία....33
3.3.1.1 Τεχνική HPLC-ESI-MS....33
3.3.1.2 Τεχνική UPLC-DAD-ESI-MS....33

3.3.2 Ανάπτυξη μεθόδου ανάλυσης των συστατικών των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων με HPLC-ESI-MS 33
3.3.3 Ταυτοποίηση των ενώσεων με UPLC-DAD-ESI-MS 38
3.4 Χρωματογραφικός προσδιορισμός φαινολικών με την τεχνική HPLC-DAD 38
3.4.1. Αντιδραστήρια και οργανολογία 38
3.4.2 Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου 39
3.5. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων των φύλλων και των ανθών της Salvia verticillata με την τεχνική GC-FID 40
3.5.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία 40
3.5.2 Πειραματικό πρωτόκολλο 40
3.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu 42
3.6.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία 42
3.6.2 Πειραματικό πρωτόκολλο 43
3.7 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας 44
3.7.1 Μέθοδος FRAP 44
3.7.1.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία 44
3.7.1.2 Πειραματικό πρωτόκολλο μεθόδου FRAP 45
3.7.2 Μέθοδος DPPH 46
3.7.2.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία 46
3.7.2.2 Πειραματικό πρωτόκολλο μεθόδου DPPH 47
3.8 Διερεύνηση της λευκαντικής δράσης των πολικών εκχυλισμάτων των φύλλων της Salvia verticillata μέσω της αναστολής του ενζύμου της τυροσινάσης 49
3.8.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία 49
3.8.2 Πειραματικό πρωτόκολλο αναστολής του ενζύμου της τυροσινάσης 50
3.9 Προσπάθειες κλασμάτωσης των πολικών εκχυλισμάτων των φύλλων της Salvia verticillata 52
3.9.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία 54
3.9.2 Κλασμάτωση με στηλάκια Strata-X-AW Polymeric Weak Anion Exchange 54
3.9.3 Κλασμάτωση με στηλάκια Strata-X Polymeric Reversed Phase 56
4. Αποτελέσματα-Συζήτηση 58
4.1 Αποδόσεις εκχυλίσεων 58
4.1.1 Απόδοση εκχύλισης UAE των εκχυλισμάτων της *Salvia verticillata* 59
4.2 Ποιοτική σύσταση των πολικών συστατικών των εκχυλισμάτων 60
4.2.1 Ταυτοποίηση των συστατικών του εκχυλίσματος των φύλλων της *Salvia verticillata* με HPLC-ESI-MS και UPLC-DAD-ESI-MS 60
4.2.2 Ταυτοποίηση των συστατικών του εκχυλίσματος των ανθών της *Salvia verticillata* με LC-MS 65

4.2.3 Ταυτοποίηση των συστατικών του εκχυλίσματος των φύλλων της *Salvia fruticosa* με LC-MS και σύγκριση με την ποιοτική σύσταση των εκχυλισμάτων της *Salvia verticillata* 70

4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των πολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC-DAD *75*

4.3.1 Αποτελέσματα της επικύρωσης της αναλυτικής μεθόδου με HPLC-DAD..... 75

4.3.2 Ποσοτικοποίηση των κυρίων συστατικών των εκχυλισμάτων των φύλλων και των ανθών της *Salvia verticillata* 76

4.3.2 Ποσοτικοποίηση των συστατικών του εκχυλίσματος των φύλλων της *Salvia fruticosa* με HPLC-DAD και σύγκριση με τα εκχυλίσματα της *Salvia verticillata* 80

4.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των εκχυλισμάτων της Salvia verticillata και Salvia fruticosa και σύγκριση μεταξύ των δύο ειδών 83

4.5 Αντιοξειδωτική ικανότητα και φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων..... 87

4.5.1 Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων της *Salvia verticillata* και της *Salvia fruticosa* 87

4.6 Αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης από το εκχύλισμα των φύλλων της Salvia verticillata 90

4.6.1 Διερεύνηση των τελικών συνθηκών του πειραματικού πρωτοκόλλου 90

4.6.2 Έλεγχος της δράσης των εκχυλισμάτων ως εναλλακτικό υπόστρωμα για την τυροσινάση 92

4.6.3 Αποτελέσματα αναστολής του ενζύμου από το εκχύλισμα των φύλλων της *Salvia verticillata* 93

4.7 Αποτελέσματα κλασμάτωσης του εκχυλίσματος των φύλλων της Salvia verticillata... 95

4.7.1 Ποιοτική σύγκριση των κλασμάτων..... 95

5. Συζήτηση-Συμπεράσματα..... 99

6. Βιβλιογραφία 103

1. Εισαγωγή

Στην βιομηχανία καλλυντικών χρησιμοποιούνται εκχυλίσματα φυτών και φυσικά προϊόντα με ευεργετικές δράσεις. Κάποιες από αυτές είναι η αντιβακτηριακή, η αντιοξειδωτική, η αντιμυκητιακή, η αντιφλεγμονώδης και η επουλωτική δράση τους. Παραδείγματα περιλαμβάνουν εκχυλίσματα από τα εναέρια μέρη και τα σπέρματα των φυτών *Tamarindus indica* και *Senna alata,* πλούσια σε πολυφαινόλες, φλαβονοειδή και ξυλογλυκάνη (hemicellulose), τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για την προστασία του δέρματος από την ηλιακή ακτινοβολία αλλά και εκχυλίσματα φύλλων από το *Tripogandra serrulata* που βρήκαν εφαρμογή σε προϊόντα για θεραπεία κατά της τριχόπτωσης.[1] Τα αιθέρια έλαια είναι επίσης κοινά συστατικά στην βιομηχανία των καλλυντικών, σε προϊόντα όπως λοσιόν, κρέμες, έλαια για μασάζ, μάσκες και σαμπουάν.[1]

Τα τελευταία χρόνια, στις διάφορες βιομηχανίες τροφίμων δημιουργείται μια συνεχώς αυξανόμενη ποσότητα αποβλήτων προερχόμενη από τα παραπροϊόντα των διαφόρων διεργασιών της βιομηχανικής παραγωγής, η οποία ορθώς εκμεταλλευόμενη λειτουργεί ως «χρυσός» για την βιομηχανία καλλυντικών. Ωστόσο, όπως κάθε συστατικό το οποίο πρόκειται να έρθει σε επαφή με τον άνθρωπο, πρέπει να πληροί κάποιες ποιοτικές προδιαγραφές και να χρησιμοποιείται υπό συγκεκριμένες συνθήκες και κανόνες.[1]

1.1 Φασκόμηλο

Η οικογένεια Lamiaceae (πρώην Labiatae) ή αλλιώς Χειλανθή, μια ευρέως διαδεδομένη οικογένεια, περιλαμβάνει 220 γένη και 4000 είδη που κατανέμονται σε όλον τον κόσμο. Η αυξανόμενη καλλιέργεια της αντανακλά τη μεγάλη βιολογική αξία των φυσικών προϊόντων που περιέχουν, και δεν είναι τυχαίο ότι αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει τα περισσότερα και πιο γνωστά φαρμακευτικά φυτά.[2]

Το γένος *Salvia*, ένα από τα μεγαλύτερα γένη της οικογένειας, αποτελείται από περισσότερα από 1000 είδη, οργανωμένα σε πέντε υπογένη (*Sclarea, Audibertia, Jungia, Leonia, και Salvia*) ως πόες, ημιθαμνώδη ή θαμνώδη πολυετή φυτά. Το όνομα *Salvia* προέρχεται από το λατινικό "*salvare*", που σημαίνει "να θεραπεύει", υπογραμμίζοντας τη συνεχή θεραπευτική χρήση του φυτού για χιλιετίες. Το γένος *Salvia* κατανέμεται ευρέως σε διάφορες περιοχές του

κόσμου, συμπεριλαμβανομένων των τροπικών ζωνών του πλανήτη, όπως τη Μεσόγειο, την Κεντρική Ασία, τα νησιά του Ειρηνικού, την τροπική Αφρική και την Αμερική. [2]

Ορισμένα είδη αυτού του γένους έχουν οικονομική σημασία εξαιτίας της χρήσης τους ως πρόσθετα στην παρασκευή αρωμάτων και καλλυντικών προϊόντων. Για παράδειγμα, το είδος *Salvia sclarea* L. ή ευρέως γνωστό ως clary sage, καλλιεργείται εμπορικά και το αιθέριο έλαιό του χρησιμοποιείται ευρέως ως αρωματικό.[2] Το είδος *Salvia pratensis* L. χρησιμοποιείται επίσης στην κοσμητολογία και διαθέτει διάφορες βιολογικές ιδιότητες.[2] Ακόμη, το είδος *Salvia officinalis* L., το πιο διαδεδομένο είδος του γένους, χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα για την θεραπεία διαφόρων παθήσεων, όπως η φυματίωση, η ψωρίαση και τα σμηγματορροϊκά εκζέματα, ενώ σύμφωνα με τον EMA (European Medicines Agency) ενδείκνυται κυρίως για στοματική και δερματική χορήγηση.[2,3] Οι παραδοσιακές χρήσεις του είδους *S.officinalis* αφορούν την χρήση του για την ανακούφιση συμπτωμάτων δυσπεψίας και φλεγμονών της στοματοφαρυγγικής κοιλότητας και του δέρματος.[3]

Γενικότερα, είδη του γένους *Salvia* χρησιμοποιούνται από πολύ παλιά στη παραδοσιακή θεραπευτική, λόγω των ποικίλων βιολογικών τους δράσεων, όπως η αντιβακτηριακή, η σπασμολυτική, η αιμοστατική και πολλές άλλες. Κάποια είδη *Salvia* έχουν καλλιεργηθεί διεθνώς και για χρήση στην μαγειρική. [2] Ακόμη, προτείνεται η χρήση τους για την αντιμετώπιση της ηπατίτιδας, διαφόρων καρδιαγγειακών νόσων, της απώλειας μνήμης, των διαταραχών της εμμήνου ρύσεως και της αυπνίας.[4]

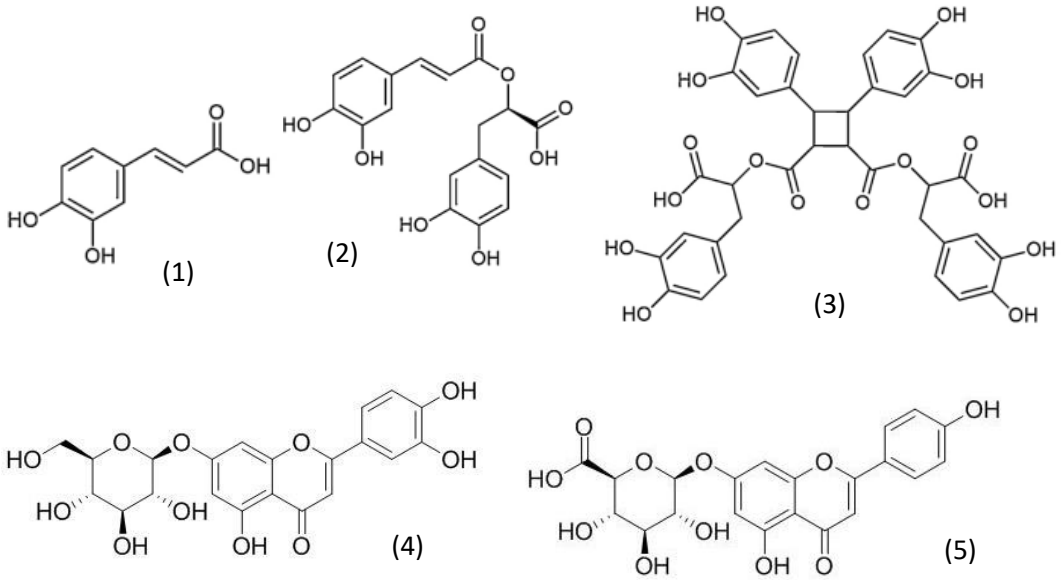
1.1.1 Κατανομή του γένους *Salvia* στην Ευρώπη και στην Ελλάδα

Αν και το γένος *Salvia* εκπροσωπείται από 1000 είδη, μόνο 36 από αυτά απαντώνται στην Ευρώπη και συγκεντρώνονται κυρίως στην Ιβηρική και Βαλκανική χερσόνησο, 11 εκ των οποίων είναι ενδημικά. Τα περισσότερα είδη φυτρώνουν ανεξαρτήτως της ποιότητας του εδάφους και προτιμούν θερμό και ηλιόλουστο κλίμα καθώς και πετρώδες περιβάλλον. Στον ελλαδικό χώρο εντοπίζονται 26 είδη και υποείδη *Salvia* και κατανέμονται σε πολλές διαφορετικές περιοχές της χώρας.[5,6]

Λιπαρά οξέα, φλαβονοειδή και τερπενοειδή είναι μερικές από τις κατηγορίες βιοδραστικών ενώσεων που έχουν μελετηθεί στο γένος *Salvia*. Τα είδη *Salvia officinalis, Salvia lavandulifolia και Salvia fruticosa* έχουν μελετηθεί εκτεταμένα, όμως πολλά σπάνια είδη παραμένουν ανεξερεύνητα και συγκεντρώνουν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον.[5] Στην Ελλάδα, τα είδη *S. fruticosa, S. officinalis* και *Salvia pomifera* χρησιμοποιούνται κατά κόρον ως καρυκεύματα και ως συστατικά για θεραπευτικούς σκοπούς.[7]

1.1.2 Το είδος *Salvia verticillata* L.

Το είδος φασκόμηλου *S. verticillata* ή «lilac sage» είναι ένα ποώδες, πολυετές φυτό και εντοπίζεται κυρίως στην Ευρώπη και στην Ασία. Αν και η ανάγκη για καινούργιες πηγές πρώτων υλών στις διάφορες βιομηχανίες, ειδικότερα στην βιομηχανία τροφίμων, αρωμάτων, φαρμάκων και καλλυντικών, αυξάνεται ραγδαία, το είδος αυτό έχει μελετηθεί ελάχιστα παρά το γεγονός ότι ανήκει σε ένα γένος με μεγάλη βιολογική αξία. Μελέτες επισημαίνουν την περιεκτικότητα του είδους σε ροσμαρινικό οξύ και άλλα παράγωγα του καφεϊκού οξέος.[8] Ωστόσο, στην βιβλιογραφία έχουν μελετηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό τα αιθέρια έλαια, παρά τα πολικά εκχυλίσματα του φυτού.[8,9] Στην Εικόνα 1 φαίνονται κάποια φαινολικά οξέα (1,2,3) και φλαβονοειδή (4,5) που έχουν ταυτοποιηθεί στο είδος.[8]



Εικόνα 1. Χημική δομή του καφεϊκού οξέος (1), του ροσμαρινικού οξέος (2), του σαγερινικού οξέος (3), του γλυκοζίτη της λουτεολίνης (4) και του γλυκουρονιδίου της απιγενίνης (5).

Οι δράσεις των εκχυλισμάτων της *S. verticillata* ποικίλουν, με μερικές από αυτές να είναι η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης, η αντιμικροβιακή, η αντικαταθλιπτική και η αντισπασμωδική δράση του, καθώς και η δράση τους ως αναστολείς ενζύμων όπως η τυροσινάση, η γλυκοσιδάση και η ακετυλοχολινεστεράση.[9]



Εικόνα 2. Φωτογραφία της *S. verticillata* [πηγή:Salvia verticillata L., Plants of the World Online, Kew Science]

1.1.3 Το είδος *Salvia fruticosa* Mill.

Το ελληνικό φασκόμηλο ονόματι "Greek sage" ή αλλιώς *S. fruticosa* εντοπίζεται από την Ιταλία έως και την Δυτική Συρία και είναι από τα πιο κοινά είδη στην Ελλάδα. Λόγω της αξίας του αιθέριου ελαίου του, έχουν μελετηθεί αρκετά οι αυτοφυείς πληθυσμοί στην περιοχή της Δυτικής Μεσογείου στη Μάλτα, την Ισπανία και την Πορτογαλία για την χημική σύσταση και παραλλακτικότητα του αιθερίου ελαίου καθώς και οι ιδιότητες αυτού. Το τσάι που προέρχεται από τα φύλλα του χρησιμοποιείται για την ανακούφιση από πονοκεφάλους, στομαχόπονο, κοιλιακό πόνο και άλλα συμπτώματα.[5] Τέλος,

τα υδατικά του εκχυλίσματα έχουν μελετηθεί και παρουσιάζουν μεταξύ άλλων αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση.[5]



Εικόνα 3. Φωτογραφία της *S. fruticosa* [πηγή: https://www.gardensonline.com.au/GardenShed/PlantFinder/Show_3201.aspx]

1.2 Το είδος *Salvia verticillata* ως πηγή βιοδραστικών ενώσεων

1.2.1 Πηγή πολυφαινολών

Φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και φαινολικά τερπένια μπορούν να εντοπιστούν σε αρκετά υψηλές ποσότητες στα γένη της οικογένειας Lamiaceae, επομένως και στο είδος *Salvia verticillata,* προσφέροντας πληθώρα βιολογικών δράσεων. Το καρνοσικό οξύ για παράδειγμα, είναι ένα αβιετικό διτερπένιο με αντιοξειδωτική δράση, το οποίο ταυτοποιείται αποκλειστικά στα φυτά της οικογένειας Lamiaceae και αποτρέπει το οξειδωτικό στρες των χλωροπλαστών.[10]

Για να μπορέσουμε να εκτιμήσουμε την πιθανή αξιοποίηση φυτικών εκχυλισμάτων σε κάποια βιομηχανία και κατ' επέκταση σε κάποιο προϊόν, είναι απαραίτητο να βρεθεί κάποιου είδους συσχέτιση με το φαινολικό τους περιεχόμενο. Σε μελέτη των Lee et al. έγινε μία προσπάθεια να βρεθεί η συσχέτιση του φαινολικού περιεχομένου 28 ειδών της οικογένειας Lamiaceae, συμπεριλαμβανομένου του γένους *Salvia*, με δράσεις σχετικές με το δέρμα, συμβάλλοντας στην εξέλιξη του τρόπου με τον οποίο επιλέγονται τα φυτικά εκχυλίσματα ως συστατικά σε καλλυντικά σκευάσματα. [11]

Από την παραπάνω μελέτη προέκυψε πως υψηλό περιεχόμενο πολυφαινολών και φλαβονοειδών παίζει καταρχάς σημαντικό ρόλο στην χρήση ενός εκχυλίσματος ως λευκαντικό παράγοντα, λόγω αναστολής του ενζύμου της τυροσινάσης.[11] Επίσης, δράση έναντι του θετικού κατά gram βακτηρίου *Staphylococcus aureus*, το οποίο μπορεί να προκαλέσει μεταξύ άλλων ακμή, καθιστά ένα εκχύλισμα, συνδυαστικά με αντιφλεγμονώδη δράση, ιδανικό για χρήση σε σκευάσματα κατά της ακμής. [11] Τα εν λόγω εκχυλίσματα εξετάστηκαν και για την απορρόφηση της UVA και UVB ακτινοβολίας, προτείνοντας πως εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας Lamiaceae με υψηλό φαινολικό περιεχόμενο μπορούν να δρουν ως φωτο-προστατευτικοί παράγοντες.[12] Άλλωστε, το τελευταίο έχει προταθεί συγκεκριμένα στην βιβλιογραφία για το ροσμαρινικό οξύ. [10] Ειδικότερα για το γένος *Salvia*, επισημάνθηκε η πιθανή χρήση των εκχυλισμάτων του σε αντιγηραντικά σκευάσματα λόγω της αυξημένης αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδης δράσης του. [11]

1.2.2 Πηγή λιπαρών οξέων

Τα λιπίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στις κυτταρικές μεμβράνες καθώς αποτελούν βασικά δομικά συστατικά τους. Για αυτό τον λόγο, οποιαδήποτε μεταβολή στην σύσταση τους μπορεί να προβεί καταστροφική για τις κυτταρικές μεμβράνες των φυτών. Για παράδειγμα, χαμηλά επίπεδα αλατότητας στην Τυνησία έχει βρεθεί πως μπορεί να επηρεάσει την βιοσύνθεση τους.[12]

Η αξιοποίηση των λιπαρών οξέων από τις διάφορες βιομηχανίες οδηγείται πλέον από οικονομικούς και ταξονομικούς παράγοντες και επικεντρώνεται στην εύρεση νέων μεθόδων παραγωγής τους σε μεγάλη κλίμακα. Ένα παράδειγμα που ξεκινάει από τον 17-18ο αιώνα είναι η σαπωνοποίηση, βελτιώνοντας τον τότε τρόπο παραγωγής σαπουνιών.[13] Γενικότερα, οι βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων έχουν κατευθύνει το ενδιαφέρον τους κυρίως στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), καθώς φαίνεται να διαθέτουν πολλαπλά πλεονεκτήματα για την ανθρώπινη υγεία.[14]

Η αντιμικροβιακή δράση των λιπαρών οξέων αναγνωρίζεται από αρκετά παλιά, ωστόσο εντύπωση δημιουργεί το γεγονός ότι παραμένουν ανεκμετάλλευτα στην βιομηχανία των φαρμάκων, ειδικότερα αφού ο ανθρώπινος οργανισμός έχει αναπτύξει πλέον ισχυρή μικροβιακή αντοχή στα

σύγχρονα σκευάσματα. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα μικρής και μεσαίας αλυσίδας φαίνεται να εμφανίζονται ως πιο δραστικά αντιμικροβιακά συστατικά, με παράδειγμα το καπρικό (C10:0) και το λαυρικό οξύ (C12:0). Ακόμη, διαθέτουν μη-διαβρωτικά χαρακτηριστικά σε αντίθεση με τα διαθέσιμα στην αγορά απολυμαντικά, οπότε θα μπορούσαν να εισαχθούν ασφαλώς σε τέτοια σκευάσματα.[15]

Επιπλέον, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα C16 και C18 συμβάλλουν φυσιολογικά στην προστασία του δέρματος από εξωτερικά μικροβιακά παθογόνα, επομένως μπορούν να θεωρηθούν ως μη ερεθιστικοί παράγοντες σε συγκεντρώσεις απαραίτητες για να εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση. [15] Κατά συνέπεια, ο πιο πιθανός τρόπος αξιοποίησης τους στην φαρμακευτική βιομηχανία κατά την βιβλιογραφία, είναι για τοπική και επιφανειακή χρήση. [15] Το ενδεκυλενικό οξύ (C11:1n-1) για παράδειγμα χρησιμοποιείται ήδη για την ίαση μυκητιασικών λοιμώξεων του δέρματος και των νυχιών. [15] Μπορεί να εξαχθεί λοιπόν το συμπέρασμα πως τα λιπαρά οξέα, συνδυαστικά με την αποδεδειγμένη αντιφλεγμονώδη δράση τους, θα ήταν ιδανικά συστατικά για την καταπολέμηση δερματικών παθήσεων και της ακμής.[15] Ενισχυτικά προς αυτό, μελέτη εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα, το οποίο υπέστη περαιτέρω σαπωνοποίηση και οξύνιση, ενός πληθυσμού φασκόμηλου του είδους *Salvia bicolor* Desf. από την Αίγυπτο, έδειξε αντιφλεγμονώδη, αναλγητική, αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. [16]

Αναφορικά με την χρήση τους στα καλλυντικά προϊόντα και προϊόντα προσωπικής υγιεινής, αν και τα λιπαρά οξέα και τα αλκαλικά τους άλατα ήταν πιθανόν από τα πρώτα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν, η χρήση τους πλέον είναι περιορισμένη. Ένας λόγος είναι το χαμηλό pKa ενός λιπαρού οξέος εξαιτίας της δομής του, δηλαδή μίας μακριάς ανθρακικής αλυσίδας και μίας καρβοξυλικής ομάδας. Ένας άλλος λόγος είναι η περιορισμένη υδατοδιαλυτότητα του , σε αντίθεση με ένα άλας ενός λιπαρού οξέος το οποίο εμφανίζει υψηλότερη υδατοδιαλυτότητα. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις η χρήση τους είναι πιθανόν να προκαλέσει κάποιον δερματικό ερεθισμό, αφού δεν εμφανίζουν χημικές και φυσικές ιδιότητες κατάλληλες για ένα καλλυντικό σκεύασμα. Προς αποφυγή λοιπόν χρήσης αυτούσιων των λιπαρών οξέων, αξιοποιούνται πλέον στην μορφή των αλκοολών, των εστέρων και των αμινών τους αλλά και σε άλλες τροποποιημένες μορφές τους αξιοποιήσιμες για την

βιομηχανία των καλλυντικών, όπως ανιονικά και μη-ανιονικά επιφανειοδραστικά.[17]

Οι αλκοόλες των λιπαρών οξέων, διατηρώντας τις δομικές ιδιότητες ενός λιπαρού οξέος αλλά έχοντας μια μη ιοντίσιμη πολική ομάδα, χρησιμοποιούνται κατά κόρον ως σταθεροποιητές σε γαλακτώματα και προσδίδουν δομή σε άνυδρα στικ και εναιωρήματα. Τα επιφανειοδραστικά που προέρχονται από τροποποίηση της καρβοξυλικής τους ομάδας βρίσκουν εφαρμογή στην πλειονότητα των καλλυντικών σκευασμάτων, ειδικότερα σε προϊόντα καθαρισμού του δέρματος και των μαλλιών. Επιπλέον, οι αμίνες των λιπαρών οξέων, όντας φορτισμένες μπορούν να προσελκύσουν τις πρωτεΐνες κερατίνης των μαλλιών και του δέρματος, επιτρέποντας την τροποποίηση της επιφάνειας τους. Τέλος, οι εστέρες των λιπαρών οξέων αξιοποιούνται ως μαλακτικές ουσίες.[17]

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι για λόγους βιωσιμότητας και κυκλικής οικονομίας υπάρχει αυξανόμενη ανάγκη εύρεσης πρώτων υλών και πρόδρομων ουσιών για τις διάφορες βιομηχανίες. Οι ελάχιστες διαθέσιμες μελέτες γύρω από την ανάλυση των ειδών της *Salvia* για το περιεχόμενο τους σε λιπαρά οξέα, επικεντρώνονται κυρίως στην ανάλυση των σπερμάτων του φυτού. Από την διαθέσιμη βιβλιογραφία, το λινελαϊκό, λινολενικό και ελαϊκό οξύ έχουν βρεθεί ως τα κύρια λιπαρά οξέα του γένος *Salvia*.[16] Σε άλλη μελέτη ωστόσο, αναφέρονται ως συχνά απαντώμενα λιπαρά οξεά, το μυριστικό, το παλμιτικό και το πενταδεκανοϊκό οξύ.[12] Το είδος *S. verticillata* φαίνεται να έχει μελετηθεί μόνο στην έρευνα του Adil Bakoglu et al., μάλιστα αφορά την ανάλυση φύλλων έξι (6) ειδών *Salvia*, οπότε η επιλογή της για αξιολόγηση της σύστασης των λιπαρών οξέων αποτελεί ιδανική περίπτωση. Σε αυτή τη μελέτη, ως τα κύρια λιπαρά οξέα του είδους *S. verticillata* προσδιορίστηκαν το λινελαϊκό, το λινολενικό και το παλμιτικό οξύ.[18]

1.3 Βιολογικές δράσεις φασκόμηλου

1.3.1 Αντιοξειδωτική δράση

Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα γένος *Salvia* είναι εκείνες που προσδίδουν το μεγαλύτερο μέρος της αντιοξειδωτικής δράσης. Ένας αντιοξειδωτικός παράγοντας πρακτικά προστατεύει τα κύτταρα ενός φυτού από

όποια καταστροφή μπορεί να υποστούν από ελεύθερες ρίζες, προερχόμενες από τον ίδιο τον οργανισμό η από έκθεση σε κάποιον στρεσογόνο παράγοντα, όπως η έκθεση σε UV ακτινοβολία και σε μολυσματικούς παράγοντες του εδάφους και της ατμόσφαιρας. Έχει αποδειχθεί, πως οι φαινολικές ενώσεις είναι πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά από την βιταμίνη C,E.[10]

Αιθέριο έλαιο και εκχύλισμα εξανίου της *Salvia chionantha*, πλούσια σε τερπενοειδή και λιπαρά οξέα αντίστοιχα, έχουν μελετηθεί για την αντιοξειδωτική τους δράση με το δεύτερο να εμφανίζει μεγαλύτερη αναστολή της υπεροξείδωσης των λιπιδίων στο σύστημα β-καροτένιο-λινολεϊκό οξύ.[19] Ακόμη, εκχυλίσματα πετρελαϊκού αιθέρα και χλωροφορμίου της *S. verticillata* εξετάστηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, δίνοντας παρόμοια μεταξύ τους αποτελέσματα.[20] Αυτό το αποτέλεσμα είναι πιθανό να οφείλεται στα τριτερπενοειδή που εκχυλίζονται από μη πολικούς διαλύτες.[20]

Η αντιοξειδωτική δράση των πολικών εκχυλισμάτων του γένους *Salvia* φαίνεται να συγκεντρώνει σημαντικό ενδιαφέρον στην βιβλιογραφία, με μεγάλο αριθμό ερευνών να στοχεύουν στην φυτοχημική ανάλυση και μελέτη των εκχυλισμάτων. Λόγω της εντυπωσιακής δράσης τους, πολλές είναι οι μελέτες που στοχεύουν στην απομόνωση νέων χημικών ενώσεων, οι οποίες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική δράση ενός τέτοιου εκχυλίσματος.

Για παράδειγμα, σε μελέτη των Al-Qudah et al., η οποία αφορά βουτανολικό εκχύλισμα της *Salvia palaestina* L. από την Ιορδανία, απομονώθηκαν τρεις νέοι δευτερογενείς μεταβολίτες, η σαλπαλεστινίνη, το μεθυλο-3-Ο-μεθυλο-ροσμαρινικό οξύ και το 7-Ο-(2''-p-υδροξυβενζοϋλο)-β-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης.[21] Τα δύο πρώτα μόρια εμφάνισαν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, η οποία πιστεύεται ότι οφείλεται σε δύο υδροξύλια σε ο- θέση στο μόριο.[21] Αυτός ο ισχυρισμός υποστηρίζεται και από την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης ενώσεων που απομονώθηκαν από μεθανολικό εκχύλισμα της *Salvia plebeia* από την Κίνα, σύμφωνα με την οποία εάν υπάρχει μια ομάδα που δίνει ηλεκτρόνια, ειδικά μια υδροξυλομάδα που βρίσκεται στις ο- ή p- θέσεις των φαινολικών ενώσεων, η αντιοξειδωτική δράση ενός μορίου αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό.[22]

1.3.2 Αντιφλεγμονώδης και αναλγητική δράση

Τα αναλγητικά και αντιφλεγμονώδη φάρμακα διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του οιδήματος, της ερυθρότητας και του πόνου. Χορηγούνται μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα για την θεραπεία διαφόρων συμπτωμάτων ή παθήσεων, όπως η γρίπη, ο πόνος και ο πυρετός.[23]

Τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τα φυτά αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως σημαντικές πηγές χημικών ενώσεων με πιθανή αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση, οπότε πολλές είναι οι μελέτες που στοχεύουν στην εύρεση τέτοιων δράσεων από φυτικά εκχυλίσματα.

Εκχυλίσματα των βλαστών και των εναέριων τμημάτων του είδους *S. fruticosa* μελετήθηκαν για πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση σε μύες στους οποίους επάγεται οίδημα από την καραγενάνη και εμφάνισαν πράγματι ενθαρρυντικά αποτελέσματα, με το μεθανολικό εκχύλισμα των εναερίων τμημάτων να εμφανίζει μεγαλύτερη από εκείνο των βλαστών. Οι φαινολικές ενώσεις θεωρούνται οι κύριοι παράγοντες για αυτήν την δράση, ενώ το συνολικό εκχύλισμα παρουσιάζει δράση παρόμοια με το φάρμακο diclofenac.[24] Ακόμη, εκχύλισμα χλωροφορμίου του είδους *Salvia wiedemannii* από την Τουρκία, έχει βρεθεί πως κατέχει αναλγητική δράση παρόμοια με την μορφίνη σε μύες στους οποίους είχε προκληθεί πόνος, ενώ αιθανολικά, βουτανολικά και υδατικά εκχυλίσματα εμφανίζουν δράση παρόμοια με την ασπιρίνη.[25]

In vivo δοκιμές διαφόρων ειδών *Salvia* σε μύες στο μοντέλο πρόκλησης οιδήματος με καραγενάνη, ανέδειξαν την αντιφλεγμονώδη δράση τους, και συγκεκριμένα εκχύλισμα ακετόνης του είδους *S. verticillata* εμφάνισε καλύτερο αποτέλεσμα από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα μεθανόλης και χλωροφορμίου. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις πολλών φυτών συμπεριλαμβανομένου του γένους *Salvia,* συνήθως αποδίδονται στα τριτερπένια και στα φλαβονοειδή του εκάστοτε εκχυλίσματος.[26]

1.3.3 Αντιμικροβιακή δράση

Η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων *Salvia*, έχει μελετηθεί εκτενώς στην βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, μεθανολικά εκχυλίσματα της *S. microstegia*

και της *S. verticillata* έχουν εξεταστεί για την δράση τους έναντι διαφόρων βακτηρίων και μυκήτων με σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι στο βακτήριο *Bacillus subtilis*, τα οποία όμως δεν εμφάνισαν αντιμυκητιακή δράση έναντι στην *Candida albicans* και *Saccharomyces cerevisiae*. Ωστόσο, στην βιβλιογραφία έχει βρεθεί πως μεθανολικό εκχύλισμα του είδους *S.officinalis* εμφανίζει δράση έναντι του μύκητα *Candida albicans,* γεγονός που πυροδοτεί περαιτέρω μελέτες ως προς την σύνδεση του φυτοχημικού περιεχομένου με την αντιμικροβιακή του δράση.[27,28]

Στο παρελθόν, αιθέρια έλαια της *S. lavandulifolia S. verticillata, S. aethiopis* και *S. nemorosa* έχουν εμφανίσει αντιμικροβιακή δράση έναντι των *S. aureus* και *E. coli,* όμως λόγω τοξικότητας των αιθερίων ελαίων γενικότερα, πολλές μελέτες εστιάζουν κυρίως στα πολικά εκχυλίσματα.[27,29,28]

1.3.4 Αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης

Η νόσος του Alzheimer (AD) συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων της ακετυλοχολίνης (Ach) στα διάφορα μέρη του εγκεφάλου. Το ένζυμο που ευθύνεται για την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης στην πλειονότητα των ιστών, όπως στους μύες, στα νεύρα και στα ερυθροκύτταρα είναι η ακετυλοχολινεστεράση. Αντίθετα, σε ιστούς όπως του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), του ήπατος και του πλάσματος εντοπίζεται κυρίως η βουτυρυλοχολινεστεράση. Συνεπώς, χημικά μόρια τα οποία αναστέλλουν τα παραπάνω ένζυμα, εμποδίζουν την μείωση της ακετυλοχολίνης και ενδεχομένως βοηθούν στην πρόληψη και αντιμετώπιση της νόσου.[30]

Ωστόσο, στην βιβλιογραφία δεν είναι ξεκάθαρη η παθογένεση της νόσου και θεωρείται πως είναι πιθανό να ευθύνεται για αυτήν και το οξειδωτικό στρες που προκαλείται λόγω των ROS, καταλήγοντας σε κυτταρικές βλάβες. Γενικότερα, το οξειδωτικό στρες είναι άμεσα συνδεδεμένο με διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους, συμπεριλαμβανομένου και της νόσου του Parkinson. Αν και η θεραπεία της νόσου ενέχει πολύπλοκη στρατηγική όσον αφορά την φαρμακευτική αγωγή, πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της διατροφής φαίνεται να έχει θετικό αντίκτυπο στην μείωση της εμφάνισης τέτοιων νόσων.[30]

Καθώς στην βιβλιογραφία έχει συζητηθεί η πιθανή χρήση του γένους *Salvia* για βελτίωση της μνήμης, τα μη πολικά εκχυλίσματα κάποιων ειδών εμφανίζουν αξιοσημείωτη δράση ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης και της βουτυρυλοχολινεστεράσης, σε αντίθεση με τα πολικά εκχυλίσματα που φαίνεται να είναι λιγότερο δραστικά. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Orhan et al., ανάμεσα σε 36 εκχυλίσματα 14 ειδών *Salvia*, συμπεριλαμβανομένου της *S. verticillata*, εμφάνισαν δράση για την αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης και της βουτυρυλοχολινεστεράσης μόνο 2 και 13 εκχυλίσματα, αντίστοιχα. Αυτά τα εκχυλίσματα προέρχονταν από μη πολικούς διαλύτες, όπως χλωροφόρμιο και πετρελαϊκό αιθέρα, συνεπώς πλούσια σε τερπενοειδή μόρια.[30]

Το μεθανολικό εκχύλισμα της *S. verticillata* έχει μελετηθεί αρκετά στο παρελθόν για την πιθανή αναστολή των παραπάνω ενζύμων, ωστόσο και στην μελέτη των Karakaya et al. φαίνεται να είναι λιγότερο δραστικό από το εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα αλλά και από το αιθέριο έλαιο του.[31]

1.3.5 Δράσεις σχετιζόμενες με την καλλυντική βιομηχανία

1.3.5.1 Αντιγηραντική δράση

Το δέρμα είναι πολύ ευαίσθητο όργανο ενός οργανισμού και μπορεί να αλλοιωθεί από διάφορους εξωτερικούς παράγοντες όπως η έκθεση στην υπεριώδη (UV) ακτινοβολία. Η γήρανση του δέρματος μπορεί συμβεί με δύο τρόπους. Ο ένας είναι η φυσιολογική χρονολογική γήρανση λόγω ηλικίας και ο δεύτερος η γήρανση που προκαλείται από την υπερβολική ή μη ελεγχόμενη έκθεση στην UV ακτινοβολία. Κατά τον δεύτερο τρόπο η γήρανση γίνεται με πιο βίαιο τρόπο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το δέρμα να εμφανίζεται πιο ταλαιπωρημένο και τραχύ, συνοδευόμενο από μαύρα στίγματα. [32]

Κύριο ρόλο στην γήρανση του δέρματος παίζουν τα ένζυμα της κολλαγενάσης, της ελαστάσης και της υαλουρονιδάσης. Καταρχάς, το κολλαγόνο είναι μία πρωτεΐνη που προσδίδει στο δέρμα την δύναμη και την σφριγηλότητα του και η διάσπασή του καταλύεται από την κολλαγενάση. Η ελαστίνη προσδίδει στο δέρμα την ελαστικότητα και την ευλυγισία του και η αποικοδόμησή του καταλύεται αντιστοίχως από την ελαστάση. Το κολλαγόνο και η ελαστάση δρουν συνεργιστικά και κρατούν το δέρμα απαλό και σφριγηλό. Το υαλουρονικό οξύ, είναι ένας υδατάνθρακας, χάρη στον οποίο το δέρμα παραμένει ενυδατωμένο και ο κατακερματισμός του καταλύεται από την

υαλουρονιδάση. Όταν το δέρμα απορροφά UV ακτινοβολία, οι ROS αυξάνονται οδηγώντας το σε οξειδωτικό στρες. Υψηλά επίπεδα ROS ενεργοποιούν την δράση των τριών αυτών ενζύμων οδηγώντας το δέρμα στην πρόωρη γήρανση.[32]

Τα φυτά είναι κύρια πηγή συστατικών για καλλυντικά σκευάσματα σχετιζόμενα με την γήρανση. Μεθανολικό εκχύλισμα του είδους *S.officinalis* έχει εξεταστεί στην βιβλιογραφία για την αναστολή των παραπάνω ενζύμων τόσο *in vitro* αλλά και *in vivo,* σε δέρμα ποντικιών το οποίο υποβλήθηκε σε UV ακτινοβολία με σκοπό την γήρανση του. Το εκχύλισμα εξετάστηκε επίσης για τυχόν ερεθιστικές ιδιότητες καθώς και για την ικανότητα του να προστατέψει το δέρμα από το σχηματισμό ρυτίδων. [32]

Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης, προτείνουν την πιθανή χρήση του εκχυλίσματος ως φωτοπροστατευτικό παράγοντα, αφού κατάφερε να αναστείλει σε *in vitro* μελέτες τα ένζυμα της κολλαγενάσης, της ελαστάσης και της υαλουρονιδάσης. Επιπλέον, το εκχύλισμα δεν προκάλεσε κάποιο σημάδι ερεθισμού ή ερυθρότητας και η τοπική εφαρμογή του σε δέρμα υπό UV ακτινοβολία έδειξε ότι μπορεί μειώσει την εμφάνιση ρυτίδων. [32]

Επιπρόσθετα, σε άλλη μελέτη εκχυλισμάτων νερού, διχλωρομεθανίου και μεθανόλης πλυθυσμών των ειδών *Salvia blepharochlaena, Salvia euphratica και S. verticillata* από την Τουρκία, εξετάστηκε μεταξύ άλλων η πιθανή δράση τους ως αναστολείς της ελαστάσης. Τα υδατικά εκχυλίσματα δεν εμφάνισαν καμία αναστολή του ενζύμου, ωστόσο τα εκχυλίσματα του διχλωρομεθανίου της *S.blepharochlaena* και της μεθανόλης της *S. verticillata* παρουσίασαν υψηλή ανασταλτική δράση έναντι της ελαστάσης, προτείνοντας τα δύο είδη ως πιθανή πρώτη ύλη σε αντιγηραντικά σκευάσματα.[33]

1.3.5.2 Λευκαντική δράση

Η μελανογένεση ξεκινά από την οξείδωση της τυροσίνης σε ντοπακινόνη, η οποία καταλύεται από την τυροσινάση. Η ντοπακινόνη μέσα από μία περίπλοκη διαδικασία κατά την οποία δημιουργούνται διάφορες ενδιάμεσες χημικές δομές, καταλήγει να παράξει την μελανίνη του δέρματος. Αν και η μελανίνη έχει κυρίως φωτοπροστατευτικές ιδιότητες, η συσσώρευση της είναι πιθανό να προκαλέσει

προβλήματα, αφού δημιουργούνται σκούρα σημεία στην επιδερμίδα, αλλοιώνοντας την εμφάνιση της.[34]

Η τυροσινάση, ή αλλιώς μονοφαινολο-μονοοξυγενάση, κατεχολο-οξειδάση ή διφαινυλο-οξειδάση, γενικότερα καταλύει την οξείδωση μονοφαινολών και ο-διφαινολών στις δραστικές ο-κινόνες.[35,34] Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από δύο άτομα χαλκού (Cu) στο οποίο διατηρούνται τρία υπολείμματα ιστιδίνης.[34] Το φυσικό υπόστρωμα της είναι φαινολικά μόρια, τα οποία οξειδώνει όταν κάποιος ιστός υποβληθεί σε ζημιά.[34] Το ένζυμο που προέρχεται από μύκητα του είδους *Agaricus bisporus* είναι υψηλά ομόλογο με αυτό των θηλαστικών, οπότε το καθιστά ιδανικό για χρήση στις διάφορες *in vitro* μελέτες. [34]



Εικόνα 4. Τρισδιάστατη δομή της τυροσινάσης [πηγή: https://www.creative-enzymes.com/similar/tyrosinase_700.html]

Οι αναστολείς της τυροσινάσης μπορούν να προέλθουν από φυσικές και συνθετικές πηγές. Ο ορισμός ενός αναστολέα είναι περίπλοκος, διότι πρέπει να συνδέεται άμεσα με την αναστολή της δράσης του ενζύμου, δηλαδή την πρόσδεση του αναστολέα στο ενεργό του κέντρο και να μην αναφέρεται απλώς ως «παρεμποδιστής» της μελανογένεσης. Το κοζικό οξύ για παράδειγμα, ένας μυκητιακός μεταβολίτης, είναι ο πιο διαδεδομένος αναστολέας της τυροσινάσης και χρησιμοποιείται σε διάφορα καλλυντικά προϊόντα ως λευκαντικός παράγοντας, καθώς και ως πρόσθετο στα τρόφιμα με σκοπό την αποφυγή του «μαυρίσματος» της όψης τους. [34]

Οι πολυφαινόλες αποτελούν την μεγαλύτερη κατηγορία αναστολέων της τυροσινάσης, ειδικότερα τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια και τα παράγωγα της κουμαρίνης. Η επίδραση του αριθμού και της θέσης του υδροξυλίου στο μόριο τους φαίνεται πως παίζει σημαντικό ρόλο για την ανασταλτική δράση έναντι στην τυροσινάση. Ακόμη, παράγωγα μόρια βενζαλδεΰδης και βενζοϊκού οξέος, όπως το γαλλικό οξύ, έχουν απομονωθεί και μελετηθεί τα τελευταία χρόνια για την ανασταλτική τους δράση. Από την μελέτη τέτοιων μορίων ενδείκνυται ότι, τόσο η ο-διυδροξυλομάδα, όσο και η ομάδα της αλδεΰδης παίζουν πιθανόν καθοριστικό ρόλο στην εκάστοτε ανασταλτική τους δράση. [34]

Λιπίδια μακριάς αλυσίδας και στεροειδή προερχόμενα από φυσικές πηγές, είναι μία ακόμη κατηγορία αναστολέων της τυροσινάσης. Αν και η ανασταλτική τους δράση έχει αναφερθεί και μελετηθεί από την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια, συνιστούν μία πολλά υποσχόμενη κατηγορία αναστολέων. Αυτό είναι κυρίως λόγω της ευκολότερης κυτταρικής διαπερατότητας τους που προέρχεται από την υδρόφοβη αλυσίδα τους. Κάποιες άλλες κατηγορίες αναστολέων είναι οι ανθρακινόνες και οι λιγνάνες. [34]

Ροσμαρινικό και μεθυλο-ροσμαρινικό οξύ που απομονώθηκαν από μεθανολικό εκχύλισμα *S. miltiorrhiza* βρέθηκαν ως αναστολείς του ενζύμου, δίνοντας έναυσμα για περεταίρω μελέτες που αφορούν την σχέση δομής-ανασταλτικής δράσης μιας πολυφαινόλης.[36]

Υδατικό εκχύλισμα της *S. verticillata,* συγκρινόμενο με το υδατικό εκχύλισμα της *S. euphratica var. Leiocalycina* και της *S. blepharochlaena* εμφάνισε την μεγαλύτερη αναστολή της τυροσινάσης.[33] Στην βιβλιογραφία έχουν μελετηθεί και άλλα είδη *Salvia*, συμπεριλαμβανομένου της *S. officinalis*, *S. cryptantha* και *S. cyanescens*. [37,35]

1.4 Τεχνικές εκχύλισης φυσικών προϊόντων

Ο διαχωρισμός και η παραλαβή των φυσικών προϊόντων από το φυτικό υλικό ξεκινά με την εκχύλιση, με τον πιο κοινό τρόπο εκχύλισης να είναι με την παρουσία κάποιου διαλύτη. Μια τέτοια εκχύλιση απαρτίζεται από τέσσερα στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, ο διαλύτης διεισδύει στο στερεό υλικό, δηλαδή το φυτικό υλικό και στην συνέχεια κατά το δεύτερο στάδιο οι ουσίες που περιμένουμε να παραλάβουμε διαλύονται σε αυτόν τον διαλύτη. Στο τρίτο στάδιο

διαχωρίζεται ο διαλύτης από το στερεό υλικό, ο οποίος πλέον περιέχει τους δευτερογενείς μεταβολίτες και στο τελευταίο στάδιο παραλαμβάνεται και αποθηκεύεται. Παράγοντες που συμβάλλουν στην βελτίωση της διάχυσης και της διαλυτότητας αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.[38]

Κάποιες κοινές μέθοδοι εκχύλισης είναι μεταξύ άλλων η εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά, συνήθως διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), η εμβροχή (maceration), η εκχύλιση Soxhlet, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE) και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE). [38]

1.4.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση

Η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει στην ανάλυση και μελέτη του πολικού εκχυλίσματος του είδους *S. verticillata,* το οποίο κατά κύριο λόγο όπως έχει αναλυθεί παραπάνω, περιέχει μεγάλη ποσότητα πολυφαινολών όπως και τα περισσότερα είδη *Salvia*. Λόγω του ρόλου τους στις διάφορες βιολογικές ιδιότητες του φασκόμηλου, ο τρόπος και οι συνθήκες εκχύλισης μπορούν να καθορίσουν το περιεχόμενο του εκχυλίσματος σε πολυφαινόλες. Έρευνα των Dent et al., μελετά την μεταβολή του συνολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) εκχυλισμάτων πληθυσμού του είδους *S. officinalis* από την Κροατία, με διαφορετική θερμοκρασία, διαφορετικό χρόνο εκχύλισης και διαφορετική πολικότητα διαλυτών ή συστημάτων διαλυτών. [39] Οι πολυφαινόλες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα πολικότητας, συνεπώς οι διαλύτες εκχύλισης που έχουν μελετηθεί περισσότερο για το φασκόμηλο στην βιβλιογραφία είναι το νερό, η ακετόνη, η μεθανόλη, η αιθανόλη και μείγματα αυτών, κυρίως με το νερό. [39]

1.4.1.1 Θερμοκρασία εκχύλισης

Οι πολυφαινόλες είναι μια δομικά ευαίσθητη κατηγορία ενώσεων, καθώς μπορούν να υποστούν εύκολα αποικοδόμηση της χημικής τους δομής, κυρίως λόγω υδρόλυσης, εσωτερικών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και πολυμερισμού. Σύμφωνα με την μελέτη των Dent et al., η αυξημένη θερμοκρασία εκχύλισης, στην προκειμένη περίπτωση στους 60°C, φαίνεται να δίνει μεγαλύτερο TPC εκχυλίσματος αιθανόλης/ακετόνης του είδους *S.officinalis*. Στα υδατικά εκχυλίσματα ωστόσο, το TPC φαίνεται να αυξήθηκε ελάχιστα. [39]

Αντίθετα, θερμοκρασία άνω των 60°C φαίνεται πως μειώνει την απόδοση της εκχύλισης των πολυφαινολών με διαλύτη αιθανόλη/ακετόνη. Σύμφωνα με

την βιβλιογραφία, σε άλλη μελέτη που αφορούσε εκχύλιση στους 63°C, η απόδοση μειώθηκε καθώς εκχυλίστηκαν λιγότερες πολυφαινόλες. [39]

1.4.1.2 Σύσταση εκχυλιστικού μέσου

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης πολυφαινολών του φασκόμηλου είναι ύψιστης σημασίας, καθώς καθορίζει την πολικότητα και την διαλυτότητα τους σε αυτόν. Η ακετόνη και η αιθανόλη φαίνεται να χρησιμοποιούνται συχνότερα για αυτόν τον σκοπό, με την αιθανόλη να δίνει μεγαλύτερο TPC. [39]

Γενικότερα, το νερό θεωρείται αρκετά αποτελεσματικός διαλύτης εκχύλισης πολυφαινολών, ωστόσο σε συνδυασμό με κάποιον άλλο διαλύτη φαίνεται δίνει την μέγιστη δυνατή απόδοση εκχύλισης. Συγκεκριμένα, στην βιβλιογραφία αναφέρεται πως ποσοστό αιθανόλης 30-60% είναι το ιδανικό για την εκχύλιση των φαινολικών οξέων του φασκόμηλου. Σε αυτά τα ποσοστά, η αλλαγή του διαλύτη σε μεθανόλη, ακετόνη ή ακετονιτρίλιο δεν φαίνεται να άλλαξε κατά πολύ το αποτέλεσμα. [39]

Συμπερασματικά, ένα δυαδικό σύστημα διαλυτών εκχύλισης, το οποίο θα αποτελείται από νερό και κάποιον άλλον διαλύτη, φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικό από την χρήση ενός μόνο διαλύτη. Κατά αυτόν τον τρόπο, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται, καθώς καταφέρνει να παρασύρει πολυφαινόλες με διαφορετική μεταξύ τους πολικότητα. [39]

1.4.1.3 Χρόνος εκχύλισης

Είναι προφανές πως ο χρόνος εκχύλισης δεν είναι ο μόνος παράγοντας που καθορίζει την απόδοση της εκχύλισης πολυφαινολών από το φασκόμηλο. Στην μελέτη των Dent et al., παρατηρήθηκε πως αυξανόμενου του χρόνου εκχύλισης και του ποσοστού της αιθανόλης, τόσο μεγαλύτερο ήταν το TPC. Ειδικότερα, το μεγαλύτερο TPC παρατηρήθηκε στα 90 λεπτά, και όχι στα 30 ή 60 λεπτά και μελετήθηκε τόσο στους 60°C αλλά και στους 90°C. Στην βιβλιογραφία προτείνεται επίσης πως καλό είναι ο χρόνος εκχύλισης να μην ξεπερνά τις 3 ώρες, καθώς αυξάνεται η πιθανότητα εξάτμισης του. [39]

2. Σκοπός της εργασίας

Το γένος *Salvia*, απαντάται παγκόσμια με περισσότερα από 1000 είδη. Το είδος *Salvia verticillata* L., αν και είναι από τα σπάνια είδη του γένους, φύεται στον ελλαδικό χώρο. Γενικότερα, μερικά είδη *Salvia* χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία καλλυντικών λόγω της αντιοξειδωτικής, της αντιγηραντικής και της λευκαντικής τους δράσης, ενώ δυνητικά ακόμα περισσότερα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν.

Η βιβλιογραφία για τη *S. verticillata* είναι περιορισμένη και δεν υπάρχει διαθέσιμη μελέτη που αφορά την σύσταση σε πολικούς δευτερογενείς μεταβολίτες και λιπαρά οξέα εκχυλισμάτων του αυτοφυούς *S. verticillata* από την Ελλάδα, ούτε υφίσταται κάποια μελέτη σχετική με την αντιοξειδωτική και λευκαντική δράση των πολικών εκχυλισμάτων της.

Λόγω της ταχείας ανάπτυξης της βιομηχανίας των καλλυντικών, η ανάγκη για καινούργιες πηγές πρώτων υλών αυξάνεται σημαντικά. Οι πολυφαινόλες και τα λιπαρά οξέα πρωταγωνιστούν στα διάφορα καλλυντικά σκευάσματα και σχετίζονται με πολλές ιδιότητες τους. Ακόμη, το είδος *S. verticillata* αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως το είδος *Salvia* με την μεγαλύτερη ποσότητα ροσμαρινικού οξέος, ενός δευτερογενούς μεταβολίτη ο οποίος έχει διάφορες βιολογικές ιδιότητες επιθυμητές από τη καλλυντική βιομηχανία. Συνεπώς, η ελλιπής έρευνα γύρω από την σύσταση και τις βιολογικές ιδιότητες του είδους, το καθιστούν ιδανική επιλογή για την παρούσα διπλωματική εργασία.

Συγκεκριμένα, σκοπός ήταν η φυτοχημική ανάλυση των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων και των ανθών της *Salvia verticillata* L., μέσω UPLC-DAD-ESI-MS, HPLC-DAD και LC-MS, η διερεύνηση και σύγκριση της αντιοξειδωτικής τους δράσης μέσω FRAP, DPPH, καθώς και η μελέτη της πιθανής λευκαντικής τους δράσης, λόγω αναστολής του ενζύμου της τυροσινάσης. Με σκοπό την μελέτη μεμονωμένα κάποιων δευτερογενών μεταβολιτών και των δράσεων τους, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η κλασμάτωση του εκχυλίσματος των φύλλων, πιθανές δράσεις των οποίων θα αξιολογηθούν σε δεύτερο χρόνο. Τέλος, έγινε διερεύνηση και σύγκριση των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα δύο μέρη του φυτού με GC-FID.

Με γνώμονα την φυτοχημική σύγκριση ανάμεσα στα διάφορα είδη του γένους, επιλέχθηκε πληθυσμός του είδους *S. fruticosa* από την Τήνο και μελετήθηκε ως προς την σύσταση του σε λιπαρά οξέα και πολικούς δευτερογενείς μεταβολίτες καθώς και για την αντιοξειδωτική του δράση. Αν και στο παρελθόν έχει μελετηθεί στο εργαστήριο μας πληθυσμός της *S. fruticosa* προερχόμενος από τους Φούρνους Ικαρίας και την Ροδινή Αχαΐας ως προς την σύσταση του σε πολικά μόρια, δεν έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα σχετικά με την σύσταση του σε λιπαρά οξέα και την *in vitro* αντιοξειδωτική του δράση. Επομένως, από τα αποτελέσματά μας μπορούν να εξαχθούν και συμπεράσματα σχετικά με την αξιοποίηση των ελληνικών αυτοφυών ειδών της *Salvia* από την βιομηχανία των καλλυντικών.

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Φυτικό υλικό

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν τα φύλλα και τα άνθη ενός πληθυσμού φασκόμηλου του είδους *Salvia verticillata* L., ο οποίος συλλέχθηκε από τα Καλάβρυτα, Αχαΐας τον Ιούνιο του 2019. Μετά την συλλογή του, αναγνωρίστηκε και καταχωρήθηκε στο Herbarium του Πανεπιστημίου Πατρών με κωδικό UPA 252430 από τον μεταδιδακτορικό ερευνητή κ. Άρη Ζωγραφίδη.



Εικόνα 5. Φωτογραφία και πληροφορίες της *Salvia verticillata* L. από το Herbarium του Πανεπιστημίου Πατρών

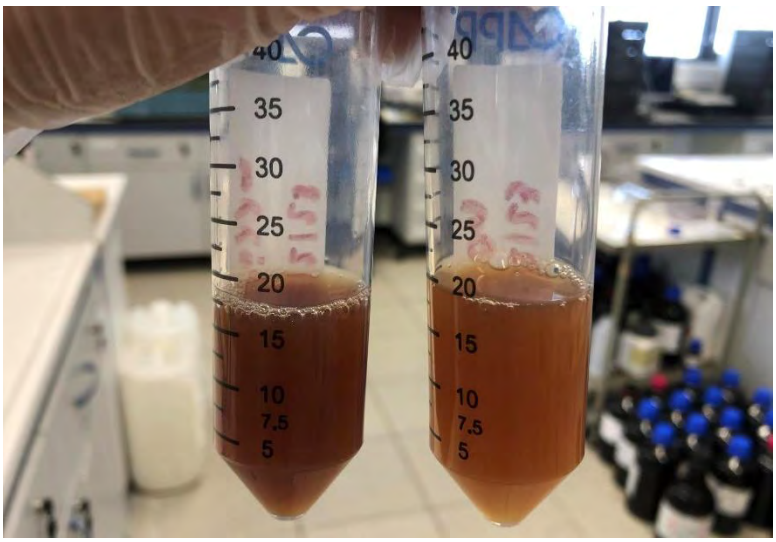
Για ερευνητικούς σκοπούς, αποφασίστηκε να αναλυθεί ένας πληθυσμός φασκόμηλου του είδους *Salvia fruticosa* Mill., ο οποίος συλλέχθηκε από το όρος Τσικνιάς στο νησί της Τήνου στις Κυκλάδες τον Ιούλιο του 2022, με σκοπό την φυτοχημική σύγκριση μεταξύ των δύο ειδών.

Τα φύλλα και τα άνθη της *Salvia verticillata* L. καθώς και τα φύλλα της *Salvia fruticosa* Mill. ξηράνθηκαν υπό ατμοσφαιρικό αέρα σε σκιερό μέρος εκτός των ακτινών του ηλίου.

3.2 Εκχύλιση με UAE

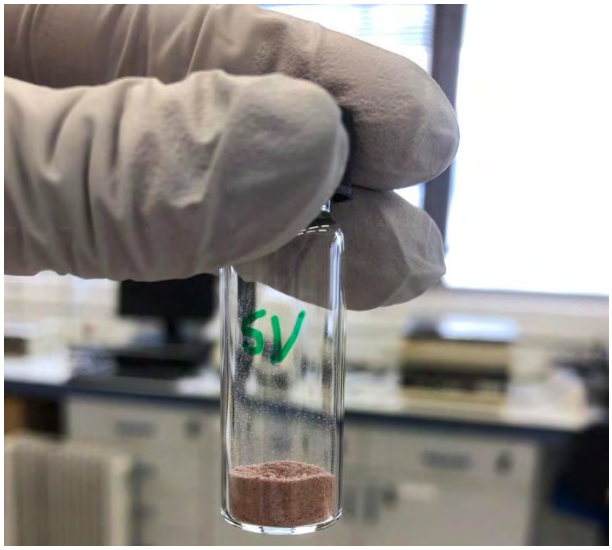
Δύο (2) g φύλλων ή ανθών κονιοποιήθηκαν σε πορσελάνινο γουδί και τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη με κάθετο ψυκτήρα μέσα σε λουτρό υπερήχων. Σε πρώτο στάδιο έγινε εκχύλιση με 20 mL πετρελαϊκού αιθέρα για 20 λεπτά με θερμοκρασία σταθερή και μικρότερη των 40° C για τρεις φορές. Μετά το πέρας κάθε εκχύλισης, το εκχύλισμα διηθούταν μέσα από ηθμό Buchner και συλλεγόταν προς ένα τελικό σύνολο 60 mL εκχυλίσματος. Το τελικό εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα ξηράνθηκε με Na_2SO_4, συμπυκνώθηκε, ζυγίστηκε και φυλάχθηκε στην κατάψυξη σε γυάλινο φιαλίδιο υπό ατμόσφαιρα αζώτου με σκοπό την μελλοντική ανάλυση του.

Σε δεύτερο στάδιο και για το φυτικό υλικό που απέμεινε μετά την πρώτη εκχύλιση, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία αλλά με διαλύτη εκχύλισης το σύστημα διαλυτών 70% μεθανόλη (MEOH) και 30% νερό (H_2O) αντί του πετρελαϊκού αιθέρα για τρεις φορές. Μετά την διήθηση σε ηθμό Buchner, το συνολικό εκχύλισμα των 60 mL συμπυκνώθηκε και στην συνέχεια ξηράνθηκε υπό κενό σε χαμηλή θερμοκρασία σε λυοφιλοποιητή της εταιρίας LABCONCO. Στην Εικόνα 6 φαίνεται το εκχύλισμα στο στάδιο πριν την λυοφιλοποίηση.



Εικόνα 6. Εκχύλισμα των φύλλων (αριστερά) και των ανθών (δεξιά) της *S. verticillata* πριν την λυοφιλοποίηση

Τέλος, το ξηρό πλέον εκχύλισμα της εικόνας 7 ζυγίστηκε και φυλάχθηκε στην κατάψυξη σε πλαστικούς περιέκτες.



Εικόνα 7. Ξηρό εκχύλισμα της *S. verticillata* μετά τη λυοφιλοποίηση

3.2.1 Υπολογισμός της απόδοσης της εκχύλισης

Για τον υπολογισμό της απόδοσης της εκχύλισης, συγκρίνεται η τελική μάζα του ξηρού εκχυλίσματος που ζυγίζεται μετά την λυοφιλοποίηση με την ακριβή αρχική μάζα ξηρού φυτού που εκχυλίστηκε, σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Το αποτέλεσμα δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση :

$$\alpha\ \% = \frac{\mu\acute{\alpha}\zeta\alpha\ \xi\eta\rho o\acute{\upsilon}\ \epsilon\kappa\chi\upsilon\lambda\acute{\iota}\sigma\mu\alpha\tau o\varsigma}{\alpha\rho\chi\iota\kappa\acute{\eta}\ \pi o\sigma\acute{o}\tau\eta\tau\alpha\ \xi\eta\rho o\acute{\upsilon}\ \phi\upsilon\tau\iota\kappa o\acute{\upsilon}\ \upsilon\lambda\iota\kappa o\acute{\upsilon}} \times 100\ \%$$

3.3 Ποιοτική ανάλυση των πολικών συστατικών των εκχυλισμάτων της *Salvia verticillata* με την τεχνική LC-MS

Η ταυτοποίηση των πολικών συστατικών των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής LC-MS. Το εκχύλισμα των φύλλων της *S. verticillata* αναλύθηκε με UPLC-DAD-ESI-MS, ενώ των ανθών της καθώς και των φύλλων της *S. fruticosa* μέσω της τεχνικής HPLC-ESI-MS.

3.3.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία

3.3.1.1 Τεχνική HPLC-ESI-MS

- ✓ Σύστημα υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματόμετρο απλού τετράπολου, πηγής ιονισμού ESI τύπου LC/MSD1260 Infinity II, κατασκευαστή Agilent Technologies Inc.
- ✓ Στήλη: Kinetex αντίστροφης φάσης, 2.6 μm Polar C18 100 Å, 100 x 3.0 mm της εταιρείας Phenomenex®.
- ✓ Διαλύτες: H_2O (LC-MS grade), ακετονιτρίλιο (ACN) βαθμού καθαρότητας LC-MS grade, μεθανόλη (MEOH) LC-MS grade,Thermo Fisher Scientific
- ✓ Φορμικό οξύ (optima LC-MS grade),Thermo Fisher Scientific
- ✓ RC Syringe Filter, διάμετρος πόρων 0,20 μm, διάμετρος 15 mm, Chromafil, Macherey-Nagel

3.3.1.2 Τεχνική UPLC-DAD-ESI-MS

- ✓ Σύστημα UPLC-DAD-MS UPLC Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) σε συνδυασμό με φασματόμετρο MS Amazon SL της εταιρίας Bruker (Billerica, MA, USA)
- ✓ Στήλη: Acclaim αντίστροφης φάσης C18 (120 Å) διαστάσεων 100 mm × 2,1 mm × 3 μm, της Thermo Fisher Scientific
- ✓ Διαλύτες: H_2O (LC-MS grade), ACN (LC-MS grade), MEOH (LC-MS grade)τηςThermo Fisher Scientific
- ✓ Φορμικό οξύ (optima LC-MS grade), Thermo Fisher Scientific
- ✓ RC Syringe Filter, διάμετρος πόρων 0,20 μm, διάμετρος 15 mm, Chromafil, Macherey-Nagel

3.3.2 Ανάπτυξη μεθόδου ανάλυσης των συστατικών των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων με HPLC-ESI-MS

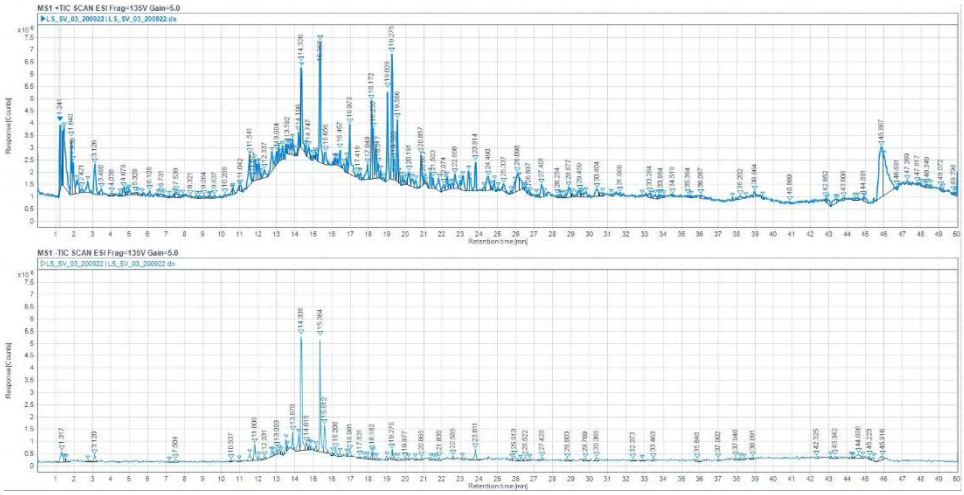
Η ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου ταυτοποίησης των φύλλων και ανθών της *S. verticillata* καθώς και των φύλλων της *S. fruticosa* ξεκίνησε σε πρώτο στάδιο μέσω της HPLC-ESI-MS με τάση ιονισμού 135 V. Χρησιμοποιώντας αυτή την τεχνική, αναπτύχθηκε μια μέθοδος που βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου για άλλα είδη φασκόμηλου.[40]

Τα εκχυλίσματα πριν την ανάλυσή τους διαλύθηκαν σε 25% (aq.) ΜΕΟΗ και διηθήκαν με φίλτρο μεγέθους πόρων 0,22 μm. Ως κινητή φάση επιλέχθηκε το σύστημα H_2O και 0,2% φορμικό οξύ (A) και ACN και 0,2 % φορμικό οξύ (B), και η έκλουση ήταν βαθμωτή με ισοκρατικά βήματα. Η στατική φάση ήταν η στήλη Kinetex Polar C18 (2.6 μm, 100 x 3.0 mm), στην οποία η θερμοκρασία ήταν 35°C.

Η ανάπτυξη της μεθόδου ξεκίνησε προσαρμόζοντας διάφορες παραμέτρους όπως η συγκέντρωση, ο όγκος του δείγματος και η ροή. Στην Εικόνα 8 φαίνεται το χρωματογράφημα θετικού και αρνητικού ιονισμού του εκχυλίσματος των φύλλων της *S. verticillata* σε συγκέντρωση 3 mg/mL, ροή 0.3 mL/ min, ένεση 10 μL με διάρκεια 50 λεπτά και η αναλυτική περιγραφή του προγράμματος έκλουσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Πρόγραμμα έκλουσης 1 για HPLC-ESI-MS σε στήλη Kinetex.

Time (min)	**A(%)** **H_2O με 0,2% φορμικό οξύ**	**B(%)** **ACN με 0,2% φορμικό οξύ**
0	94	6
5	94	6
10	70	30
22	15	85
32	15	85
35	0	100
40	0	100
45	94	6
50'	94	6

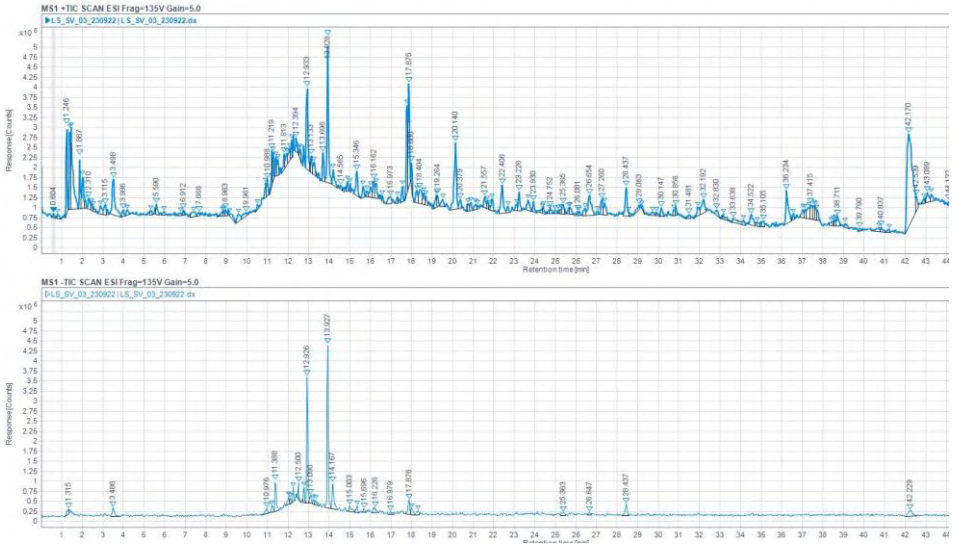


Εικόνα 8. Χρωματογράφημα θετικού (πάνω) και αρνητικού (κάτω) ιονισμού του εκχυλίσματος των φύλλων της *S. verticillata* (πρόγραμμα έκλουσης 1)

Μετέπειτα, με σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των ενώσεων, ειδικά από τα 10 έως τα 25 λεπτά του παραπάνω χρωματογραφήματος, τροποποιήθηκε το παραπάνω πρόγραμμα όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, με αποτέλεσμα το χρωματογράφημα της εικόνας 9. Σε αυτό το χρονικό περιθώριο ανιχνεύτηκαν ενώσεις όπως το ροσμαρινικό και το μεθυλο-ροσμαρινικό οξύ, που είναι από τους κύριους μεταβολίτες του γένους *Salvia*, οπότε ήταν σημαντικό να μην υπάρχει κάποια συνέκλουση.

Πίνακας 2. Πρόγραμμα έκλουσης 2 για HPLC-ESI-MS σε στήλη Kinetex.

Time (min)	**A(%)** **H_2O με 0,2% φορμικό οξύ**	**B(%)** **ACN με 0,2% φορμικό οξύ**
0	95	5
5	95	5
8	70	30
30	20	80
33	5	95
37	5	95
40	95	5
44	95	5

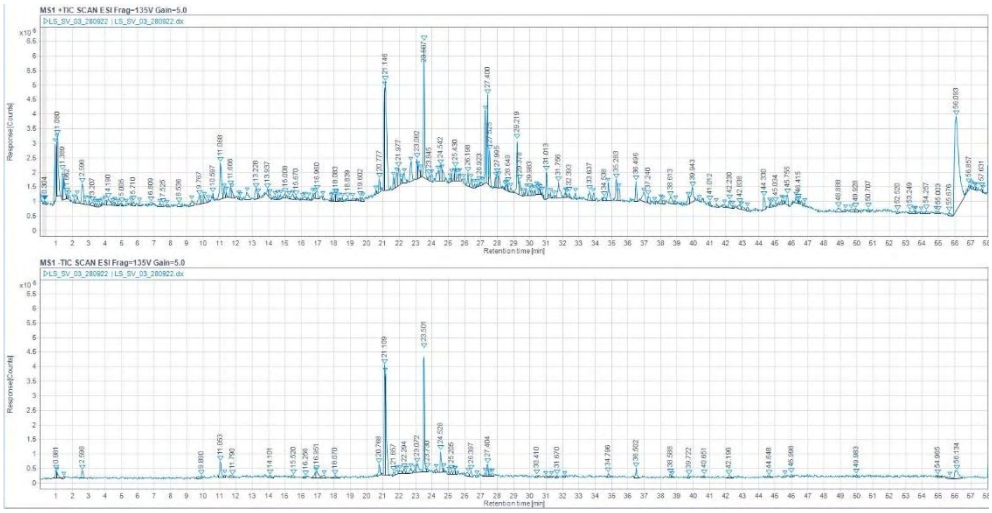


Εικόνα 9. Χρωματογράφημα θετικού (πάνω) και αρνητικού (κάτω) ιονισμού του εκχυλίσματος των φύλλων της *S. verticillata* (πρόγραμμα έκλουσης 2)

Ακόμη, δοκιμάστηκε μεγαλύτερη ροή (0.4 mL/min αντί 0.3 mL/min) με μικρές τροποποιήσεις του προγράμματος έκλουσης όπως φαίνεται στον πίνακα 3 και στην εικόνα 10. Ουσιαστικά, θελήσαμε να κάνουμε την μετάβαση από μικρότερο ποσοστό οργανικού διαλύτη σε μεγαλύτερο (8'-40'), πιο ομαλή.

Πίνακας 3. Πρόγραμμα έκλουσης 3 για HPLC-ESI-MS σε στήλη Kinetex.

Time (min)	**A(%)** **0,2% φορμικό οξύ**	**B(%)** **ACN με 0,2% φορμικό οξύ**
0	95	5
5	95	5
8	85	15
16	85	15
26	52	48
40	20	80
43	5	95
52	5	95
55	95	5
58	95	5



Εικόνα 10. Χρωματογράφημα θετικού (πάνω) και αρνητικού (κάτω) ιονισμού του εκχυλίσματος των φύλλων της *S. verticillata* (πρόγραμμα έκλουσης 3)

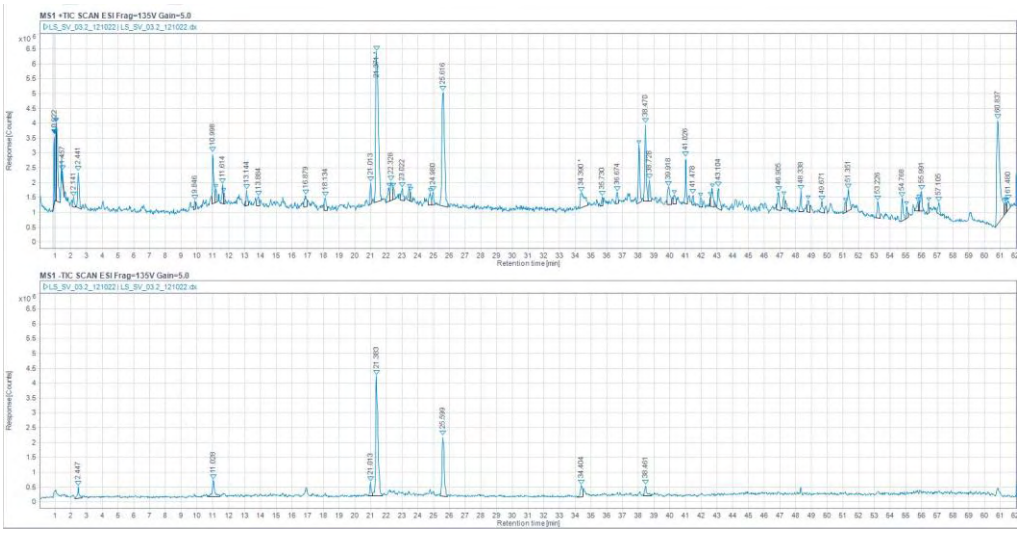
Παρατηρείται πως η αυξημένη ροή αλλά και και η ισοκρατική έκλουση στο διάστημα 8-16 λεπτά είναι σημαντικοί παράγοντες που αυξάνουν την διαχωριστική ικανότητα. Οι μεγαλύτερες κορυφές του χρωματογραφήματος, δηλαδή αυτές των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών, είναι πιο οξείες και παρατηρήθηκε πως το εξαγόμενο χρωματογράφημα των ιόντων τους (EIC) ήταν πιο καθαρό.

Το τελικό πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των συστατικών των εκχυλισμάτων της *Salvia verticillata* και της *Salvia fruticosa* φαίνεται στον πίνακα 4 και αντιστοιχεί στο χρωματογράφημα της εικόνας 11. Η ένεση ήταν 10 μL, η ροή ίση με 0.4 mL/min και η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων για τα φύλλα και άνθη της *S. verticillata* καθώς και για τα φύλλα της *S. fruticosa* ήταν 3 mg/mL.

Πίνακας 4. Πρόγραμμα έκλουσης 4 για HPLC-ESI-MS σε στήλη Kinetex.

Time (min)	**A(%)** **H_2O με 0,2% φορμικό οξύ**	**B(%)** **ACN με 0,2% φορμικό οξύ**
0	95	5
5	95	5
8	85	15
16	85	15

19	78	22
30	78	22
35	60	40
48	20	80
51	5	95
56	5	95
59	95	5
62	95	5



Εικόνα 11. Χρωματογράφημα θετικού (πάνω) και αρνητικού (κάτω) ιονισμού του εκχυλίσματος των φύλλων της *S. verticillata* (πρόγραμμα έκλουσης 4)

3.3.3 Ταυτοποίηση των ενώσεων με UPLC-DAD-ESI-MS

Η ανάλυση UPLC-DAD-ESI-MS διεξήχθη στο Κέντρο Ενόργανης Ανάλυσης του Πανεπιστημίου Πατρών και διαφοροποιήθηκε ως προς την μέθοδο που αναπτύχθηκε στην υποενότητα 3.3.2 στην ροή (0.3 mL/min αντί 0.4 mL/min), λόγω χρήσης διαφορετικής στήλης.

3.4 Χρωματογραφικός προσδιορισμός φαινολικών με την τεχνική HPLC-DAD

3.4.1. Αντιδραστήρια και οργανολογία

- ✓ Σύστημα Agilent HPLC (Series 1260, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (scan range: 190–640 nm)

- ✓ Στήλη: Kinetex αντίστροφης φάσης, 2.6 μm Polar C18 100 Å, 100 x 3.0 mm της εταιρείας Phenomenex®.
- ✓ Διαλύτες: H_2O (HPLC grade), ACN (HPLC grade), MEOH (HPLC grade), Fischer Chemical
- ✓ Φορμικό οξύ (optima LC-MS grade),Thermo Fisher Scientific
- ✓ RC Syringe Filter, διάμετρος πόρων 0,20 μm, διάμετρος 15 mm, Chromafil, Macherey-Nagel
- ✓ Πρότυπη ένωση HPLC ροσμαρινικού οξέος (≥95%), Phytolab
- ✓ Πρότυπη ένωση HPLC 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (≥95%), Phytolab

3.4.2 Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου

Η ποσοτικοποίηση των κύριων συστατικών των πολικών εκχυλισμάτων των φύλλων και των ανθών της *S. verticillata* καθώς και των φύλλων της *S. fruticosa* έγινε με την τεχνική HPLC-DAD, σύμφωνα με την αναλυτική μέθοδο που αναφέρεται στον πίνακα 4. Επιλέχθηκαν εξωτερικά πρότυπα τα οποία αντιπροσωπεύουν τις κύριες ομάδες ενώσεων που περιέχονται στα εκχυλίσματα και κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης για το ροσμαρινικό οξύ (280 nm και τον 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (330 nm) όπως φαίνεται στον πίνακα 5, αντιπροσωπεύοντας τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το ροσμαρινικό οξύ και τον 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης ήταν 5.0, 10.0, 15.6, 31.3, 46.9, 62.5, 93.8, και 150.0 μg/mL, και 4.0, 8.0, 12.5, 25.0, and 37.5 μg/mL, αντίστοιχα.

Πίνακας 5. Καμπύλες βαθμονόμησης του ροσμαρινικού οξέος και του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης

Πρότυπη ένωση	**Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης (nm)**	**Εύρος συγκεντρώσεων (μg/mL)**	**Καμπύλη βαθμονόμησης**	**R^2**
Ροσμαρινικό οξύ	280	5.0-150.0	y=22.783x + 7.7307	0.9917
7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	330	4.0-37.5	y=38.87x-117.11	0.9955

Για λόγους επικύρωσης της αναλυτικής μεθόδου, αποφασίστηκε να υπολογιστούν τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης (LLOD) και ποσοτικοποίησης (LLOQ) για την ποσοτικοποίηση του ροσμαρινικού οξέος και του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης. Αυτά καθορίστηκαν μέσω δύο αναλυτικών παραμέτρων, το σ (τυπική απόκλιση) και το φ (κλίση μιας γραμμικής παλινδρόμησης), σύμφωνα με τη σχέση LLOD = 3.3 × σ/φ και LLOQ = 10 × σ/φ. [41]

3.5. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων των φύλλων και των ανθών της *Salvia verticillata* με την τεχνική GC-FID

3.5.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία

- ✓ GC-FID Agilent Technologies Inc., μοντέλο 7890A
- ✓ DB-WAX capillary column (10 m × 0.1 mm × 0.1 μm)
- ✓ Υδατόλουτρο
- ✓ Vortex
- ✓ Μεθανόλη, Sigma-Aldrich, HPLC grade
- ✓ Χλωροφόρμιο, Sigma-Aldrich, 99.0-99.4 % (GC)
- ✓ H_2O (HPLC grade) Fischer Chemical
- ✓ Πυκνό θειικό οξύ
- ✓ Εξάνιο, Sigma-Aldrich, ≥ 95%-Quantification
- ✓ WHATMAN, Nylon, 0.2 μm filters

3.5.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

Η μέθοδος βασίζεται στην μετεστεροποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων του εκχυλίσματος παρουσία μεθανόλης σε υψηλή θερμοκρασία (90°C) και στην μετέπειτα ανάλυση τους μέσω αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID). Ταυτόχρονα, το θειικό οξύ χρησιμοποιείται για την υδρόλυση της βιομάζας και το χλωροφόρμιο για την διάλυση των λιπαρών οξέων.[42]

Οπότε, απαραίτητη ήταν η χρήση ενός αντιδραστηρίου χώνευσης που αποτελείται από MeOH : $CHCl_3$: H_2SO_4 σε αναλογία όγκων 100 : 10 : 3.

Προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη ποσότητα ξηρού φυτού για την ανίχνευση των λιπαρών οξέων, έγινε δοκιμή του παρακάτω πρωτοκόλλου σε 20, 80 και 100

mg φυτικού υλικού. Τα 80 mg βρέθηκαν ως η βέλτιστη ποσότητα για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία.

Οπότε, 80 mg ξηρού φυτικού υλικού τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται 5 mL αντιδραστηρίου χώνευσης. Έπειτα γίνεται ανάδευση υπό vortex και επώαση στο υδατόλουτρο για 2 ώρες. Κατά την διάρκεια των 2 ωρών, κάθε 10 λεπτά το περιεχόμενο αναδεύεται υπό vortex και τοποθετείται ξανά για επώαση στο υδατόλουτρο. Μετά το πέρας των 2 ωρών, και αφού τα δείγματα έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 2 mL H_2O (HPLC grade) με σκοπό τον τερματισμό της αντίδρασης.

Έπειτα, προστίθενται 2 mL διαλύματος εξανίου: χλωροφορμίου (C_6H_{14} : $CHCl_3$) σε αναλογία 4 : 1, v/v, και αναδεύεται το μίγμα της αντίδρασης υπό vortex. Μετά από λίγο γίνεται ανάκτηση της άνω φάσης (εξάνιο) με πιπέτα Pasteur και φυλάσσεται σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται συνολικά τρεις φορές προς τελικό όγκο 6 mL εξανίου. Τελικά, 1 mL αυτού φιλτράρεται και τοποθετείται σε γυάλινο περιέκτη κατάλληλο για ανάλυση με GC-FID. Η παραπάνω πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε για 3 βιολογικά δείγματα (n=3)από κάθε υλικό, δηλαδή των φύλλων και των ανθών της *S. verticillata,* καθώς και των φύλλων της *S. fruticosa*.

Η αρχική θερμοκρασία του προγράμματος ανάλυσης GC-FID ρυθμίζεται στους 40˚C. Στη συνέχεια ανεβαίνει στους 195 ˚C με ρυθμό 25˚C/ min, από τους 195˚C στους 205˚C με ρυθμό 3 ˚C/min και τέλος από τους 205˚C στους 230˚C με ρυθμό 8˚C/min όπου και παρέμεινε για 1 λεπτό. Το φέρον αέριο ήταν το Ήλιο (Helium). Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ρυθμίστηκε στους 205˚C και η ένεση ήταν 1 μL με split ratio 1: 30.[42]

Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω δεδομένων που έχουν προκύψει από παλαιότερες αναλύσεις στο εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών, όπου και πραγματοποιήθηκαν τα παραπάνω πειράματα.

Η ποσοτικοποίηση των λιπαρών οξέων των εκχυλισμάτων των φύλλων και των ανθών της *S. verticillata* καθώς και των φύλλων της *S. fruticosa*, βασίστηκε στην ανάλυση ενός προτύπου μείγματος εστεροποιημένων λιπαρών οξέων, το

FAME (Fatty Acids Methyl Ester) Reference Standard, FAMQ-005 της εταιρίας AccuStandard. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τμήματος Χημικών Μηχανικών.

Το παραπάνω πρότυπο είναι εμπορικά διαθέσιμο και περιέχει 37 εστεροποιημένα λιπαρά οξέα σε συγκεκριμένες ποσότητες καθιστώντας εύκολη και ακριβή την ποσοτικοποίηση αντίστοιχων μορίων.



Εικόνα 12. Εκχύλισμα φύλλων της *S. verticillata* μετά το πέρας των δύο ωρών σε υδατόλουτρο και πριν την προσθήκη νερού για τον τερματισμό της αντίδρασης εστεροποίησης των λιπαρών οξέων.

3.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

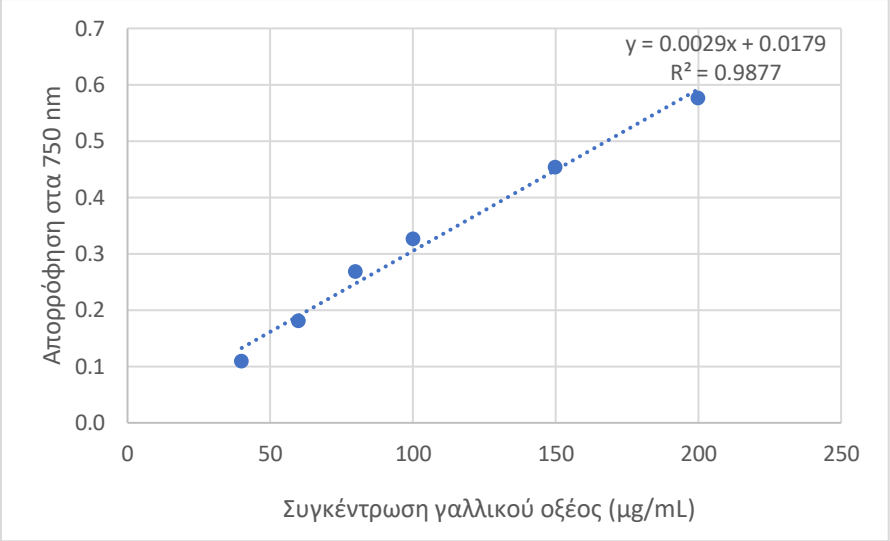
3.6.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία

- ✓ Folin-Ciocalteu,'s Reagent for clinical diagnosis, Applichem PanReac
- ✓ Άνυδρο ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3), ChemLab NV
- ✓ H_2O (HPLC grade), Fischer Chemical
- ✓ Γαλλικό οξύ, Fluka
- ✓ Sunrise® microplate reader, TECAN Trading AG (Männedorf, Switzerland)
- ✓ Πλάκα 96 κελίων

3.6.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

Η ποσοτική ανάλυση του περιεχομένου των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, σύμφωνα με πρωτόκολλο που είχε αναπτυχθεί παλαιότερα στο εργαστήριο, βασισμένο στη μελέτη των Singleton et al., 1965 [43]. Αυτή η μέθοδος, αν και μη εκλεκτική, είναι η πιο διαδεδομένη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα και βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών από το αντιδραστήριο FOLIN, με ταυτόχρονη αναγωγή του, που οδηγεί στον σχηματισμό έγχρωμων προϊόντων. Αυτά τα προϊόντα προσδιορίζονται φωτομετρικά με τη μέτρηση της απορρόφησης τους στα 750 nm και εκφράζονται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (θετικό control).

Σε πλάκα τύπου ELISA 96 κελίων, προσθέτουμε 20 μL εκχυλίσματος συγκέντρωσης 450 και 750 μg/mL (σε H_2O), όπως προέκυψε μετά από δοκιμές, ή προτύπου γαλλικού οξέος σε εύρος συγκεντρώσεων 15-250 μg/mL (σε H_2O), με 180 μL H_2O (for analysis), 20 μL αντιδραστηρίου Folin–Ciocalteu (αραίωση 1:10) και 20 μL ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 (13,75%). Το μείγμα επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και στη συνέχεια μετρείται η απορρόφηση του στα 750 nm. Για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (Εικόνα 13), η οποία χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς. Τα αποτελέσματα της απορρόφησης των εκχυλισμάτων εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά g ξηρού εκχυλίσματος. Το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για τα φύλλα και τα άνθη της *S. verticillata* καθώς και για τα φύλλα της *S. fruticosa* με τρεις επαναλήψεις και για 3 βιολογικά υποδείγματα αντίστοιχα.



Εικόνα 13. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

3.7 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε μέσω δύο τεχνικών, την μέθοδο FRAP και ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο της μεθόδου DPPH των Brand-Williams, W. et al.[44,45]

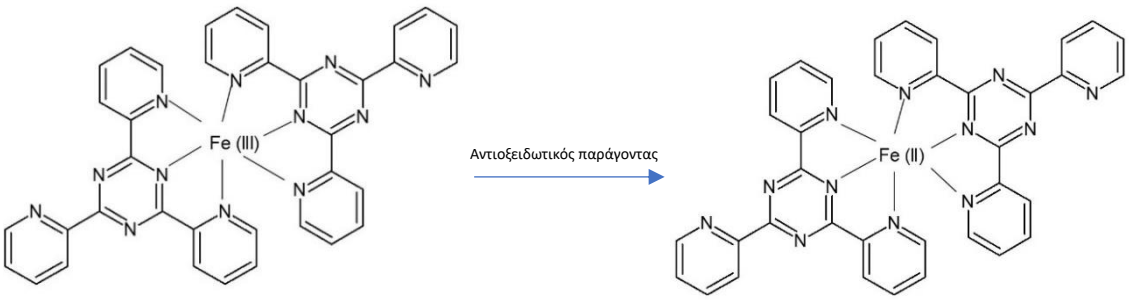
3.7.1 Μέθοδος FRAP

3.7.1.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία

- ✓ Οξικό νάτριο τριένυδρο, Merck
- ✓ Οξικό οξύ, Honeywell Fluka
- ✓ H_2O (HPLC grade), Fischer Chemical
- ✓ Υδροχλωρικό οξύ, HCl, Penta Pharmaceuticals
- ✓ TPTZ: 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine, Alfa Aesar
- ✓ $FeCl_3x6H_2O$ (BDH), Acros Organics 99+% for analysis
- ✓ $FeSO_4.7H_2O$, Riedel-deHaen
- ✓ pHμετρο Consort C830
- ✓ Μαγνητικός αναδευτήρας Wisd Laboratory instruments MSH-20A
- ✓ Sunrise® microplate reader, TECAN Trading AG (Männedorf, Switzerland)
- ✓ Πλάκα 96 κελίων

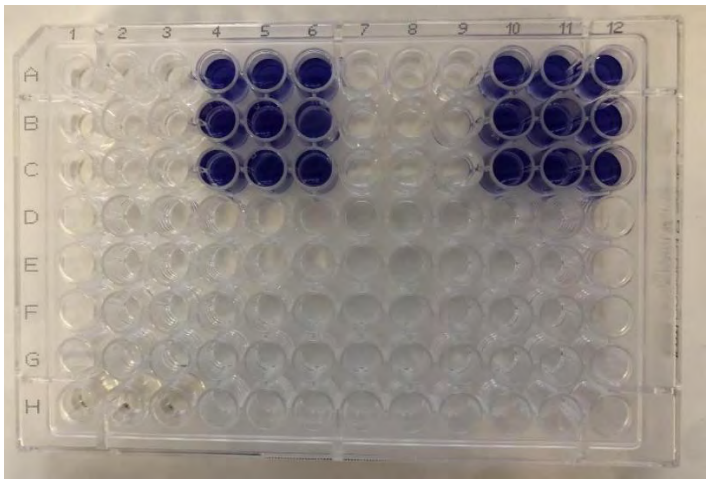
3.7.1.2 Πειραματικό πρωτόκολλο μεθόδου FRAP

Η μέθοδος ελέγχου της αντιοξειδωτικής δράσης FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay) αφορά την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου του συμπλόκου (Fe^{3+} -TPTZ [2,4,6-τρι-(2-πυριδυλο)-s-τριαζίνη] λόγω παρουσίας αντιοξειδωτικού παράγοντα, σε όξινες συνθήκες, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση [44]:



Εικόνα 14. Αναγωγή του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου παρουσία αντιοξειδωτικού παράγοντα

Το τελικό προϊόν της αντίδρασης, δηλαδή το σύμπλοκο του δισθενούς σιδήρου, εμφανίζει χαρακτηριστικό μπλε χρώμα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15, πράγμα που επιβεβαιώνει ότι το εκάστοτε εκχύλισμα έχει αντιοξειδωτική δράση.

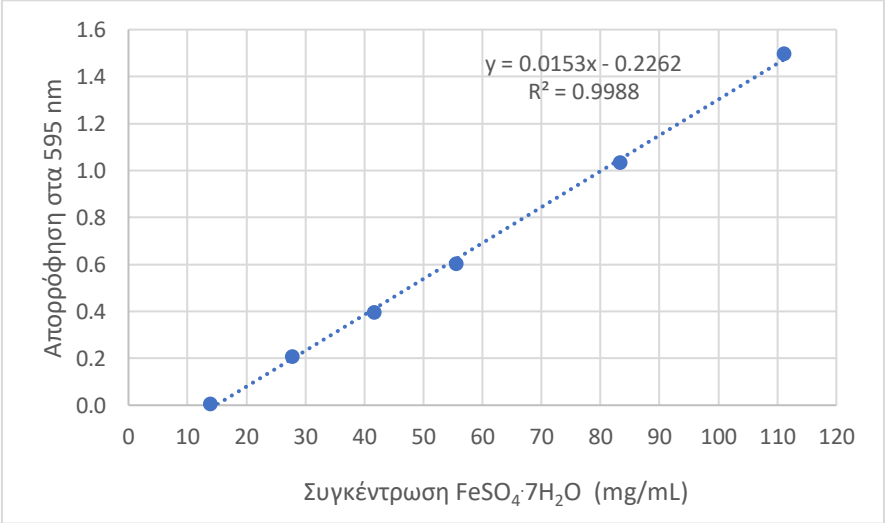


Εικόνα 15. Πλάκα 96 κελίων μετά από επώαση 5 min με τη μέθοδο FRAP

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων παρασκευάστηκαν 5 διαλύματα. Το πρώτο είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα οξικών(Acetate Buffer) 300 mM με pH 3.6 (Δ1), το δεύτερο διάλυμα ένα δ/μα HCl 40 mM (Δ2), το τρίτο ένα διάλυμα TPTZ 10 mM διαλυμένο στο διάλυμα πυκνού

HCl (Δ3), το τέταρτο ένα διάλυμα $FeCl_3x6H_2O$ (20 mM σε νερό (Δ4) και το πέμπτο είναι το διάλυμα FRAP που περιλαμβάνει τα διαλύματα 1, 3 και 4 σε αναλογία 5:1:1, v/v/v. Σε πλάκα 96 κελίων προσθέτουμε 55 μL ρυθμιστικού διαλύματος, 80 μL διαλύματος FRAP και 60 μL δείγματος ή προτύπου.

Μετά από σχετική διερεύνηση για το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα συγκέντρωσης 0,075, 0,060, 0,045 mg/ mL (σε H_2O), ενώ ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ σε εύρος συγκεντρώσεων 13,9-111,2 mg/mL (σε H_2O), καταλήγοντας στην πρότυπη καμπύλη της Εικόνας 16. Η πλάκα παρέμεινε σε ηρεμία για 5 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση της στα 595 nm. Το αποτέλεσμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων εκφράστηκε σε ισοδύναμα mg $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ ανά g ξηρού εκχυλίσματος. Το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για τα φύλλα και τα άνθη της *S. verticillata* καθώς και για τα φύλλα της *S. fruticosa* με τρεις επαναλήψεις και για 3 βιολογικά υποδείγματα αντίστοιχα.



Εικόνα 16. Πρότυπη καμπύλη $FeSO_4{\cdot}7H_2O$

3.7.2 Μέθοδος DPPH

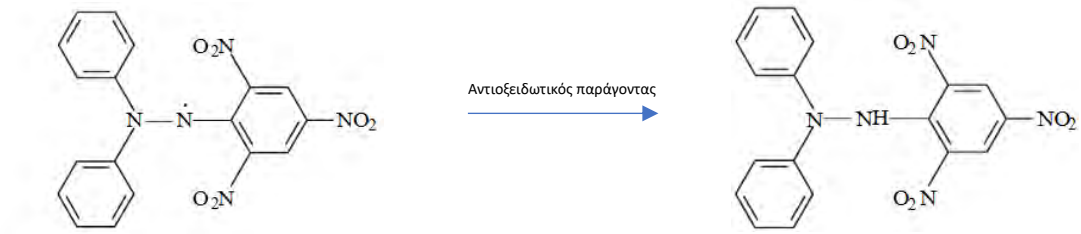
3.7.2.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία

- ✓ DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma Aldrich
- ✓ MeOH HPLC grade Fisher Chemical
- ✓ Butylated Hydroxytoluene (BHT), 97%, Sigma Aldrich

- ✓ H_2O (HPLC grade) Fischer Chemical
- ✓ Sunrise® microplate reader, TECAN Trading AG (Männedorf, Switzerland)
- ✓ Πλάκα 96 κελίων

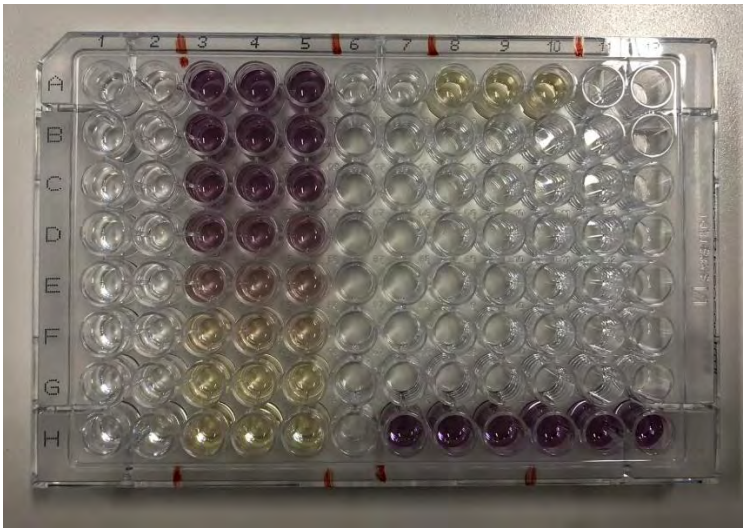
3.7.2.2 Πειραματικό πρωτόκολλο μεθόδου DPPH

Η μέθοδος DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) αφορά την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών DPPH από δότες Η, δηλαδή τα εκάστοτε αντιοξειδωτικά μόρια που περιέχονται σε ένα εκχύλισμα, με αποτέλεσμα την αναγωγή αυτών των ριζών όπως φαίνεται και στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17. Αναγωγή ελευθέρων ριζών DPPH παρουσία αντιοξειδωτικού παράγοντα

Η αναγωγή συνοδεύεται από την αλλαγή του μωβ χαρακτηριστικού χρώματος της ρίζας προς πορτοκαλί και κίτρινο όπως φαίνεται και στην Εικόνα 18, πράγμα που σημαίνει πως υπάρχει δέσμευση ελευθέρων ριζών DPPH, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη αντιοξειδωτικών παραγόντων. [45]



Εικόνα 18. Πλάκα 96 κελίων μετά από επώαση 30 min με τη μέθοδο DPPH

Λόγω υψηλής αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του φασκόμηλου, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση με σκοπό να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση

του αντιδραστηρίου αναλογικά με την συγκέντρωση του εκχυλίσματος, καταλήγοντας σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο των Brand-Williams, W. et al.[48]Τελικά, σε πλάκα τύπου ELISA 96 κελίων, προσθέτουμε 100 μL δείγματος ή προτύπου και στην συνέχεια 100 μL αντιδραστηρίου DPPH διαλυμένο σε μεθανόλη με συγκέντρωση 0,3 mM. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) σε εύρος συγκεντρώσεων 10-225 μg/mL (σε ΜΕΟΗ) ενώ για το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα σε εύρος συγκεντρώσεων 1,25-100 μg/ mL (σε 70 % aq. ΜΕΟΗ). Η πλάκα επωάστηκε για 30 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm. Το παραπάνω πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σε εκχυλίσματα των φύλλων και των ανθών της *S. verticillata* καθώς και των φύλλων της *S. fruticosa* με τρεις επαναλήψεις και για 3 βιολογικά υποδείγματα αντίστοιχα.

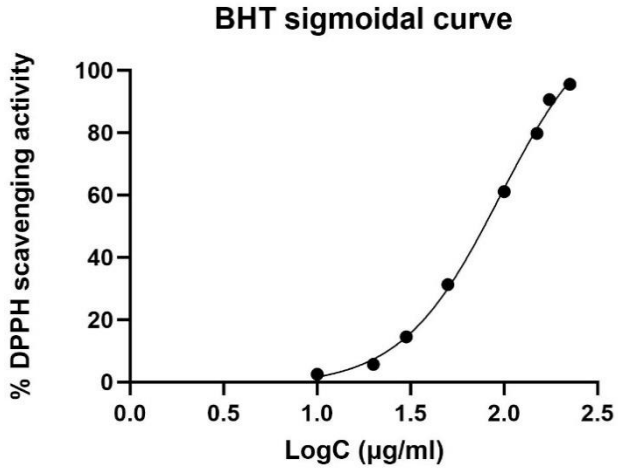
Σύμφωνα με την μέθοδο DPPH, η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος εκφράζεται με βάση την ικανότητα του να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες DPPH και υπολογίζεται με βάση την εξίσωση :

$$\% \text{ RSA} = [1 - (\text{Asample} - \text{Ablank})/(\text{Acontrol} - \text{Ablank})] \times 100$$

Όπου:

- ✓ Ablank = η απορρόφηση του τυφλού, απουσία δείγματος ή προτύπου
- ✓ Acontrol = η απορρόφηση απουσία του DPPH
- ✓ Asample = η απορρόφηση του δείγματος ή του προτύπου

Με την βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), υπολογίστηκε η τιμή IC_{50}, δηλαδή η συγκέντρωση του εκχυλίσματος ή του προτύπου που απαιτείται ώστε να προκαλέσει την 50 % αναστολή της δράσης των ελευθέρων ριζών DPPH. Στην Εικόνα 19 φαίνεται η σιγμοειδής καμπύλη της ένωσης αναφοράς (BHT) που πιστοποιεί την αξιοπιστία του εφαρμοζόμενου πρωτοκόλλου.



Εικόνα 19. Σιγμοειδής καμπύλη Butylated Hydroxytoluene (BHT)

3.8 Διερεύνηση της λευκαντικής δράσης των πολικών εκχυλισμάτων των φύλλων της *Salvia verticillata* μέσω της αναστολής του ενζύμου της τυροσινάσης

3.8.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία

- ✓ H_2O (HPLC grade) Fischer Chemical
- ✓ Na_2HPO_4, Applichem
- ✓ $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, Penta Pharmaceuticals
- ✓ Τυροσινάση (Tyrosinase from mushroom), 25KU, lyophilized powder, Sigma Aldrich
- ✓ L-Tyrosine, Sigma Aldrich
- ✓ Κοζικό οξύ, analytical standard, Sigma Aldrich, 98.5 %, Sigma Aldrich
- ✓ pHmeter Consort C830
- ✓ Μαγνητικός αναδευτήρας, Wisd Laboratory instruments MSH-20A
- ✓ Sunrise® microplate reader, TECAN Trading AG (Männedorf, Switzerland)
- ✓ Πλάκα 96 κελίων

3.8.2 Πειραματικό πρωτόκολλο αναστολής του ενζύμου της τυροσινάσης

Μία τέτοια πειραματική πορεία είναι αρκετά περίπλοκη λόγω του ενζύμου και επηρεάζεται πολύ εύκολα από συνθήκες όπως η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του εξεταζόμενου εκχυλίσματος, η αναλογία συγκέντρωσης ενζύμου-εκχυλίσματος, η διάρκεια επώασης και η θερμοκρασία. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι πρέπει να γίνεται έλεγχος και του ίδιου του εκχυλίσματος για πιθανή δράση ως εναλλακτικό υπόστρωμα του ενζύμου, καθώς σύμφωνα με τους Mayr et al., 2019 [46], πολλές από τις ενώσεις που περιέχονται στα φυτικά εκχυλίσματα είναι πιθανό να οξειδωθούν με τον ίδιο τρόπο που οξειδώνεται το εν λόγω υπόστρωμα του πρωτοκόλλου, η L-τυροσίνη. Τότε, τα προϊόντα οξείδωσης του εκχυλίσματος ενδεχομένως να απορροφήσουν στο μήκος κύματος που απορροφά το «κανονικό» προϊόν που προέρχεται από την αντίδραση της τυροσινάσης με την L-τυροσίνη, δηλαδή η ντοπακινόνη και ψευδώς να μην γίνει εμφανής κάποια πιθανή αναστολή που μπορεί να προέρχεται από κάποιες άλλες ενώσεις. Για να ελεγχθεί αυτό παρακολουθήσαμε την πορεία της αντίδρασης με το χρόνο χωρίς να προσθέσουμε L-τυροσίνη σύμφωνα με την πειραματική πορεία που θα αναλυθεί στην συνέχεια.

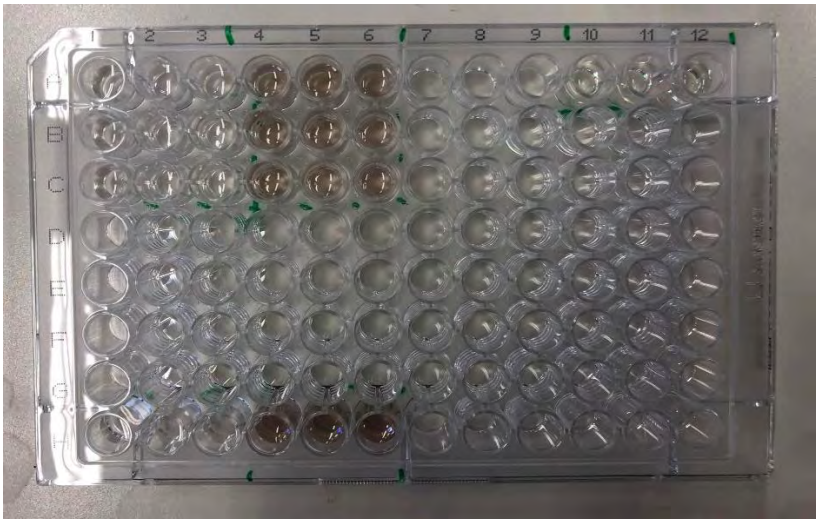
Με βάση το διαθέσιμο πρωτόκολλο του εργαστηρίου για την αναστολή της τυροσινάσης, το οποίο είχε αναπτυχθεί στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας της Αγάπης Τριανταφύλλου, έγιναν προσπάθειες αναπροσαρμογής του για το εκχύλισμα των φύλλων της *S. verticillata αλλάζοντας* διάφορες παραμέτρους.

Αρχικά, στο πρωτόκολλο είχε γίνει διερεύνηση του κατάλληλου χρόνου επώασης της πλάκας πριν την μέτρηση της απορρόφησης, παίρνοντας μετρήσεις κάθε 10 λεπτά κατά την διάρκεια 60 λεπτών. Από το παραπάνω είχε προκύψει ότι ο κατάλληλος χρόνος για να μετρήσουμε την αναστολή του ενζύμου από ένα φυτικό εκχύλισμα ήταν μετά από 30 λεπτά επώασης. Αυτό προέκυψε καθώς παρατηρήθηκε η πορεία του ενζύμου και του υποστρώματος απουσία αναστολέα, μέσω της σχέσης απορρόφησης-χρόνου. Έτσι, η απορρόφηση αυξανόταν ραγδαία μέχρι και τα 30 λεπτά, ενώ κοντά στα 40 λεπτά έφτασε την γραμμική περιοχή, υποδεικνύοντας πως μεγάλο μέρος της τυροσίνης είχε οξειδωθεί πλέον σε ντοπακινόνη. Το παραπάνω ελέχθηκε και στην παρούσα διπλωματική εργασία, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει όποια άλλη προσαρμογή των παραμέτρων της πειραματικής πορείας.

Πριν καταλήξουμε στις τελικές συνθήκες τις αντίδρασης έγινε διερεύνηση της κατάλληλης συγκέντρωσης του ενζύμου (250,500,700 υ/mL), της σειράς με την οποία προστίθενται τα αντιδραστήρια και της αναλογίας μεταξύ τους.

Εν τέλει, σε πλάκα τύπου ELISA 96 κελίων, προστέθηκαν 80 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος συγκέντρωσης 0.1 Μ και pH=6,8, 20 μL δείγματος ή πρότυπης ένωσης (κοζικό οξύ συγκέντρωσης=3,6,25,50,100,150,200 μg/mL) και 20 μL τυροσινάσης μανιταριού διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος με τελική συγκέντρωση ενεργότητας 500 υ/mL. Το μείγμα επωάστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια προστέθηκαν 100 μL L-τυροσίνης 1 mM. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 492 nm, κάθε 5 λεπτά και κατά την διάρκεια 60 λεπτών.

Στην πλάκα προστέθηκε και το «τυφλό» της αντίδρασης με το εκχύλισμα, δηλαδή το μείγμα της αντίδρασης δεν περιείχε τυροσινάση, με σκοπό να μετρηθεί η απορρόφηση του δείγματος και του υποστρώματος και να αφαιρεθεί από αυτό του μείγματος της αντίδρασης με το εκχύλισμα, καθώς και το «τυφλό» της καθαρής αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος, δηλαδή η απορρόφηση της L-τυροσίνης με ρυθμιστικό διάλυμα και να αφαιρεθεί από αυτό του μείγματος της καθαρής αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος. Στην Εικόνα 20, με την προσθήκη του εκχυλίσματος το χρώμα της αντίδρασης είναι λιγότερο έντονο (πάνω), επομένως η προσθήκη του πράγματι ανέστειλε την δράση του ενζύμου.



Εικόνα 20. Πλάκα 96 κελίων του μείγματος τυροσίνη-τυροσινάση-εκχύλισμα (πάνω) και της καθαρής αντίδρασης τυροσίνης-τυροσινάσης (κάτω) μετά από επώαση 60 min

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, προκειμένου να γίνει έλεγχος αν το εκχύλισμα δρα ως εναλλακτικό υπόστρωμα του ενζύμου, το εκχύλισμα επωάστηκε με τυροσινάση απουσία του υποστρώματος της L-τυροσίνης. Στην θέση αυτής για λόγους αναλογίας της αντίδρασης προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 492 nm.

Με βάση το διάγραμμα απορρόφησης-χρόνου για το διάστημα των 60 λεπτών εξήχθησαν τα αποτελέσματα της αντίδρασης, παρατηρώντας μεταβολές στην απορρόφηση.

Η % αναστολή της δράσης της τυροσινάσης υπολογίστηκε από την εξίσωση :

Tyrosinase inhibition (%) = [($A_{L\text{-}Tyr}$ - $A_{extract}$) / $A_{L\text{-}Tyr}$] x 100

Όπου $A_{L\text{-}Tyr}$ η απορρόφηση της τυροσινάσης με την τυροσίνη, χωρίς την παρουσία εκχυλίσματος, $A_{extract}$ η απορρόφηση του μείγματος αντίδρασης, που περιέχει ένζυμο, υπόστρωμα και εκχύλισμα (από την οποία έχει αφαιρεθεί το τυφλό). Επιπλέον υπολογίστηκε η IC_{50} του κοζικού οξέος που προκαλεί 50% αναστολή, με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 6.0.

3.9 Προσπάθειες κλασμάτωσης των πολικών εκχυλισμάτων των φύλλων της *Salvia verticillata*

Λόγω της ποικιλίας των δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχονται στα φυτικά εκχυλίσματα η κλασμάτωση και ο διαχωρισμός τους καθίσταται περίπλοκη διαδικασία. Για αυτόν τον λόγο, επιλέχθηκαν τα στηλάκια Strata-X-AW και Strata-X.

Τέτοιου είδους στηλάκια καταφέρνουν μια στερεής φάσης εκχύλιση ή SPE (Solid Phase Extraction), η οποία κατέχει πολλαπλά πλεονεκτήματα. Αρχικά, οι αναλύτες αφού προσροφηθούν από το υλικό πλήρωσης, αποσυντίθενται πολύ δύσκολα. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν ακόμη και να αποθηκευτούν χωρίς να αλλάξει η σύσταση του δείγματος προς κλασμάτωση. Επιπλέον, η SPE μπορεί να εκχυλίσει πολλών ειδών διαφορετικούς αναλύτες.

Στις SPE ανάστροφης φάσης μπορεί να γίνει εκχύλιση καθόλου πολικών μέχρι πολύ πολικών αναλυτών, από μια ποικιλία δειγμάτων. Στις SPE ασθενούς ανταλλαγής ανιόντων, οι αναλύτες είναι εκ φύσεως ισχυρά οξέα ή ισχυρές βάσεις, δημιουργώντας ασθενή «πρόσδεση» με το θετικά φορτισμένο υλικό πλήρωσης με σκοπό την μετέπειτα απομάκρυνση τους. [47]

Τέλος, λόγω της μικρής ποσότητας διαλυτών που χρησιμοποιούνται κατά την πειραματική διαδικασία αποφεύγονται μεγάλης κλίμακας τοξικά απόβλητα, που σε άλλη περίπτωση θα προερχόντουσαν από μια εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE ή Liquid-Liquid Extraction). [47]

Αυτού του είδους ο διαχωρισμός αποτελείται από πέντε βήματα. Το πρώτο είναι η προετοιμασία του υλικού πλήρωσης (conditioning), κατά την οποία αφαιρείται ο εγκλωβισμένος αέρας που ενδεχομένως βρίσκεται ανάμεσα στα σωματίδια του υλικού πλήρωσης και ενεργοποιούνται τα μόρια «προσδέτες» στην επιφάνεια αυτών. Ο διαλύτης που έχει επιλεχθεί προσροφάται από την στήλη, επιτρέποντας στο περιεχόμενο της να αλληλοεπιδράσει αποτελεσματικά με τον αναλύτη-στόχο.

Επόμενο βήμα είναι η εξισορρόπηση (equilibration) της στήλης με κατάλληλο διάλυμα, με σκοπό την μεγαλύτερη δυνατή αλληλεπίδραση με τον αναλύτη-στόχο.

Έπειτα, γίνεται το «φόρτωμα» (load) του δείγματος στην στήλη. Αυτό το βήμα γίνεται αργά, καθώς θέλουμε να αλληλεπιδράσει ο αναλύτης-στόχος με το περιεχόμενο της στήλης αποτελεσματικά. Άλλα μόρια που ενδεχομένως βρίσκονται στο δείγμα δεν θα αλληλοεπιδράσουν οπότε θα απομακρυνθούν στο επόμενο βήμα.

Κατά το επόμενο βήμα, αυτό της πλύσης (wash), κατάλληλος διαλύτης ή διάλυμα το οποίο θα απομακρύνει τα μόρια τα οποία δεν αλληλεπίδρασαν στο προηγούμενο βήμα με το υλικό πλήρωσης, αφήνεται να περάσει από την στήλη, ασκώντας όμως τώρα πίεση. Αυτό το βήμα, ανάλογα με το περιεχόμενο του δείγματος μπορεί να γίνει πάνω από μία φορά.

Τέλος, αφού απομακρύνουμε τυχόν υπολείμματα διαλύτη ασκώντας πίεση, προσθέτουμε κατάλληλο διάλυμα που στοχεύει στην απελευθέρωση και απομάκρυνση του αναλύτη-στόχου (elute) από τα σωματίδια του υλικού πλήρωσης, τα οποία στην συνέχεια παραλαμβάνονται με σκοπό την ανάλυση τους.

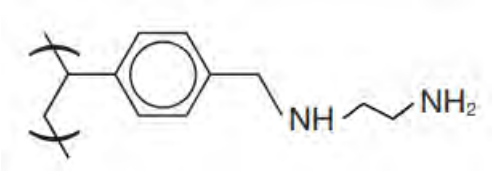
Στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας γίνεται και μία προεργασία (pre-treatment) του ξηρού εκχυλίσματος, διαλύοντας το στον κατάλληλο διαλύτη για το κάθε υλικό πλήρωσης.

3.9.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία

- ✓ Διαλύτες: H_2O (LC-MS grade), ACN (LC-MS grade), MEOH (LC-MS grade), Thermo Fisher Scientific
- ✓ Sodium Acetate anhydrous (CH_3COONa), Panreac Quimica SA
- ✓ Οξικό οξύ (CH_3COOH glacial), Thermo Fisher Scientific
- ✓ Φορμικό οξύ (optima LC-MS grade),Thermo Fisher Scientific
- ✓ Υδροξείδιο του αμμωνίου (NH_4OH), Penta Pharmaceuticals
- ✓ Strata-X-AW SPE, Polymeric Weak Anion Exchange Phase (200 mg/ 3mL, 33 μm, 85 Å), Phenomenex
- ✓ Strata-X SPE, Polymeric Reversed Phase, (500 mg/ 6mL, 33 μm, 85 Å), Phenomenex

3.9.2 Κλασμάτωση με στηλάκια Strata-X-AW Polymeric Weak Anion Exchange

Η συγκεκριμένη κλασμάτωση στοχεύει στην παραλαβή των ισχυρών οργανικών οξέων του εκχυλίσματος της *S. verticillata,* κυρίως μέσω ασθενούς ανταλλαγής ανιόντων λόγω του υλικού πλήρωσης που φαίνεται στην Εικόνα 21. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων μπορεί να γίνει κατακράτηση του αναλύτη-στόχου είναι η ασθενής ανταλλαγή ανιόντων λόγω της αμινομάδας, οι π-π δεσμοί λόγω του βενζολικού δακτυλίου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις λόγω του πολυμερικού άκρου.



Εικόνα 21. Πολυμερικός προσροφητής του υλικού πλήρωσης της Strata-X-AW

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής :

1. Pre-treatment : 170 mg ξηρού εκχυλίσματος διαλύονται πλήρως σε 1,5 mL 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικών με pH=5,1 (C=~ 114 mg/mL). Το διάλυμα φυγοκεντρείται και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο με πιπέτα Pasteur.

2. Condition : 4 mL ACN

3. Equilibrate : 4 mL από 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικών με pH=5.1

4. Load : Φορτώνεται το υπερκείμενο που προέκυψε παραπάνω στην στήλη

5. Wash 1 : 4 mL από 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος με pH=5.1

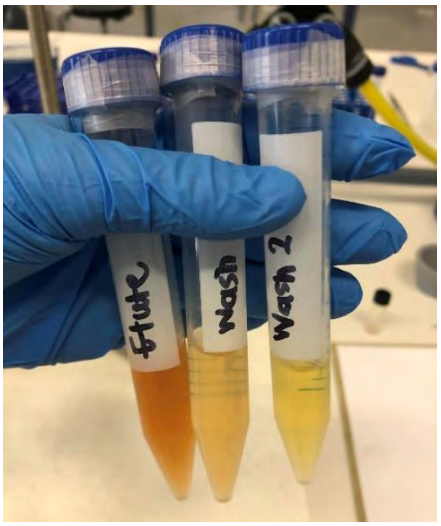
6. Wash 2 : 4 mL MEOH

7. Elution : 4 mL διαλύματος NH_4OH /ACN αναλογίας 5/95.



Εικόνα 22. Στήλη Strata-X-AW μετά το φόρτωμα του υπερκείμενου

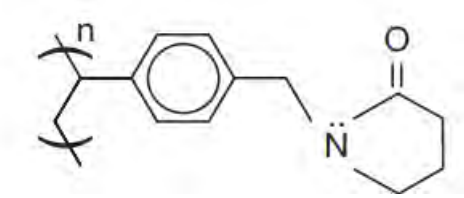
Τα διαλύματα που παραλήφθηκαν από τα wash 1, wash 2 και το elution, παραλήφθηκαν σε πλαστικά falcon, ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε γυάλινα vial προς ανάλυση με LC-MS.



Εικόνα 23. Διαλύματα elute, wash 1 και wash 2 μετά την συλλογή τους από την στήλη

3.9.3 Κλασμάτωση με στηλάκια Strata-X Polymeric Reversed Phase

Στοχεύει στην παραλαβή πολικών μορίων του εκχυλίσματος της *S. verticillata*, υπό έντονα οργανικές συνθήκες. Η φύση του υλικού πλήρωσης φαίνεται στην Εικόνα 24 και έχει τρεις μηχανισμούς κατακράτησης. Ο αναλύτης-στόχος μπορεί να κατακρατηθεί μέσω π-δεσμών λόγω του βενζολικού δακτυλίου, μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων λόγω του πολυμερικού άκρου και μέσω δεσμών υδρογόνου λόγω του ελεύθερου ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου.



Εικόνα 24. Πολυμερικός προσροφητής του υλικού πλήρωσης της Strata-X

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής :

1. Pre-treatment : 140 mg ξηρού εκχυλίσματος διαλύονται πλήρως σε 1 mL 25% (aq.) Μεθανόλη (C=~140 mg/ mL). Το διάλυμα φυγοκεντρείται και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο με πιπέτα Pasteur.



Εικόνα 25. Το ξηρό εχκύλισμα μετά το pre-treatment και πριν την φυγοκέντρηση

2. Condition : 5 mL MeOH

3. Equilibrate : 5 mL H_2O

4. Load : Φορτώνεται το υπερκείμενο που προέκυψε παραπάνω στην στήλη

5. Wash 1 : 5 mL 5% (aq.) MeOH

6. Wash 2 : 5 mL 15% (aq.) MeOH

7. Wash 3 : 5 mL 22% (aq.) MeOH

8. Wash 4 : 5 mL 30% (aq.) MeOH

9. Wash 5 : 5 mL 35% (aq.) MeOH

10. Wash 6 : 5 mL 45% (aq.) MeOH

11. Wash 7 : 5 mL 60% (aq.) MeOH

12. Elution : 5 mL διαλύματος 2% φορμικό οξύ σε MeOH/CAN

Τα διαλύματα που παραλήφθηκαν από τα wash 2, wash 6 συμπυκνώθηκαν, ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε γυάλινα vial προς ανάλυση με LC-MS.

4. Αποτελέσματα-Συζήτηση

4.1 Αποδόσεις εκχυλίσεων

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE) είναι ένα επιτυχημένο παράδειγμα των καινοτόμων τεχνικών εκχύλισης των τελευταίων χρόνων μιας και συγκεντρώνει διάφορα πλεονεκτήματα. Αξιοποιεί φυσικά και χημικά φαινόμενα, τα οποία είναι διαφορετικά κατά βάση σε σύγκριση με τις αρχές των συμβατικών τεχνικών εκχύλισης. [48]

Τα εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται από αυτού του είδους την εκχύλιση είναι σε συγκεντρωμένη μορφή. Τα καθαρά πλεονεκτήματα είναι η απόδοση, η και ο χρόνος εκχύλισης, τα οποία καθιστούν την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE) εύκολα εφαρμοζόμενη σε μια βιομηχανία. Ταυτόχρονα λόγω μικρότερης απαιτούμενης ποσότητας διαλυτών παραμένει πιο φιλική προς το περιβάλλον. [48]

Η επιλογή της τεχνικής που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση ενός μεταβολίτη από μια φυσική πηγή, πρέπει να είναι αποτέλεσμα ενός συμβιβασμού μεταξύ της αποτελεσματικότητας και της επαναληψιμότητας της εκχύλισης, της ευκολίας της διαδικασίας, καθώς και των παραγόντων κόστους, χρόνου και ασφάλειας. [48]

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα εκχυλίσματα του φασκόμηλου, λόγω της στενής σύνδεσης τους με διάφορες ιδιότητες, όπως η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Ωστόσο, η πολικότητα των πολυφαινολών του φασκόμηλου ποικίλλει, με αποτέλεσμα να έχουν μελετηθεί διάφοροι διαλύτες ή συστήματα διαλυτών με σκοπό καλύτερη απόδοση της εκχύλισης. Με βάση την βιβλιογραφία, αλλά και παλαιότερα πρωτόκολλα εκχύλισης διαθέσιμα στο εργαστήριο, προέκυψαν οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στο συγκεκριμένο εκχύλισμα και αναλύονται στην παράγραφο 3.2. [40,39]

Στην αρχή χρησιμοποιήσαμε ως διαλύτη εκχύλισης τον πετρελαϊκό αιθέρα, ο οποίος σύμφωνα με την βιβλιογραφία δύναται λόγω της χαμηλής πολικότητας του να απομακρύνει αλκαλοειδή, τερπενοειδή, κήρους και λιπαρά οξέα που θα παρεμπόδιζαν την μετέπειτα χρωματογραφική ανάλυση.[49] Στην συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε για την εκχύλιση της *S. verticillata* ένα σύστημα διαλυτών H_2O/ MeOH σε αναλογία 30 : 70. Η επιλογή αυτή έγινε καθώς αυτό το μείγμα θεωρείται

πως είναι αρκετά πιθανό να καλύπτει τις διάφορες πολικότητες των βιοδραστικών ενώσεων του εκχυλίσματος, ιδιαίτερα των πολυφαινολών, και είναι πιο αποτελεσματικό σε σύγκριση με την χρήση ενός μόνο διαλύτη όπως προκύπτει από σχετικές μελέτες. [39]

Η απόδοση (α %) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση :

$$\alpha\ \% = \frac{\mu\acute{\alpha}\zeta\alpha\ \xi\eta\rho o\acute{\upsilon}\ \epsilon\kappa\chi\upsilon\lambda\acute{\iota}\sigma\mu\alpha\tau o\varsigma}{\alpha\rho\chi\iota\kappa\acute{\eta}\ \pi o\sigma\acute{o}\tau\eta\tau\alpha\ \xi\eta\rho o\acute{\upsilon}\ \phi\upsilon\tau\iota\kappa o\acute{\upsilon}\ \upsilon\lambda\iota\kappa o\acute{\upsilon}} \times 100\ \%$$

4.1.1 Απόδοση εκχύλισης UAE των εκχυλισμάτων της *Salvia verticillata*

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέτρησης της αποδοτικότητας της εκχύλισης με 70% ΜΕΟΗ των φύλλων και των ανθών της *S. verticillata* καθώς και των φύλλων της *S. fruticosa* που χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση.

Πίνακας 6. Αποδόσεις εκχυλίσεων. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση

Φυτικό υλικό (*S. verticillata*)	**Απόδοση εκχύλισης %**
Φύλλα	16,41 ± 2,54 %
Άνθη	14,19 ± 1,68 %

Τα φύλλα της *S. fruticosa*, εκχυλίστηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο και έδωσαν απόδοση 12,42 ± 0,9%. Οι αποδόσεις μεταξύ των φύλλων και των ανθών της *S. verticillata* είναι στατιστικώς μη σημαντικές και υψηλότερες από αυτές της *S. fruticosa*.

4.2 Ποιοτική σύσταση των πολικών συστατικών των εκχυλισμάτων

4.2.1 Ταυτοποίηση των συστατικών του εκχυλίσματος των φύλλων της *Salvia verticillata* με HPLC-ESI-MS και UPLC-DAD-ESI-MS

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (HPLC-ESI-MS), αναγνωρίσαμε τις ενώσεις με βάση το μοριακό τους βάρος και αποκτήσαμε πληροφορίες για τα θραύσματα κάθε κορυφής, οδηγώντας μας σε πολλαπλές ταυτοποιήσεις ενώσεων σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Ωστόσο, λόγω της πολύ κοντινής πολικότητας των ενώσεων που περιέχονται στα εκχυλίσματα του φασκόμηλου, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε συμπληρωματικά τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD).

Αυτή η προσέγγιση μας παρείχε πληροφορίες σχετικά με τα μήκη κύματος που απορροφούν οι ενώσεις, επιτρέποντάς μας να προσδιορίσουμε το είδος τους και την ομάδα στην οποία ανήκουν. Τα μήκη κύματος επιλέχθηκαν με βάση την απορρόφηση στο UV των χαρακτηριστικών ομάδων του συγκεκριμένου είδους δειγμάτων (φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή) και ήταν τα: 254, 280, 330.

Η ταυτοποίηση των κύριων ενώσεων που βρέθηκαν στα εκχυλίσματα του φασκόμηλου έγινε με τη βοήθεια αναλυτικών προτύπων και συγκρίνοντας τα δεδομένα με αυτά της βιβλιογραφίας και παλαιότερων ευρημάτων του εργαστηρίου (φάσμα μάζας, φάσμα απορρόφησης UV, χρόνος έκλουσης).

Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των φύλλων συνοψίζονται στον Πίνακα 7. Οι είκοσι οχτώ (28) ενώσεις απεικονίζονται αριθμημένες και στο χρωματογράφημα του εκχυλίσματος (Εικόνα 26).

Πίνακας 7. Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποιημένων ενώσεων στα εκχυλίσματα των φύλλων της *S. verticillata*

Peak	**RT (min)**	**Όνομα**	**MW**	**Ιόντα αρνητικού ιονισμού**	**Ιόντα θετικού ιονισμού**	**λ_{max} (nm)**	**Πηγή**
1	1.8	quinic or citric or isocitric acid	192	111 191[M-H]$^-$	-	200,209sh,215	50

2	4.3	dimer -b-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid	396	135[caffeic acid-H-CO_2]$^-$ 179[caffeic acid-H]$^-$ 197[M-2H]$^{2-}$ 395 [M-H]$^-$ 417[M+Na-2H]$^-$	221 [M+2Na]$^{2+}$ 317 435 [M+K]$^+$ 831 [2M+K]$^+$	198,225,282sh	51
3	8.0	caftaric acid	312	149[tartaric acid-H]$^-$ 179[caffeic acid-H]$^-$ 311[M-H]$^-$ 333[M+Na-2H]$^-$	335[M+Na]$^+$ 354[M+ACN+H]$^+$ 376[M+ACN+Na]$^+$	202,215,325sh	51
4	9.4	unknown	282	281[M-H]- 563[2M-H]$^-$	164[M+2Na]$^{2+}$ 305[M+Na]$^+$	203sh,219,329	-
5	10.2	unknown	-	135, 179, 265, 325, 387,459, 479, 523, 538, 560	349, 540	202sh,220,323	-
6	10.5	coumaroyl-hexose	326	163 [M-hexose]$^-$ 193 325[M-H]$^-$ 371 [M+FA-H]$^-$	349 [M+Na]$^+$ 365 [M+K]$^+$ 675 [2M+Na]$^+$	202sh,219,285, 328	8,33,52
7	10.7	medioresinol	388	177 256 387[M-H]$^-$ 423[M+Cl]$^-$ 433[M+FA-H]$^-$ 775[2M-H]$^-$	227 389[M+H]$^+$ 411[M+Na]$^+$ 427[M+K]$^+$ 799[2M+Na]$^+$	226sh,315	40,52
8	11.7	unknown	592	207 295[M-2H]$^{2-}$ 319 591 [M-H]$^-$	177 199 297 [M+2H]$^{2+}$ 319[M+2Na]$^{2+}$ 615 [M+Na]$^+$ 1223[2M+K]$^+$	198sh,219,329	-
9	13.4	unknown	556	537[M-H_2O-H]$^-$ 555[M-H]$^-$ 577[M+Na-2H]$^-$	182 298[M+H+K]$^{2+}$ 323 341 539 579 [M+Na]$^+$ 1135[2M+Na]$^+$	198,224,277sh	-
10	19.3	luteolin glucuronide	462	421 461 [M-H]$^-$ 483[M+Na-2H]$^-$ 923[2M-H]$^-$	287 [M-glucuronic+H]$^+$ 463 [M+H]$^+$ 485[M+Na]$^+$ 925[2M+H]$^+$ 947 [2M+Na]$^+$	200sh,219,268sh,344	8,33,40,28,53
11	21.2	sagerinic acid	720	539 719[M-H]$^-$ 741 [M+Na-2H]$^-$	163 313 328 380[M+H+K]$^{2+}$ 523 721[M+H]$^+$ 743[M+Na]$^+$ 759[M+K]$^+$ 1441[2M+H]$^+$ 1463 [2M+Na]$^+$	199,221,283sh	33,28
12	21.9	apigenin glucuronide	446	269[M-glucuronic-H]$^-$ 445[M-H]$^-$ 891[2M-H]$^-$	271 [M-glucuronic+H]$^+$ 447 [M+H]$^+$ 469 [M+Na]$^+$ 893[2M+H]$^+$	200sh,221,268,337	8,33,52,53,54

13	22.1	rosmarinic acid	360	161 179 [M-2H]$^{2-}$ and [caffeic acid-H]$^{-}$ 197 359 [M-H]$^{-}$ 719[2M-H]$^{-}$ 1079[3M-H]$^{-}$	163 361[M+H]$^{+}$ 383 [M+Na]$^{+}$ 721[2M+H]$^{+}$ 743[2M+Na]$^{+}$	199sh,236,327,333	8,33,50,51,53,55,56,57
14	22.8	hispidulin glucuronide	476	299[M-glucuronic-H]$^{-}$ 475 [M-H]$^{-}$ 535 [M+Hac-H]$^{-}$ 951 [2M-H]$^{-}$	301[M-glucuronic+H]$^{+}$ 477 [M+H]$^{+}$ 499 [M+Na]$^{+}$ 953[2M+H]$^{+}$	200,223,343sh	52,28
15	23.4	unknown(s)	734	461 513 537 548 581 703 719 733 [M-H]$^{-}$ 755[M+Na-2H]$^{-}$	191 277 295 387[M+H+K]$^{2+}$ 515 537 558 735[M+H]$^{+}$ 757 [M+Na]$^{+}$	198,223,285sh,320sh	-
16	23.9	salvianolic acid K or isomer	556	493 535 555[M-H]$^{-}$ 577[M+Na-2H]$^{-}$	267 298[M+H+K]$^{2+}$ 323 341 359 539 557[M+H]$^{+}$ 559 579[M+Na]$^{+}$ 595[M+K]$^{+}$ 1155[2M+ACN+H]$^{+}$	225,286sh,325sh	33,52
17	24.2	salvianolic acid H,I,J or lithospermic acid or 3'-O-(8''-Z-Caffeoyl)rosmarinic acid	538	537[M-H]$^{-}$ 559[M+Na-2H]$^{-}$ 1075[2M-H]$^{-}$	457 561[M+Na]$^{+}$ 1077[2M+H]$^{+}$ 1099[2M+Na]$^{+}$ 1115[2M+K]$^{+}$	199,223,286sh,320sh	28,53,57
18	26.0	salvianolic acid E	718	537 717 [M-H]$^{-}$ 739[M+Na-2H]$^{-}$	323 379[M+H+K]$^{2+}$ 521 719[M+H]$^{+}$ 741[M+Na]$^{+}$ 757[M+K]$^{+}$ 1459[2M+Na]$^{+}$ 1475[2M+K]$^{+}$	199,223,286Sh,320sh	50,51,57,58
19	26.5	salvianic acid A (danshensu) rhamnoside	344	179[danshensu]$^{-}$ 243 343[M-H]$^{-}$ 379 [M+Cl]$^{-}$ 687[2M-H]$^{-}$ 733[2M+FA-H]$^{-}$ 747[2M+Hac-H]$^{-}$	147 367[M+Na]$^{+}$	226,286sh,320sh	50,57
20	27.9	*cis*-methyl rosmarinic acid	374	135 179 373 [M-H]$^{-}$ 395[M+Na-2H]$^{-}$ 747[2M-H]$^{-}$	177 341 397[M+Na]$^{+}$ 771[2M+Na]$^{+}$	197,223,286sh,326sh	33,50,51,59
21	28.3	*trans*-methyl rosmarinic acid	374	373 [M-H]$^{-}$ 747[2M-H]$^{-}$ 1120[3M-H]$^{-}$	177 375 [M+H]$^{+}$ 397[M+Na]$^{+}$ 771[2M+Na]$^{+}$ 787[2M+K]$^{+}$	199sh,220,285sh, 329	8,33,50,51

22	33.8	salvianolic acid B, L or isosalvianolic acid B	718	717 $[M-H]^-$ 739$[M+Na-2H]^-$	323 343 371$[M+H+Na]^{2+}$ 379$[M+H+K]^{2+}$ 719$[M+H]^+$ 741$[M+Na]^+$ 1454$[2M+NH_4]^+$	198,224,284sh ,330sh	52,57, 58
23	34.7	dedihydro-salvianolic acid B/isomer	716	715 $[M-H]^-$ 737 $[M+Na-2H]^-$	295 378 $[M+H+K]^{2+}$ 519 [salvianolic acid B-H-98]$^-$ 739$[M+Na]^+$ 755 $[M+K]^+$ 1455 $[2M+Na]^+$	199sh,227,284 sh,346	58
24	36.1	unknown	730	343 405 717 729$[M-H]^-$ 751$[M+Na-2H]^-$	296 312 328 345 377$[M+H+Na]^{2+}$ 385$[M+H+K]^{2+}$ 429 533 731$[M+H]^+$ 748$[M+NH4]^+$ 753$[M+Na]^+$ 769$[M+K]^+$ 1483$[2M+Na]^+$	198,226,290sh ,338sh	-
25	38.8	circimaritin	314	283$[M-H-2CH_3]^-$ 313 $[M-H]^-$	315$[M+H]^+$ 337$[M+Na]^+$ 651$[2M+Na]^+$	227,277sh,335	8,56
26	43.4	salvigenin	328	-	329$[M+H]^+$ 351$[M+Na]^+$ 392$[M+ACN+Na]^+$ 679$[2M+Na]^+$	228,280sh,332	54,56
27	46.8	unknown	296	277 295$[M-H]^-$	149$[M+2H]^{2+}$ 243 279 297$[M+H]^+$ 319$[M+Na]^+$	228,278sh	-
28	48.6	miltipolone or hinokione	300	-	149 205 301$[M+H]^+$	228,278sh	56,60

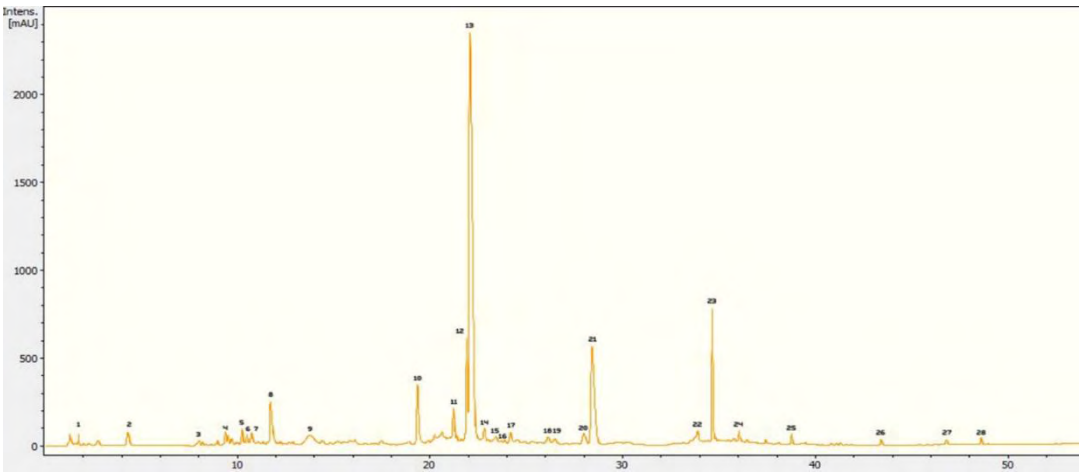
Abbreviations: ACN: acetonitrile, FA: formic acid, Hac: acetic acid

Είκοσι οκτώ (28) ενώσεις ανιχνεύθηκαν στο εκχύλισμα των φύλλων της *S. verticillata,* με την πλειοψηφία (δεκατρείς) να είναι φαινολικά οξέα, κυρίως παράγωγα του καφεϊκού οξέος, όπως το καφταρικό οξύ, ένα διμερές του γαλακτικού οξέος, το σαγερινικό οξύ, το μεθυλο-ροσμαρινικό οξύ, τα σαλβιανολικά οξέα και το ροσμαρινικό οξύ, το οποίο ήταν το κύριο συστατικό και σε άλλα είδη *Salvia* όπως έχει αποδειχθεί προηγουμένως από την ερευνητική μας ομάδα. [40] Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν πέντε φλαβόνες σε σημαντικές ποσότητες, δηλαδή τα γλυκουρονίδια της λουτεολίνης, της απιγενίνης και της

ισπιδουλίνης, η κιρσιμαριτίνη και η σαλβιγενίνη. Ανιχνεύθηκε ακόμη ένα οργανικό οξύ (κορυφή 1), μία λιγνάνη (μιντιορεσινόλη, κορυφή 7) και ένα διτερπένιο (κορυφή 28). Το εκχύλισμα ήταν πλούσιο σε άγνωστες ενώσεις (επτά), οι οποίες, σύμφωνα με την απορρόφησή τους στο UV-Vis, είναι πιθανώς παράγωγα του καφεϊκού οξέος. Η άγνωστη ένωση 8 (MW = 592) είναι ένα κύριο συστατικό του εκχυλίσματος, γεγονός που επέτρεψε την ποσοτικοποίηση της όπως φαίνεται παρακάτω στην ενότητα 4.3.

Συνολικά, τα κοινά συστατικά μεταξύ της μελέτης μας και της μελέτης των Stanković et al. είναι η κουμαροϋλοεξόζη, το ροσμαρινικό οξύ και ο μεθυλεστέρας του, τα γλυκουρονίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης και η κιρσιμαριτίνη.[8] Ωστόσο, στην μελέτη τους δεν βρέθηκε καμία λιγνάνη, ούτε αναφέρθηκαν άγνωστες ενώσεις, παράγωγα του καφεϊκού οξέος. Οι διαφορές στα ευρήματα θα μπορούσαν να οφείλονται στη διαδικασία εκχύλισης, στο μέρος του φυτού το οποίο εκχυλίστηκε (φύλλα έναντι εναέριων τμημάτων), στον διαλύτη εκχύλισης (70 % έναντι 100% μεθανόλη) στη διαφορετική γεωγραφική προέλευση (Νότια Ελλάδα έναντι Σερβίας) και συνεπώς στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Ομοίως, παρά τις διαφορές στο φυτικό υλικό (φύλλα έναντι εναέριων τμημάτων), στο διαλύτη εκχύλισης (70% έναντι 100% μεθανόλη) και στη γεωγραφική προέλευση (Ελλάδα έναντι Τουρκίας), η κουμαροϋλοεξόζη, το γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης, το σαγερινικό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ και οι μεθυλεστέρες του και το σαλβιανολικό οξύ K ήταν κοινά στη μελέτη μας και σε εκείνη των Zengin et al.[33]



Εικόνα 26. Χρωματογράφημα στα 280 nm με HPLC-DAD-ESI-MS του εκχυλίσματος των φύλλων της *S. verticillata* (3 mg/mL). Η αρίθμηση των κορυφών ακολουθεί τον πίνακα 7.

4.2.2 Ταυτοποίηση των συστατικών του εκχυλίσματος των ανθών της *Salvia verticillata* με LC-MS

Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των ανθών συνοψίζονται στον Πίνακα 8 ενώ οι ενώσεις απεικονίζονται και στο χρωματογράφημα του εκχυλίσματος (Εικόνα 27). Η ταυτοποίηση σε αυτήν την περίπτωση πραγματοποιήθηκε μόνο με την τεχνική LC-MS λόγω κωλύματος του Κέντρου Ενόργανης Ανάλυσης του Πανεπιστημίου Πατρών, οπότε και παρατηρούνται κάποιες διαφορές ως προς τον χρόνο έκλουσης και την σειρά των ταυτοποιημένων ενώσεων σε σχέση με το εκχύλισμα των φύλλων (διαφορετική στήλη).

Πίνακας 8. Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποιημένων ενώσεων στα εκχυλίσματα των ανθών της *S. verticillata*

Peak	**RT (min)**	**Όνομα**	**MW**	**Ιόντα αρνητικού ιονισμού**	**Ιόντα θετικού ιονισμού**	**Πηγή**
1	2.3	dimer -b-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid	396	135 [caffeic acid-H-CO_2]$^-$ 179[caffeic acid-H]$^-$ 197[M-2H]$^{2-}$ 395 [M-H]$^-$ 417[M+Na-2H]$^-$	218[M+H+K]$^{2+}$ 221 [M+2Na]$^{2+}$ 317 355 435[M+K]$^+$	51
2	9.4	coumaroyl-hexose	326	175 249 325[M-H]$^-$	157 177 184[M+ACN+2H]$^{2+}$ 215 277 349 [M+Na]$^+$ 675 [2M+Na]$^+$	8,33,52
3	10.9	unknown	592	207 295[M-2H]$^{2-}$ 499 591 [M-H]$^-$	177 214 227 297 [M+2H]$^{2+}$ 319[M+2Na]$^{2+}$ 411	-
4	11.5	medioresinol	388	175 387[M-H]$^-$	165 213 291 365 411[M+Na]$^+$ 499 818[2M+ACN+H]$^+$	40,52
5	13.2	unknown	556	249 537[M-H_2O-H]$^-$	215 391	-

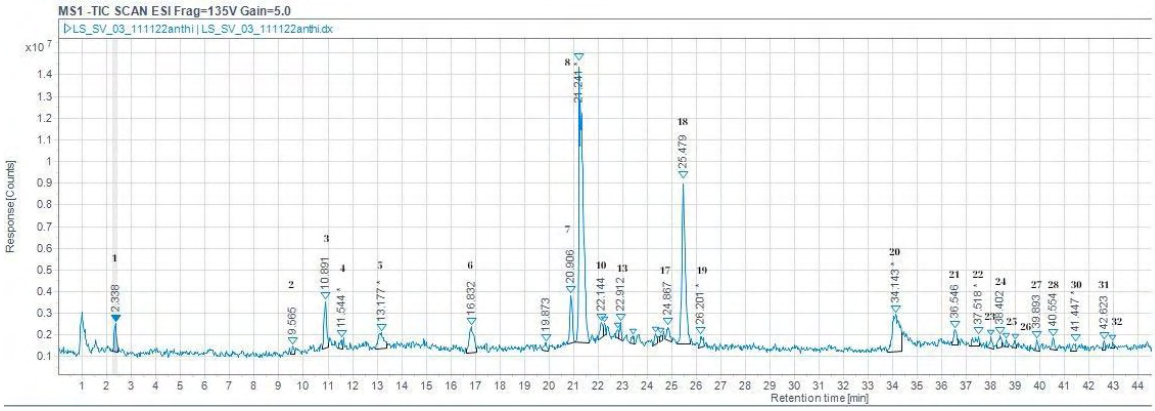
				559 1055	475 579[M+Na]$^+$ 676 766	
6	16.8	luteolin glucuronide	462	461 [M-H]$^-$ 483[M+Na-2H]$^-$ 597 806 923[2M-H]$^-$	287[M-glucuronic+H]$^+$ 463 [M+H]$^+$ 504[M+ACN+H]$^+$ 545[M+2ACN+H]$^+$	8,33,40,28,53
7	20.9	sagerinic acid	720	359[M-2H]$^{2-}$ 536 541 681 719[M-H]$^-$ 741 [M+Na-2H]	163 245 380[M+H+K]$^{2+}$ 409 507 597 743[M+Na]$^+$ 759[M+K]$^+$	33,28
8	21.3	rosmarinic acid	360	161 179 [M-2H]$^{2-}$ and [caffeic acid-H]$^-$ 359 [M-H]$^-$ 719[2M-H]$^-$	135 [caffeic acid-H-CO_2]$^-$ 163 343 383 [M+Na]$^+$ 743[2M+Na]$^+$ 759[2M+K]$^+$	8,33,50,51,53,55,56,57
9	21.9	apigenin glucuronide	446	269[M-glucuronic-H]$^-$ 445[M-H]$^-$ 668 891[2M-H]$^-$ 913	271[M-glucuronic+H]$^+$ 433 447 [M+H]$^+$ 469 [M+Na]$^+$ 779 801 893[2M+H]$^+$	8,33,52,53,54
10	22.1	hispidulin glucuronide	476	175 249 475 [M-H]$^-$ 535 [M+Hac-H]$^-$ 951 [2M-H]$^-$	245 397 441 477 [M+H]$^+$	52,28
11	22.2	apigenin-7-glucoside	432	-	201 215 239[M+2Na]$^{2+}$ 245 275 385 433[M+H]$^+$ 455[M+Na]$^+$ 477[M+2Na-H]$^+$	53
12	22.8	unknown(s)	734	175 233 513 537 548 581 703 719 704 733 [M-H]$^-$ 792 885 1037	277 295 313 355 387[M+H+K]$^{2+}$ 416 515 537 558 743 757 [M+Na]$^+$	-
13	22.9	salvianolic acid K or isomer	556	471 535 555[M-H]$^-$ 577[M+Na-2H]$^-$ 733	235 298[M+H+K]$^{2+}$ 337 411 543 579[M+Na]$^+$ 595[M+K]$^+$	33,52

					855	
14	23.4	unknown	346	345[M-H]$^-$ 459 666 852 1244	215[M+2ACN+2H]$^{2+}$ 369[M+Na]$^+$	-
15	24.3	salvianic acid A (danshensu) rhamnoside	344	175 249 343[M-H]$^-$ 407 537 601[2M-H]$^-$ 722 1218	147 367[M+Na]$^+$ 429 722 817	50,57
16	24.6	salvianolic acid H,I,J or lithospermic acid or 3'-O-(8''-Z-Caffeoyl)rosmarinic acid	538	407 537[M-H]$^-$ 519[M-H2O-H]$^-$ 691 733 779 1106	275 447 559 622 645 689 705 757	28,53,57
17	24.9	salvianolic acid E	718	537 717 [M-H]$^-$ 739[M+Na-2H]$^-$	295 379[M+H+K]$^{2+}$ 521 558 540 585 741[M+Na]$^+$ 757[M+K]$^+$	50,51,57,58
		cis-methyl rosmarinic acid	374	175 373 [M-H]$^-$ 395[M+Na-2H]$^-$	143 177 341 397[M+Na]$^+$	33,50,51,59
18	25.5	*trans*-methyl rosmarinic acid	374	135 175 179 197 373 [M-H]$^-$ 487 747[2M-H]$^-$	177 191 237 295 357 397[M+Na]$^+$ 413[M+K]$^+$ 581 771[2M+Na]$^+$ 787[2M+K]$^+$	8,33,50,51
19	26.2	salvianolic acid H,I,J or lithospermic acid or 3'-O-(8''-Z-caffeoyl)rosmarinic acid	538	155 249 519[M-H_2O-H]$^-$ 537[M-H]$^-$ 559[M+Na-2H]$^-$ 621 1111	143 215 289[M+H+K]$^{2+}$ 429 457 561[M+Na]$^+$ 577[M+K]$^+$ 640	28,53,57
20	34.1	dedihydro-salvianolic acid B/isomer	716	715 [M-H]$^-$ 737 [M+Na-2H]$^-$ 1125	295 378 [M+H+K]$^{2+}$ 397 519[salvianolic acid B-H-98]$^-$ 525 715 736 739[M+Na]$^+$ 755 [M+K]$^+$	58
21	36.5	unknown	730	131 173 379 519	309 385[M+H+K]$^{2+}$ 427[M+3ACN+2H]$^{2+}$ 533	-

				535 551 683 729[M-H]$^-$ 751[M+Na-2H]$^-$ 874 1063	577 683 753[M+Na]$^+$ 769[M+K]$^+$ 848	
22	37.5	carnosol or carnosol isomer	330	329[M-H]$^-$ 397 555 770 835 931 1143 1305	215 353 [M+Na]$^+$ 377 673 689 805	50,55,52,53
23	38.0	unknown(s)	-	175 249 373 403 745 767 987 1417	126 184 213 229 237 257 311 329 345 351 367 392 399 453 679 775 785	-
24	38.4	methoxycarnosol	360	155 175 173 293 359[M-H]$^-$ 473 517 947 1111	143[M+3Na]$^{3+}$ 301 329 383[M+Na]$^+$ 489 743[2M+Na]$^+$ 759[2M+K]$^+$	55
25	38.6	circimaritin	314	175 313 [M-H]$^-$ 427 593 884 1031	143 169[M+H+Na]$^{2+}$ 198 206 315[M+H]$^+$ 337[M+Na]$^+$ 334 338 353[M+2H+Na]$^{3+}$ 557 651[2M+Na]$^+$	8,56
26	38.9	apigenin 7,4'-dimethyl ether	298	-	171[M+ACN+2H]$^{2+}$ 277 299[M+H]$^+$ 315 361	54
27	39.9	rosmanol isomer,epirosmanol, methyl carnosate	346	155 309 345[M-H]$^-$ 461 559 631 749 890	193[M+H+K]$^{2+}$ 222 230 366 369[M+Na]$^+$ 385[M+2H+Na]$^{3+}$ 431 540 715[2M+Na]$^+$ 729	52,53
28	40.5	carnosol or carnosol isomer	330	175 329[M-H]$^-$ 397	185 [M+H+K]$^{2+}$ 198 206	50,55,52,53

				443 562 659	273 331 $[M+H]^+$ 353 $[M+Na]^+$ 369 $[M+2H+Na]^{3+}$ 379 473 683 $[2M+Na]^+$ 745	
29	40.9	methoxycarnosol or isomer	360	-	143$[M+3Na]^{3+}$ 199 229 258 287 315383$[M+Na]^+$ 399 445 715 743$[2M+Na]^+$	55
30	41.4	notohamosin B	458	-	126 143 230$[M+2H]^{2+}$ 459$[M+H]^+$	56
31	42.6	unknown	336	-	354 359[M+Na]+ 375$[M+2H+Na]^{3+}$	-
32	43.4	salvigenin	328	-	143 176$[M+H+Na]^{2+}$ 212 329$[M+H]^+$ 351$[M+Na]^+$ 367$[M+K]^+$ 679$[2M+Na]^+$	54,56
33	44.0	isosalvianolic acid C, salvianolic acid C	492	-	258$[M+H+Na]^{2+}$ 313 401 515$[M+Na]^+$	57,51

Abbreviations: ACN: acetonitrile, FA: formic acid, Hac: acetic acid



Εικόνα 27. Χρωματογράφημα (-TIC) με LC-MS του εκχυλίσματος των ανθών της *S. verticillata* (3 mg/mL). Η αρίθμηση των κύριων κορυφών ακολουθεί τον πίνακα 8.

Η ανάλυση με LC-MS του εκχυλίσματος των ανθών συνέβαλλε στην ταυτοποίηση 34 ενώσεων, έναντι 28 ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα των φύλλων. Στην βιβλιογραφία δεν φαίνεται να υπάρχει άλλη μελέτη

που να μελετά την σύσταση του πολικού εκχυλίσματος των ανθών της *S. verticillata,* παρά μόνο την σύσταση του αιθέριου ελαίου αυτών. [31] Υπάρχουν ωστόσο κάποιες μελέτες που συγκρίνουν την αντιοξειδωτική δράση μεθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων και των ανθών της, οι οποίες θα σχολιαστούν παρακάτω.

Ακόμη, σύμφωνα με την μελέτη των Bendrihem, K.A., et al. που αφορά την ανάλυση ενός πληθυσμού της *Salvia balansae* από την Αλγερία, το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων και των ανθών της φαίνεται να παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες. [61] Ειδικότερα, αυτές αφορούν στην ταυτοποίηση φαινολικών οξέων όπως το κινικό, το γαλλικό, το καφεϊκό και το ροσμαρινικό οξύ, αλλά και φλαβονοειδών όπως ο γλυκοζίτης της λουτεολίνης και της απιγενίνης. [61] Στην δικά μας έρευνα παρατηρούνται επίσης ομοιότητες ανάμεσα στα δύο μέρη του φυτού.

4.2.3 Ταυτοποίηση των συστατικών του εκχυλίσματος των φύλλων της *Salvia fruticosa* με LC-MS και σύγκριση με την ποιοτική σύσταση των εκχυλισμάτων της *Salvia verticillata*

Τα ευρήματα της ανάλυσης των φύλλων της *S. fruticosa* παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 9, ενώ οι κύριες ενώσεις απεικονίζονται και στο χρωματογράφημα του εκχυλίσματος στην Εικόνα 28. Η συγκεκριμένη ταυτοποίηση αποσκοπεί στην σύγκριση των διαφορετικών δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχονται στα δύο είδη.

Πίνακας 9. Συγκεντρωτικός πίνακας ταχτοποιημένων ενώσεων στα εκχυλίσματα των φύλλων της *S. fruticosa*

Peak	RT (min)	Όνομα	MW	Θραύσματα αρνητικού ιονισμού	Θραύσματα θετικού ιονισμού	Πηγή
1	5.9	unknown	430	475[M+FA-H]$^-$ 543 727 1081 1640	201 235[M+H+K]$^{2+}$ 264 317 453[M+Na]$^+$ 469[M+2H+Na]$^{3+}$ 515	-
2	9.8	apigenin-O-pentoside	402	175 401[M-H]$^-$ 447[M+FA-H]$^-$ 515 633 741	201 221[M+H+K]$^{2+}$ 291 425[M+Na]$^+$ 441[M+2H+Na]$^{3+}$ 487	28

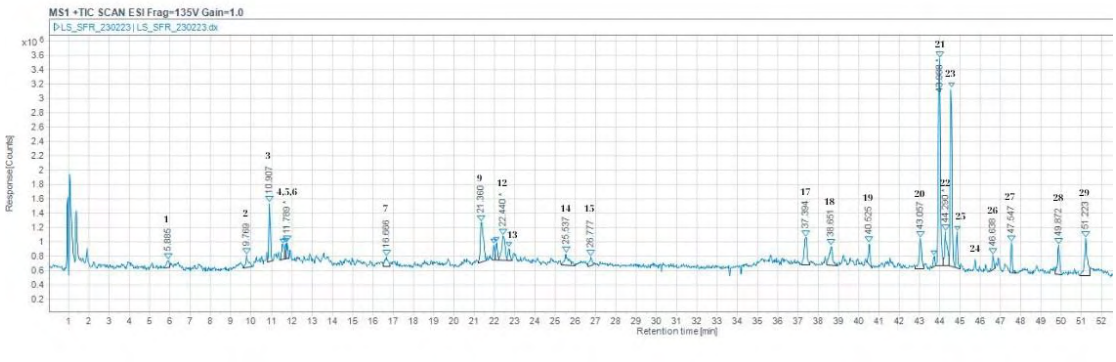
				1071 1386 1487 1576		
3	10.9	medioresinol	388	387[M-H]$^-$ 431 455 775[2M-H]$^-$ 797 813	207 214 227 369 411[M+Na]$^+$ 427 602 799[2M+Na]$^+$ 815[2M+K]$^+$	40,52
4	11.5	methydihydrojasmonic acid isomer	226	225 [M-H]$^-$ 387	157 187 201 214 249[M+Na]$^+$ 337 353 371 411	52
5	11.7	1-O-ψaffeoyl-β-D-apiofuranosyl- (1→6)-β-D-glucopyranoside	474	311 385 519[M+FA-H]$^-$ 587 639 890 1057	201 257[M+H+K]$^{2+}$ 337 407 439 497[M+Na]$^+$ 519[M+2Na-H]$^+$	40,62
6	11.8	saponarin (apigenin 6-C-glucoside-7-O-glucoside) or apigenin 8-C-glucoside-7-O-glucoside	594	593 [M-H]$^-$ 661 1467	157 199 [M+3H]$^{3+}$ 272 317 [M+H+K]$^{2+}$ 346 441 527 595 [M+H]$^+$ 617 [M+Na]$^+$	40,52,53
7	16.6	luteolin glucuronide	462	175 461 [M-H]$^-$ 483[M+Na-2H]$^-$ 545 738 764 847 923[2M-H]$^-$	201 229 287[M-glucuronic+H]$^+$ 393 441 463 [M+H]$^+$ 505 568	8,33,40, 28,53
8	19.1	nepitrin (6- Methoxyluteolin-7- glucoside) or isorhamnetin-hexoside	478	175 257 477 [M-H]$^-$ 491 513 [M+Cl]$^-$	-	40,56,63
9	21.4	rosmarinic acid	360	161 179 [M-2H]$^{2-}$ 197 359 [M-H]$^-$ 719[2M-H]$^-$ 742	135 [caffeic acid-H-CO_2]$^-$ 163 295 343 383 [M+Na]$^+$ 560 743[2M+Na]$^+$ 759[2M+K]$^+$	8,33,50, 51,53,55 ,56,57,4 0
10	22.0	unknown	412	175 248 411 [M-H]$^-$ 461 575	201 248 [M+2ACN+2H]$^{2+}$ 337 §353	-

				598 607 737 936	457 $[M+2Na-H]^+$ 479 495 $[M+2ACN+H]^+$ 609 631	
11	22.1	hispidulin glucoside	462	175 353 461 $[M-H]^-$ 575	201 301[M-glucose+H]$^+$ 355 421 463 $[M+H]^+$ 485 $[M+Na]^+$ 501 $[M+2H+Na]^{3+}$ 547 713 947 $[2M+Na]^+$	8,33,40, 28,53
12	22.4	hispidulin glucuronide	476	475$[M-H]^-$ 493 526 951$[2M-H]^-$	297 301 [M-glucuronic+H]$^+$ 477$[M+H]^+$ 531 845 953$[2M+H]^+$	52,28
		salvianolic acid K or isomer	556	555$[M-H]^-$ 567 845 1031	341$[M+3ACN+2]^{2+}$ 359 579$[M+Na]^+$ 595$[M+2H+Na]^{3+}$	33,52
13	22.7	unknown	550	175 357 461 491 549$[M-H]^-$ 571$[M+Na-2H]^-$ 639 863 1457	157 201 287$[M+H+Na]^{2+}$ 295$[M+H+K]^{2+}$ 463 493 573$[M+Na]^+$ 589$[M+2H+Na]^{3+}$	-
14	25.5	hispidulin	300	299$[M-H]^-$	323$[M+Na]^+$ 549 571 639 693$[2M+K]^+$	28,54,55
15	26.8	caffeic acid derivative or unknown	564	-	302$[M+H+K]^{2+}$ 347 427 504 587$[M+Na]^+$ 603$[M+2H+Na]^{3+}$	53
16	36.2	salvianolic acid B, L or isosalvianolic acid B	718	260 358$[M-2H]^{2-}$ 552 717 $[M-H]^-$ 762 904 1078	-	52,57,58
17	37.4	rosmanol or rosmanol isomer or epirosmanol	346	301 345$[M-H]^-$ 459$[M+TFA-H]^-$ 646 691$[2M-H]^-$	222 251 301 347$[M+H]^+$ 369$[M+Na]^+$ 427 715$[2M+Na]^+$	53,52,55 ,56
18	38.6	circimaritin	314	-	235 315$[M+H]^+$ 337$[M+Na]^+$ 353$[M+2H+Na]^{3+}$ 491	8,56,53

					651[2M+Na]$^{+}$	
19	40.5	rosmadial/galdosol/carnosol p-quinone/safficinolide	344	277 343[M-H]$^{-}$ 389[M+FA-H]$^{-}$ 457[M+TFA-H]$^{-}$ 663	250 335 367[M+Na]$^{+}$ 383[M+2H+Na]$^{3+}$ 425 711[2M+Na]$^{+}$ 727[2M+K]$^{+}$	56
20	43.1	salvigenin	328	-	213 242 257 329[M+H]$^{+}$ 351[M+Na]$^{+}$ 512 679[2M+Na]$^{+}$	54,56
21	43.7	methoxycarnosol	360	359[M-H]$^{-}$ 473[M+TFA-H]$^{-}$ 671	258 361[M+H]$^{+}$ 383[M+Na]$^{+}$ 399[M+2H+Na] 441 503 743[2M+Na]$^{+}$	55
22	44.0	carnosol or carnosol isomer	330	285 329[M-H]$^{-}$ 443[M+TFA-H]$^{-}$ 659[2M-H]$^{-}$ 681	331[M+H]$^{+}$ 353[M+Na]$^{+}$ 411 515 672 683[2M+Na]$^{+}$	50,55,52,53
23	44.3	isosalvianolic acid C, salvianolic acid C	492	-	258[M+H+Na]$^{2+}$ 313 401 515[M+Na]$^{+}$	57,51
24	45.6	carnosol or carnosol isomer	330	285 329 [M-H]$^{-}$ 353 397 593 637 705 [2M+FA-H]$^{-}$	-	50,55,52,53
25	44.8	unknown	358	-	228 257 313 381 [M+Na]$^{+}$ 439 739 [2M+Na]$^{+}$ 755 [2M+K]$^{+}$	-
26	46.7	rosmaridiphenol	316	-	227 299 339 [M+Na]$^{+}$ 355 [M+2H+Na]$^{3+}$ 380 [M+ACN+Na]$^{+}$ 655 [2M+Na]$^{+}$ 797	56
27	47.5	12-methylcarnosic acid	346	345 [M-H]$^{-}$ 413 713	251 301 369 [M+Na]$^{+}$ 395 540 715 [2M+Na]$^{+}$	64
28	49.9	miltirone	284	-	285 [M+H]$^{+}$ 307 [M+Na]$^{+}$ 365 399 443	53

					591 $[2M+Na]^+$	
29	51.2	carnosol or carnosol isomer	330	-	243 331 $[M+H]^+$ 353 $[M+Na]^+$ 457 515 681 745	50,55,52 ,53

Abbreviations: ACN: acetonitrile, FA: formic acid, Hac: acetic acid, TFA: trifluoroacetic acid



Εικόνα 28. Χρωματογράφημα (+TIC) με LC-MS του εκχυλίσματος των φύλλων της *S. fruticosa* (3 mg/mL). Η αρίθμηση των κύριων κορυφών ακολουθεί τον πίνακα 9.

Στο πολικό εκχύλισμα της *S. fruticosa*, ταυτοποιήθηκαν τριάντα (30) ενώσεις, οι οποίες αντιστοιχούν σε μεγάλο ποσοστό σε φλαβονοειδή (10) και αβιετικά διτερπένια (8). Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, το καφεϊκό οξύ συμμετέχει στη βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών της οικογένειας Lamiaceae και ειδικότερα στο φασκόμηλο, και βρίσκεται κυρίως στην μορφή του εστέρα του με το 3,4- διυδροξυφαινυλογαλακτικό οξύ, δηλαδή το ροσμαρινικό οξύ. Αν και η κύρια αντιπροσωπευτική ομάδα του γένους *Salvia* είναι αυτή των φαινολικών οξέων, άλλες κατηγορίες του πολυφαινολικού φάσματος, όπως οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι γλυκοζίτες τους είναι παρούσες στο εκχύλισμα της *S. verticillata*.

Στην μελέτη μας, τα εκχυλίσματα της *S. verticillata* ήταν πλούσια σε φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα, ωστόσο, δεν βρέθηκαν καθόλου αβιετικά διτερπένια στα εκχύλισμα των φύλλων ή βρέθηκαν σε ίχνη στα εκχυλίσματα των ανθών. Τα πολικά εκχυλίσματα της *S. verticillata* δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς στην βιβλιογραφία λόγω της σπανιότητας του είδους, σε αντίθεση με αυτά της *S. fruticosa*. Συγκεκριμένα, δεν υπάρχει διαθέσιμη μελέτη που να ερευνά τα πολικά εκχυλίσματα ενός πληθυσμού της *S. verticillata* προερχόμενου από την Ελλάδα,

παρά μόνο πολικά εκχυλίσματα προερχόμενα από την Σερβία και την Τουρκία.[8],[33]

Το γεγονός ότι τα αβιετικά διτερπένια βρέθηκαν σε ίχνη ή καθόλου στα εκχυλίσματα της *S. verticillata,* είναι σε συμφωνία με τις μελέτες των Katanic και Zengin et al. [8],[33]

Αντίθετα, το είδος *S. fruticosa* περιέχει σε αφθονία αβιετικά διτερπένια, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 28 (κορυφές 17,19,21,22,24,26,27,29). Σύμφωνα με την μελέτη των Ververis et al., η οποία αφορά μελέτη πληθυσμού του είδους από την Θεσσαλονίκη, η καρνοσόλη και το καρνοσικό οξύ, τα οποία είναι αβιετικά διτερπένια, είναι τα κύρια συστατικά του είδους. [65] Ωστόσο, στην μελέτη μας δεν χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα αναλυτικά πρότυπα για την ποσοτικοποίηση τους, καθώς όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ανάλυση της αποσκοπεί στην φυτοχημική σύγκριση της με την *S.verticillata*.

Τέλος, καθώς στο εργαστήριο μας έχει προηγηθεί μελέτη πληθυσμών της *S. fruticosa* προερχόμενων από τους Φούρνους Ικαρίας και την Ροδινή Αχαΐας, θεωρήσαμε ενδιαφέρουσα και αυτήν την σύγκριση.[40] Συνολικά, δεκαεννέα (19) ενώσεις βρέθηκαν κοινές, συμπεριλαμβανομένων φλαβονοειδών όπως η ισπιδουλίνη και ο πεντοζίτης της απιγενίνης, οι οποίοι δεν ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα της *S.verticillata*.[40] Ακόμη, τα εκχυλίσματα της προγενέστερης μελέτης ήταν πλούσια σε αβιετικά διτερπένια όπως η καρνοσόλη, η ροσμανόλη και ισομερή τους, τα οποία ταυτοποιήθηκαν στην *S. fruticosa* της παρούσας διπλωματικής εργασίας.[40]

4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των πολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC-DAD

4.3.1 Αποτελέσματα της επικύρωσης της αναλυτικής μεθόδου με HPLC-DAD

Η σημασία της επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου έχει τονιστεί από τη δεκαετία του '40, όταν η Αμερικανική Χημική Εταιρεία και η Merck & Co., έθεσαν το θέμα του πώς η μαθηματική και η στατιστική ανάλυση αποτελούν αναγκαία προϋπόθεση για την επιτυχή ανάπτυξη και προσαρμογή νέων αναλυτικών μεθόδων. Επιπλέον, επισημάνθηκε ότι η στατιστική ανάλυση δεδομένων ήταν ένα θέμα που παραμελούνταν από τους χημικούς που ανέπτυσσαν πειραματικές μεθόδους.[41]

Αυτό είχε ως αποτέλεσμα στις αρχές της δεκαετίας του '70, την δημοσίευση μιας σειράς άρθρων που τόνιζαν την ανάγκη υλοποίησης ενός συνεπούς συνόλου ορισμών για τον προσδιορισμό των επιδόσεων των αναπτυγμένων αναλυτικών μεθόδων και την αντικειμενική σύγκριση των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων των αναφερόμενων αναλυτικών μεθόδων. Αυτό ήταν το έναυσμα για την υλοποίηση της επικύρωσης μεθόδου στα αναλυτικά εργαστήρια από τα τέλη της δεκαετίας του '70 και την τρέχουσα παγκόσμια αναγνώριση ότι η επικύρωση μεθόδου αποτελεί σημαντικό στοιχείο σε κάθε εργαστήριο που ασχολείται με την ανάπτυξη μεθόδων.[41]

Για αυτούς τους λόγους, υπολογίστηκαν για την συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδο τα LLOD και LLOQ και βρέθηκαν ίσα με 16.20 και 49.09 μg/mL αντίστοιχα για το ροσμαρινικό οξύ, και 3.507 και 10.630 μg/mL για τον 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης.

4.3.2 Ποσοτικοποίηση των κυρίων συστατικών των εκχυλισμάτων των φύλλων και των ανθών της *Salvia verticillata*

Σύμφωνα με την ποιοτική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε παραπάνω, σχεδόν οι μισές ενώσεις των εκχυλισμάτων της *S. verticillata* είναι φαινολικά οξέα, και κυρίως παράγωγα του καφεϊκού οξέος. Για αυτό τον λόγο, επιλέχθηκε το ροσμαρινικό οξύ ως πρότυπη ένωση για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών οξέων και ο γλυκοζίτης της λουτεολίνης ως πρότυπη ένωση για την ποσοτικοποίηση των φλαβονοειδών.

Η ποσοτικοποίηση τους έγινε σύμφωνα με τις καμπύλες βαθμονόμησης των δύο πρότυπων ενώσεων που παρουσιάζονται στην υποενότητα 3.4.2. Για την κατασκευή τους αναλύθηκε για λόγους επαναληψιμότητας κάθε πρότυπη ένωση τρεις φορές, και χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος του εμβαδού τους για την καμπύλη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω, στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Ποσοτική σύσταση των εκχυλισμάτων των φύλλων και των ανθών της *S.verticillata*. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση (n=6)

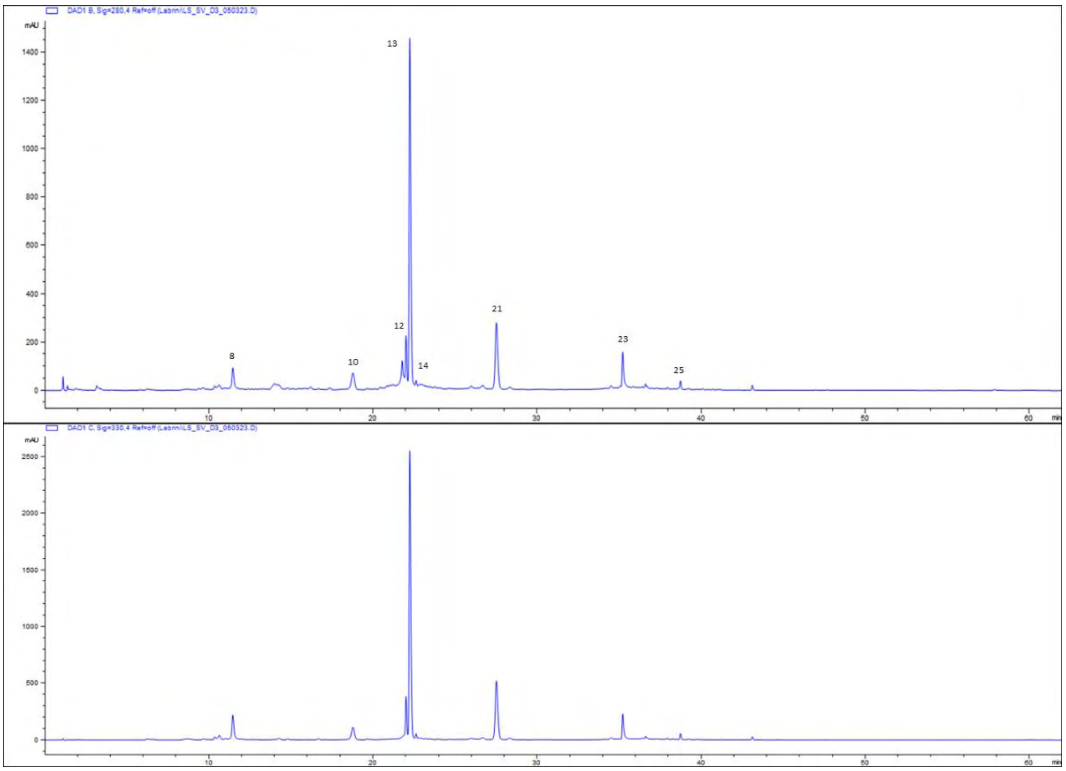
Wavelength (nm)	**Compound**	**Φύλλα *S. verticillata***		***Άνθη S. verticillata***	
		mg/g dry extract	mg/g DW	mg/g dry extract	mg/g DW

Phenolic acids[a]						
1	280	unknown (MW=592)[a]	13.44 ± 1.63	2.58 ± 0.31	15.27 ± 0.87	2.35 ± 0.13
2	280	rosmarinic acid[a]	223.12 ± 8.66	42.82 ± 1.66	183.00 ± 37.69	28.18 ± 5.80
3	280	*trans*-methyl rosmarinic acid[a]	63.03 ± 7.33	12.10 ± 1.41**	53.06 ± 1.50	8.17 ± 0.23**
4	280	dedihydro-salvianolic acid B/isomer[a]	19.42 ± 2.81	3.73 ± 0.53	20.77 ± 0.77	3.99 ± 0.15
Flavonoids[b]						
5	330	luteolin glucuronide	23.92 ± 2.20	9.18 ± 0.84**	19.55 ± 1.49	6.02 ± 0.46**
6	330	apigenin glucuronide[b]	29.71 ± 4.33	5.70 ± 0.83**	26.28 ± 1.42	4.05 ± 0.22**
7	330	hispidulin glucuronide[b]	6.97 ± 0.67*	2.68 ± 0.26***	5.98 ± 0.30*	1.84 ± 0.09***
8	330	circimaritin[b]	6.85 ± 0.80*	2.63 ± 0.31***	4.79 ± 0.42*	1.48 ± 0.13***
9	330	salvigenin[b]	5.27 ± 0.47**	2.02 ± 0.18***	4.04 ± 0.04**	1.24 ± 0.01***

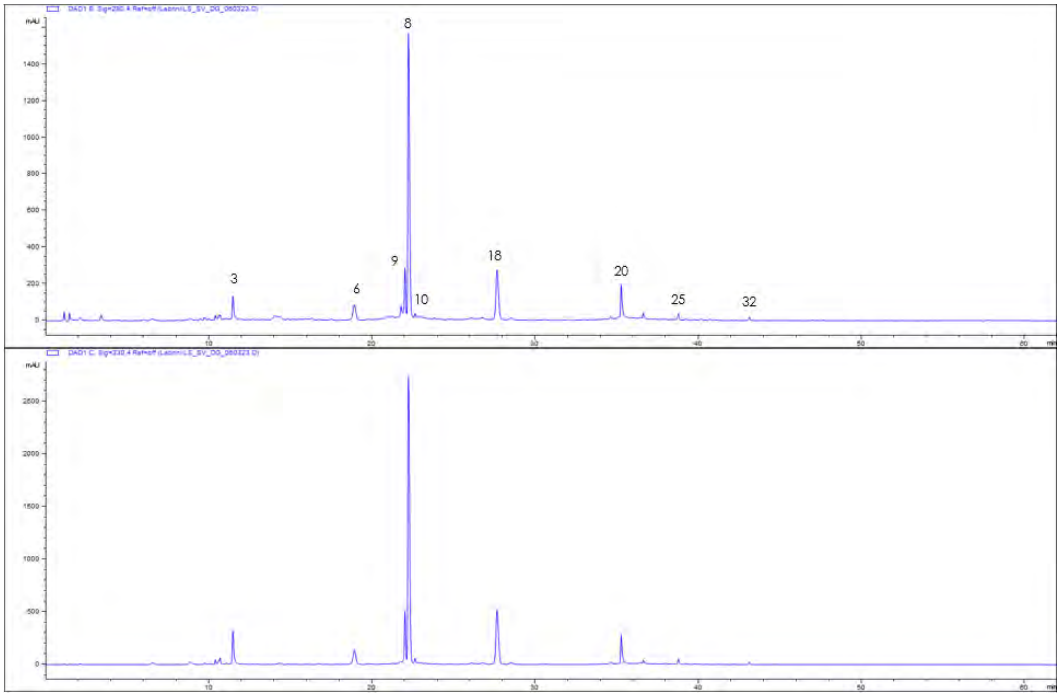
Οι εκθέτες υποδηλώνουν το πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό, ως εξής: α: ροσμαρινικό οξύ, β: γλυκοζίτης της λουτεολίνης

Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα: p value < 0,05 (*), p value < 0,01 (**), p value < 0,001 (***)

Το ροσμαρινικό οξύ είναι το κύριο συστατικό και στα δύο εκχυλίσματα της *S. verticillata,* όπως φαίνεται και στις Εικόνες 29 και 30 παρακάτω, και προσδιορίστηκε σε 223,12 ± 8,66 και 183,00 ± 37,69 mg/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος στα φύλλα και στα άνθη αντίστοιχα. Αυτές οι τιμές συμφωνούν με τη βιβλιογραφία για τα πολικά εκχυλίσματα της *S. verticillata,* ενώ σε σύγκριση με προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας για τα είδη *Salvia*, η περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ είναι αξιοσημείωτα υψηλή, ενισχύοντας προηγούμενες διαπιστώσεις ότι το είδος *S. verticillata* είναι ένα από τα είδη με την υψηλότερη συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος.[40,8,33,67]



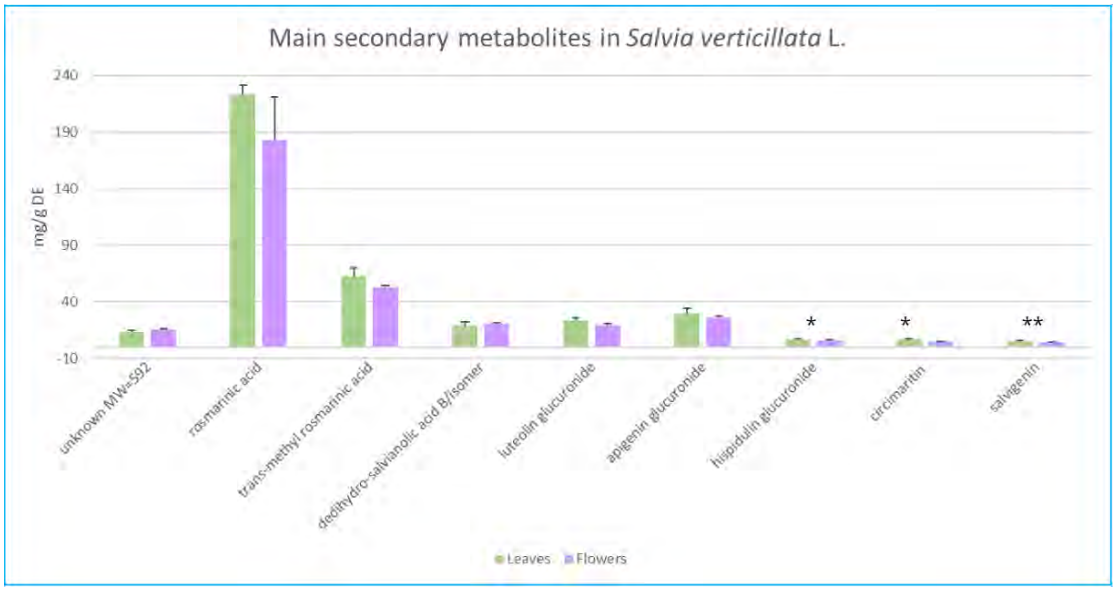
Εικόνα 29. Χρωματογράφημα με HPLC-DAD του εκχυλίσματος των φύλλων της *S. verticillata* στα 280 nm (πάνω μέρος) και 330 nm (κάτω μέρος). Η αρίθμηση των κύριων κορυφών ακολουθεί τον πίνακα 7.



Εικόνα 30. Χρωματογράφημα με HPLC-DAD του εκχυλίσματος των ανθών της *S. verticillata* στα 280 nm (πάνω μέρος) και 330 nm (κάτω μέρος). Η αρίθμηση των κύριων κορυφών ακολουθεί τον πίνακα 8.

Κατά αυτόν τον τρόπο, θα μπορούσε επίσης να εξηγηθεί η υψηλή συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε *trans*-μεθυλο ροσμαρινικό οξύ, το οποίο προσδιορίστηκε σε 63,03 ± 7,33 και 53,06 ± 1,50 mg/g ξηρού εκχυλίσματος για τα φύλλα και τα άνθη αντίστοιχα, ενώ σε προηγούμενη μελέτη μας σε διάφορα είδη *Salvia*, δεν ταυτοποιήθηκε σε κανένα είδος.[40] Επιπλέον, η ποσότητα του είναι σημαντικά υψηλότερη από εκείνη που έχει αναφερθεί προηγουμένως στην βιβλιογραφία για το είδος *S. verticillata*.[8] Το εκχύλισμα είχε επίσης σημαντική ποσότητα διυδροσαλβιανολικού οξέος Β/ισομερούς, το οποίο έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία για τα είδη *Salvia* μόνο μία φορά.[58]

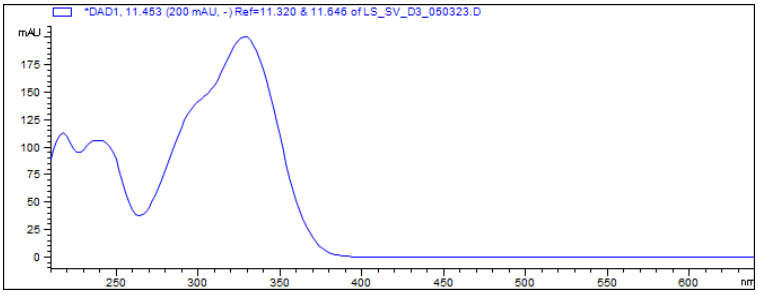
Στην Εικόνα 31, παρουσιάζονται σε γράφημα οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν στην *S. verticillata*, επισημαίνοντας τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.



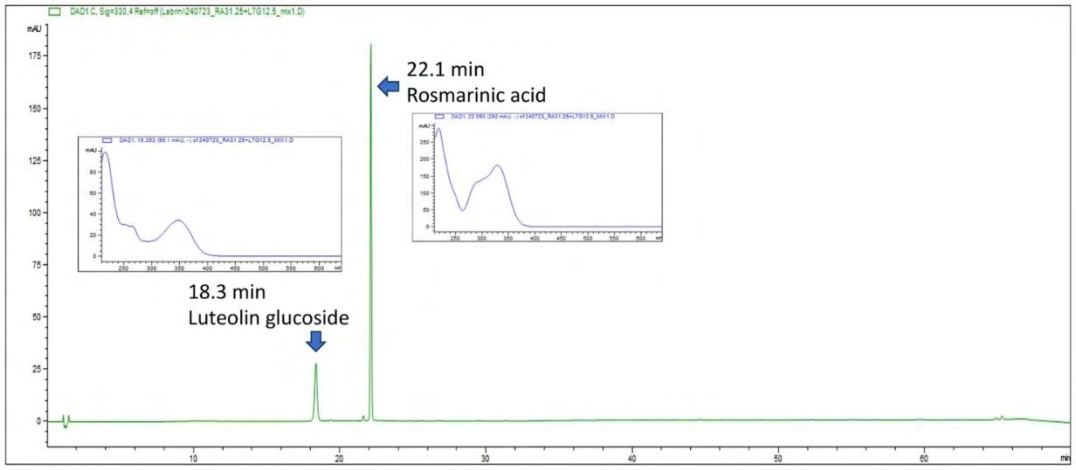
Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα: p value < 0,05 (*), p value < 0,01 (**), p value < 0,001 (***)

Εικόνα 31. Σύγκριση της ποσότητας (mg/g DE) των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών στα φύλλα και στα άνθη της *S. verticillata*

Ακόμη, η άγνωστη ένωση με μοριακό βάρος 592, η οποία αντιστοιχεί στην κορυφή 8 και 3 της Εικόνας 29 και 30 αντίστοιχα, επιλέχθηκε να ποσοτικοποιηθεί με το πρότυπο του ροσμαρινικού οξέος λόγω της ομοιότητας του φάσματος απορρόφησής τους. Το εν λόγω φάσμα απορρόφησης της άγνωστης ένωσης παρουσιάζεται στην Εικόνα 32, ενώ τον δύο πρότυπων ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση, στην Εικόνα 33.



Εικόνα 32. Φάσμα απορρόφησης της άγνωστης ένωσης με μοριακό βάρος 592 g/mol



Εικόνα 33. Χρωματογράφημα με HPLC-DAD των πρότυπων ενώσεων, ροσμαρινικό οξύ και γλυκοζίτης της λουτεολίνης

4.3.2 Ποσοτικοποίηση των συστατικών του εκχυλίσματος των φύλλων της *Salvia fruticosa* με HPLC-DAD και σύγκριση με τα εκχυλίσματα της *Salvia verticillata*

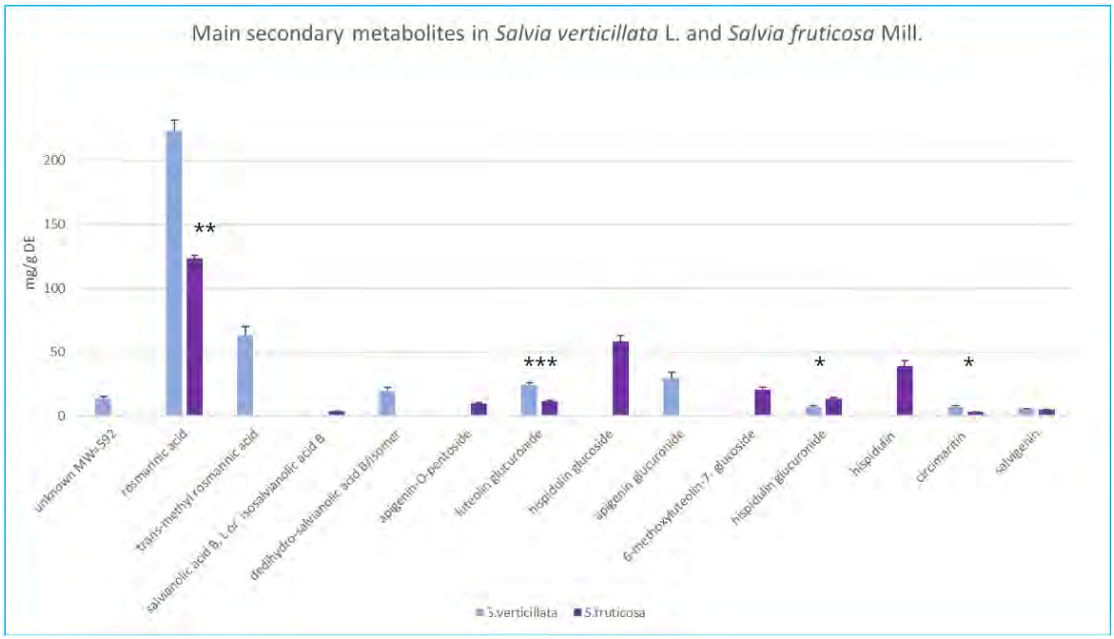
Παρακάτω, παρουσιάζονται τα ευρήματα που αφορούν την ποσοτικοποίηση των κύριων συστατικών του εκχυλίσματος της *S. fruticosa*, επισημαίνοντας τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την σύγκριση των τιμών με τα εκχυλίσματα των φύλλων της *S. verticillata* (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Ποσοτική σύσταση του εκχυλίσματος των φύλλων της *S. fruticosa*. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση (n=3)

Wavelength (nm)		Compound	Φύλλα *S. fruticosa*	
			mg/g dry extract	mg/g DW
Phenolic acids[a]				
1	280	rosmarinic acid[a]	123.2 ± 2.49**	31.85 ± 0.64**
2	280	salvianolic acid B, L or isosalvianolic acid B[a]	3.50 ± 0.36	0.90 ± 0.09
Flavonoids[b]				
3	330	salvigenin[b]	5.07 ± 0.12	1.31 ± 0.03***
4	330	luteolin glucuronide [b]	11.57 ± 0.57***	2.99 ± 0.15***
5	330	hispidulin glucoside [b]	58.36 ± 4.67	15.09 ± 1.21
6	330	hispidulin glucuronide[b]	13.37 ± 1.33*	3.46 ± 0.34
7	330	circimaritin[b]	3.27 ± 0.02*	0.85 ± 0.006***
8	330	apigenin-O-pentoside[b]	9.54 ± 0.69	2.47 ± 0.18
9	330	6- methoxyluteolin-7- glucoside (nepitrin)[b]	20.18 ± 1.88	5.22 ± 0.48
10	330	hispidulin[b]	39.30 ± 3.66	10.16 ± 0.95

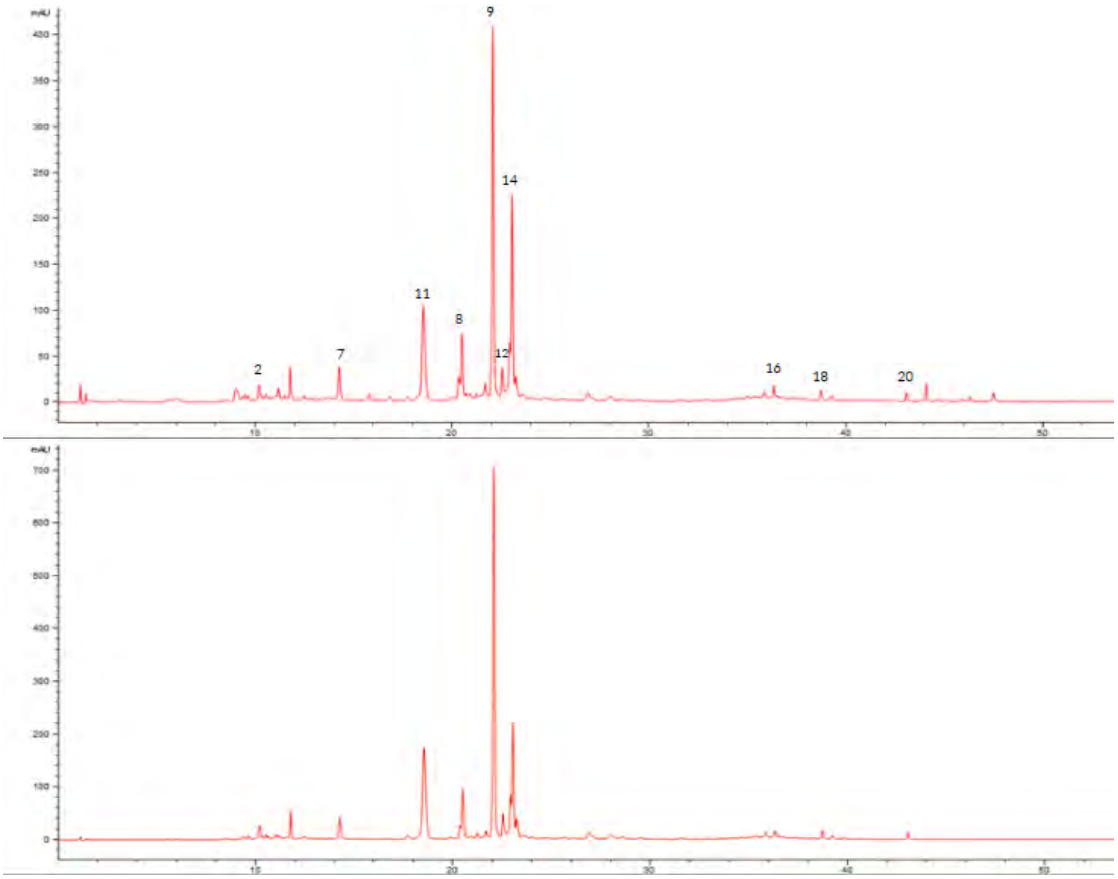
Οι εκθέτες υποδηλώνουν το πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό, ως εξής: a: ροσμαρινικό οξύ, b: γλυκοζίτης της λουτεολίνης

Στην Εικόνα 34, παρουσιάζονται σε γράφημα οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν στα φύλλα της *S. verticillata* και *S. fruticosa*, επισημαίνοντας τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.



Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα: p value < 0,05 (*), p value < 0,01 (**), p value < 0,001 (***)

Εικόνα 34. Σύγκριση της ποσότητας (mg/g DE) των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών στα φύλλα της *S. verticillata* και της *S. fruticosa*



Εικόνα 35. Χρωματογράφημα με HPLC-DAD του εκχυλίσματος των φύλλων της *S. fruticosa* στα 280 nm (πάνω μέρος) και 330 nm (κάτω μέρος). Η αρίθμηση των κύριων κορυφών ακολουθεί τον πίνακα 9.

Από τα παραπάνω παρατηρείται, ότι λόγω παρουσίας περισσότερων φλαβονοειδών σε σχέση με την *S. verticillata,* η χρήση των δύο αναλυτικών προτύπων που αναφέρθηκαν παραπάνω κατέληξαν στην ποσοτικοποίηση οκτώ (8) εξ' αυτών και μόνο δύο (2) φαινολικών οξέων. Η ποσότητα κάποιων φλαβονοειδών συμφωνεί με αποτελέσματα παλαιότερης μελέτης μας που αφορά το είδος *S. fruticosa*.[40] Συγκεκριμένα, η ποσότητα της σαλβιγενίνης βρέθηκε ίση με 1.43 mg/g DW έναντι 1.31 mg/g DW που βρέθηκε στην παρούσα εργασία, αντιστοίχως και το γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης βρέθηκε σε ποσότητα ίση με 2.99 mg/g DW, τιμή που συμφωνεί με την παλαιότερη μελέτη που κυμαινόταν από 2.16 έως 1.14 mg/g DW.[40] Ακόμη, η ισπιδουλίνη, η οποία φαίνεται να είναι σε σημαντική ποσότητα στο εκχύλισμα της *S. fruticosa* από την Τήνο, στην παλαιότερη μελέτη χαρακτηρίστηκε ως μη ποσοτικοποιήσιμη, ομοίως με την νεπιτρίνη.[40]

Τέλος, η ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος της *S. fruticosa* της παρούσας μελέτης φαίνεται να είναι σχεδόν τριπλάσια σε σχέση με την παλαιότερη

μελέτη.[40] Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως η προέλευση του φυτικού υλικού, δηλαδή Τήνος έναντι Φούρνων Ικαρίας και Ροδινή Αχαΐας, η εποχή συλλογής του καθώς και η παλαιότητα του. [40] Τόσο στη συγκεκριμένη μελέτη όσο και στην παλαιότερη, η συλλογή του φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια του καλοκαιριού, συγκεκριμένα τον Ιούλιο.[40] Ωστόσο, στην παρούσα εργασία, η ανάλυση του πολικού εκχυλίσματος της *S. fruticosa* από την Τήνο, έγινε μόλις λίγους μήνες μετά την συλλογή του φυτικού υλικού, οπότε είναι πιθανόν να έχει παίξει σημαντικό ρόλο στην σύσταση.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στο γεγονός ότι στο εκχύλισμα των φύλλων της *S. fruticosa*, η ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος είναι σχεδόν η μισή από ότι στα εκχυλίσματα των φύλλων της *S. verticillata*.

4.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των εκχυλισμάτων της *Salvia verticillata* και *Salvia fruticosa* και σύγκριση μεταξύ των δύο ειδών

Κατά την ανάλυση του εκχυλίσματος εξανίου που προέκυψε από το πειραματικό πρωτόκολλο της υποενότητας 3.5.2 με GC-FID, ταυτοποιήθηκαν 9 λιπαρά οξέα στα εκχυλίσματα των φύλλων και των ανθών της *S. verticillata* αντίστοιχα, ενώ στα εκχυλίσματα των φύλλων της *S. fruticosa* ταυτοποιήθηκαν 12 λιπαρά οξέα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποιημένων λιπαρών οξέων στα εκχυλίσματα των φύλλων, ανθών της *S. verticillata* και των φύλλων της *S. fruticosa*. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση (n=3).

Λιπαρό οξύ		**Φύλλα *S. verticillata***		**Άνθη *S. verticillata***		**Φύλλα *S. fruticosa***	
		mg / L	mg/g DW	mg / L	mg/g DW	mg / L	mg/g DW
caprylic acid	**C8:0**	14.53 ± 0.63	1.09 ± 0.04	19.19 ± 0.97*	1.44 ± 0.01*	17.26 ± 1.43	1.29 ± 0.09
capric acid	**C10:0**	8.78 ± 0.83	0.66 ± 0.05	7.90 ± 0.20	0.59 ± 0.01	9.57 ± 0.14	0.72 ± 0.01

undecylic acid	**C11:0**	-	-	-	-	4.60 ± 0.05	0.34 ± 0.03
lauric acid	**C12:0**	6.80	0.51	-	-	8.68 ± 0.22	0.65 ± 0.01
tridecylic acid	**C13:0**	-	-	6.27	0.47	4.98 ± 0.13	0.37 ± 0.01
myristic acid	**C14:0**	8.88 ± 0.36	0.67 ± 0.02	8.16 ± 0.21	0.61 ± 0.01	6.47	0.49
pentadecanoic acid	**C15:0**	5.43 ± 0.26	0.41 ± 0.02	4.69	0.35	-	-
palmitic acid	**C16:0**	38.61 ± 1.10	2.90 ± 0.07	36.08 ± 2.80	2.71 ± 0.02	33.74 ± 0.53**	2.53 ± 0.03**
stearic acid	**C18:0**	13.72 ± 1.95	1.03 ± 0.01	15.71 ± 1.62	1.18 ± 0.01	14.08 ± 0.18	1.06 ± 0.01
linoleic acid	**C18:2**	30.69 ± 7.34	2.30 ± 0.04	53.97 ± 5.38*	4.05 ± 0.03*	25.10 ± 0.40	1.88 ± 0.02
α-linolenic acid	**C18:3n3**	19.60 ± 3.41	1.47 ± 0.02	26.33 ± 3.69	1.97 ± 0.02	37.08 ± 0.30*	2.78 ± 0.02*
eicosadienoic acid	**C20:2**	-	-	-	-	11.82 ± 0.21	0.89 ± 0.01
docosadienoic acid	**C22:2**	-	-	-	-	39.09	2.93

Οι τιμές χωρίς τυπική απόκλιση δηλώνουν ότι προσδιορίστηκε σε ένα μόνο βιολογικό δείγμα

Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα: p value < 0,05 (*), p value < 0,01 (**), p value < 0,001 (***)

Οι συγκρίσεις αφορούν φύλλα-άνθη S. verticillata και φύλλα S. verticillata και S. fruticosa

Από τα παραπάνω προκύπτει επίσης πως το συνολικό περιεχόμενο σε λιπαρά οξέα για τα φύλλα, άνθη της *S. verticillata* και τα φύλλα της *S. fruticosa* είναι 147.05 mg/L,178.31 mg/L και 212.48 mg/L αντίστοιχα. Ακόμη, ανάγοντας την παραπάνω ποσότητα στο αρχικό ξηρό φυτό (DW) το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση (80 mg) προκύπτει πως τα άνθη έχουν μεγαλύτερο ποσοστό λιπαρών οξέων (1,34%) από ότι τα φύλλα (1,10%) της *S. verticillata*. Ωστόσο, τα φύλλα της *S. fruticosa* περιέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό σε λιπαρά οξέα (1,59%) από τα υπόλοιπα φυτικά υλικά που μελετήθηκαν. Καμία από τις παραπάνω διαφορές δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική.

Το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στην ανάλυση των λιπαρών οξέων της *S. verticillata* και κατ' επέκταση της *S. fruticosa* για διάφορους λόγους. Αρχικά, οι σπόροι chia, όπως είναι ευρέως γνωστοί, προέρχονται από ένα συγκεκριμένο είδος φασκόμηλου, την *Salvia hispanica* L. Αυτήν την περίοδο, το δυναμικό της χρήσης των σπόρων chia στην ανθρώπινη διατροφή είναι τόσο ευρύ που το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει εστιάσει στην ανάπτυξη νέων τρόπων που θα επιτρέπει την ενσωμάτωση τους ως πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, για παράδειγμα ωμέγα-3-λιπαρών οξέων, αλλά και ως πρωτεΐνης σε ποτά, συμπληρώματα διατροφής και άλλα προϊόντα. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια, οι πολυακόρεστες λιπαρές ουσίες των σπόρων chia έχουν εκτιμηθεί εκτενώς για τα οφέλη τους στα καλλυντικά σκευάσματα. Διάφορες μελέτες υποδεικνύουν ότι

αυτές οι λιπαρές ουσίες εκδηλώνουν πολλές βιολογικές λειτουργίες και στο δέρμα, όπως η πρόληψη της διαδερμικής απώλειας νερού, η διατήρηση του επιδερμιδικού φραγμού της κεράτινης στιβάδας και η διαταραχή της μελανογένεσης στα επιδερμικά μελανοκύτταρα.[68]

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 12, το παλμιτικό οξύ είναι το κύριο λιπαρό οξύ που περιέχεται στα φύλλα της *S. verticillata,* ενώ στα άνθη είναι το λινολεϊκό οξύ. Τα δύο μέρη του φυτού της *S. verticillata* παρουσιάζουν γενικά ομοιότητες όσον αφορά την σύσταση τους σε λιπαρά οξέα, τα οποία σε σύγκριση με τα φύλλα της *S. fruticosa* παρουσιάζουν διαφορετική σύσταση, με κύριο λιπαρό οξύ το δοκοσαδιενοϊκό οξύ.

Τα αποτελέσματα για την *S. fruticosa* φαίνεται να συμφωνούν με κάποια ευρήματα μιας δημοσιευμένης μελέτης, σύμφωνα με την οποία τα κύρια λιπαρά οξέα που βρέθηκαν σε ένα πληθυσμό της *S. fruticosa* από την Τουρκία, είναι το ελαϊκό οξυ, το παλμιτελαϊκό οξύ, το στεατικό οξύ, το λινελαϊκό οξύ και σε μικρότερη ποσότητα το μυριστικό οξύ, το παλμιτικό οξύ και το αραχιδονικό οξύ.[69]

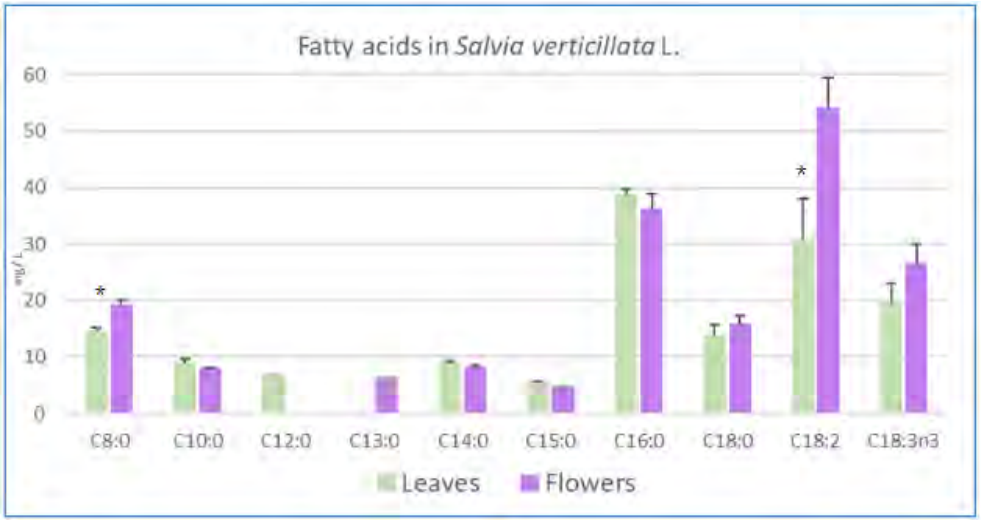
Ωστόσο, το ενδιαφέρον της παρούσας διπλωματικής εργασίας επικεντρώνεται στην *S.verticillata*, λόγω της περιορισμένης έρευνας γύρω από αυτήν. Και στα δύο μέρη του φυτού βρέθηκαν τα αναμενόμενα λιπαρά οξέα του γένους *Salvia,* δηλαδή το λινελαϊκό οξύ, το λινολενικό οξύ, το μυριστικό οξύ, το παλμιτικό οξύ και το πενταδεκανοϊκό οξύ, ενώ δεν ταυτοποιήθηκε καθόλου το ελαϊκό οξύ. Συνολικά, τα δύο μέρη διαφέρουν μόνο ως προς το λαυρικό οξύ (φύλλα) και το τριδεκυλικό οξύ (άνθη).

Η ποσότητα σε κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα διαφέρει ανάμεσα στα φύλλα και στα άνθη, καθώς τα φύλλα εμφανίζουν μεγαλύτερη ποσότητα κορεσμένων λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με την δημοσιευμένη μελέτη που αφορά την ανάλυση φύλλων ενός πληθυσμού της *S. verticillata* από την Τουρκία, το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων ανέρχεται σε 26,50 %, ενώ το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων σε 73,50 %. Αντίθετα, στην δική μας μελέτη, φαίνεται πως τα φύλλα περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων το οποίο ανέρχεται σε 65,80 %. Όσον αφορά τα άνθη, περιέχουν μικρότερο ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων από ότι τα φύλλα, το οποίο ανέρχεται σε 54,97%. Σε κανένα από τα δύο μέρη όμως δεν φαίνεται να είναι πιο

μεγάλο το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως στην παραπάνω μελέτη, γεγονός που διαφοροποιεί τα αποτελέσματά μας.[18]

Τέλος, στην δική μας μελέτη δεν βρέθηκε το καπροϊκό, το παλμιτελαϊκό, το ελαϊδικό, το εικοσαδιενοϊκό (eicosadienoic acid), το γονδοϊκό (gondoic acid) και το εξακοσανοϊκό οξύ (hexacosanoic acid). Αντίθετα, στην δημοσιευμένη μελέτη δεν βρέθηκε το καπρυλικό, το καπρικό και το τριδεκυλικό οξύ.[18]

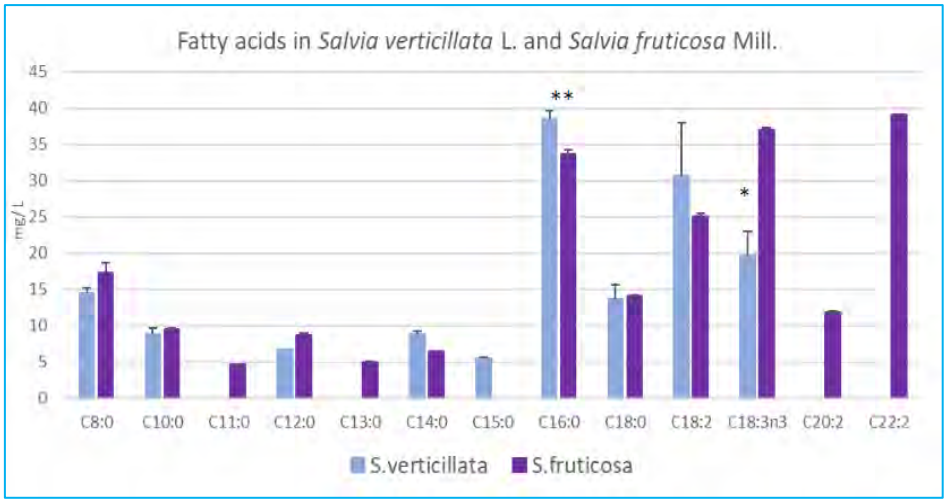
Στην Εικόνα 36, παρουσιάζονται σε γράφημα τα διάφορα λιπαρά οξέα που ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν στην *S. verticillata,* επισημαίνοντας τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.



Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα: p value < 0,05 (*), p value < 0,01 (**), p value < 0,001 (***)

Εικόνα 36. Σύγκριση της ποσότητας (mg/L) των λιπαρών οξέων στα φύλλα και στα άνθη της *S. verticillata*

Παρακάτω, στην Εικόνα 37 συγκρίνονται και τα αποτελέσματα που αφορούν τα εκχυλίσματα των φύλλων της *S. verticillata* και της *S. fruticosa*.



Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα: p value < 0,05 (*), p value < 0,01 (**), p value < 0,001 (***)

Εικόνα 37. Σύγκριση της ποσότητας (mg/L) των λιπαρών οξέων στα φύλλα της *S. verticillata* και *S. fruticosa*

4.5 Αντιοξειδωτική ικανότητα και φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων

Οι φασματοσκοπικές δοκιμές SET (Single Electron Transfer), περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την μέθοδο Folin-Ciocalteu και την μέθοδο ελέγχου αντιοξειδωτικής δράσης FRAP, στις οποίες λαμβάνει χώρα μία αναγωγή λόγω προσφοράς ηλεκτρονίου από κάποιον αντιοξειδωτικό παράγοντα. Έτσι, ο βαθμός αλλαγής χρώματος συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός δείγματος.[70]

Η μέθοδος DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) αφορά την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών από κάποιο αντιοξειδωτικό. Σε αντίθεση με την μέθοδο Folin-Ciocalteu και FRAP, λαμβάνει χώρα εκτός της αναγωγής λόγω προσφοράς ηλεκτρονίου (SET), και η μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου (HAT or Hydrogen Atom Transfer) από το αντιοξειδωτικό στο σύμπλοκο DPPH. Με άλλα λόγια, η μέθοδος DPPH αφορά την αποσταθεροποίηση ενός σταθερού χρωμοφόρου, η οποία σε αυτήν την περίπτωση προκαλεί τον αποχρωματισμό. [70]

4.5.1 Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων της *Salvia verticillata* και της *Salvia fruticosa*

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μεθόδους FRAP, DPPH και TPC και αφορούν την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων των φύλλων, ανθών της

S. verticillata και των φύλλων της *S. fruticosa* συνοψίζονται στον Πίνακα 13, επισημαίνοντας τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Πίνακας 13. Αντιοξειδωτική δράση και φαινολικό περιεχόμενο των φύλλων, ανθών της *S. verticillata* και των φύλλων της *S. fruticosa*. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση (n=3).

Αντιοξειδωτική ικανότητα	**Φύλλα *S. verticillata***	**Άνθη *S. verticillata***	**Φύλλα *S. fruticosa***
FRAP (mg $FeSO_4$*7H_2O/ g DW)	1192.1 ± 91.6	1084.3 ± 68.8	809.0 ± 67.4*
DPPH IC_{50} (μg/mL)	15.8	14.2	21.5
TPC (mg GAE / g DW)	359.6 ± 11.7	355.5 ± 9.3	232.4 ± 3.40***

Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα: p value < 0,05 (*), p value < 0,01 (**), p value < 0,001 (***)
Οι συγκρίσεις αφορούν φύλλα-άνθη *S. verticillata* και φύλλα *S. verticillata* και *S. fruticosa*

Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων των φύλλων και των ανθών της *S. verticillata* είναι παρόμοια, όπως και το φαινολικό περιεχόμενο αυτών, αφού συγκρίνοντας τα αποτελέσματα δεν προκύπτει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης (70 % aq. MeOH), είναι πιθανό να έχει παίξει ρόλο στην παρόμοια αντιοξειδωτική δράση των δύο εκχυλισμάτων. Σύμφωνα με τους Ana Alimpic et al., αν ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιηθεί η αιθανόλη αντί της μεθανόλης, το εκχύλισμα των φύλλων εμφανίζει διπλάσιο φαινολικό περιεχόμενο από των ανθών, ενώ στην περίπτωση της μεθανόλης εμφανίζουν παρόμοιο.[71]

Συγκεκριμένα, το IC_{50} των εκχυλισμάτων έναντι της ελεύθερης ρίζας DPPH ήταν χαμηλότερο από ό,τι σε άλλες μελέτες για πολικά εκχυλίσματα της *S. verticillata* στο παρελθόν [8,67] και χαμηλότερο από του βουτυλιωμένου υδροξυτολουολίου (BHT), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο αναφοράς (IC_{50} = 94,6 μg/mL) στην παρούσα μελέτη. Το IC_{50} του βουτυλιωμένου υδροξυτολουολίου (BHT) ωστόσο βρέθηκε μεγαλύτερο από τιμές της βιβλιογραφίας που ήταν της τάξης των 18.0 μg/mL.[67,72]. Επιπλέον, το IC_{50} των εκχυλισμάτων της *S. verticillata* βρέθηκε χαμηλότερο από ό,τι σε άλλα είδη *Salvia*, όπως την *S. officinalis* προερχόμενη από δύο περιοχές του Μαρόκο με IC_{50} ίσο

με 40 και 75 μg/mL.[73] Τέλος, βρέθηκε χαμηλότερο από το IC_{50} της *S.sclarea* και της *S.euphratica* Montbret and Aucher από την Τουρκία ίσο με 23,4 και 20,7 μg/mL αντίστοιχα. [72]

Όσον αφορά το φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων, βρέθηκε υψηλότερο από άλλες μελέτες που αφορούν πολικά εκχυλίσματα της *S. verticillata.* Συγκεκριμένα το φαινολικό περιεχόμενο μεθανολικού και υδατικού εκχυλίσματος πληθυσμού της *S. verticillata* από την Τουρκία βρέθηκε ίσο με 116,23 και 119,11 mg GAE / g DW αντίστοιχα, ενώ σε άλλη μελέτη μεθανολικού εκχυλίσματος πληθυσμού της *S. verticillata* επίσης από την Τουρκία, ήταν ίσο με 347,04 mg GAE / g DW.[33,74] Ακόμη, μεθανολικό εκχύλισμα της *S. verticillata* και *S.microstegia* από την Τουρκία σε μελέτη των Erbil et al., βρέθηκε ίσο με 119,45 και 118,08 mg GAE / g DW αντίστοιχα.[27] Επομένως, από την μελέτη μας προκύπτει πως το φαινολικό περιεχόμενο της *S. verticillata* είναι μεγαλύτερο και από άλλα είδη *Salvia*, όπως η *S. microstegia,* καθώς και μεγαλύτερο από εκείνο της *S. tomentosa,* αφού σύμφωνα με τους Kiliçkaya Selvï et al., περιέχει τρεις φορές λιγότερες φαινολικές ενώσεις από την *S.verticillata*.[74]

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση του είδους *S.fruticosa*, τα ευρήματα μας φαίνεται να συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας, αφού σύμφωνα με τους Dawra et al. βρέθηκε IC_{50} ίσο με 19.4 μg/mL. [75]

Όσον αφορά το φαινολικό περιεχόμενο της *S. fruticosa*, βρέθηκε σχεδόν διπλάσιο από μεθανολικό εκχύλισμα ενός πληθυσμού του είδους που προέρχεται από το Λίβανο με φαινολικό περιεχόμενο ίσο με 122,67 μg/mL mg GAE / g DW.[24] Ωστόσο, βρέθηκε μικρότερο από αντίστοιχο εκχύλισμα πληθυσμού προερχόμενου από την Ελλάδα, συγκεκριμένα την Θεσσαλονίκη, που ήταν ίσο με 319,19 mg GAE / g DW.[76]

Τέλος, εστιάζοντας στην σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των ειδών *S. verticillata* και *S. fruticosa*,, αν και δεν φαίνεται να υπάρχει μεγάλη διαφορά αναφορικά με το IC_{50}, το φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων των φύλλων τους φαίνεται να έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Αυτή η διαφορά, είναι πιθανό να οφείλεται στην διπλάσια ποσότητα ροσμαρινικού οξέος που περιέχεται στο εκχύλισμα της *S. verticillata*, καθώς και στα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά που έχουν ταυτοποιηθεί και ποσοτικοποιηθεί στο είδος και δεν βρέθηκαν ή ήταν σε ίχνη στο εκχύλισμα της *S. fruticosa*.[33]

Για τον παραπάνω ισχυρισμό είναι σημαντική η εκτενής μελέτη των Trivellini et al., η οποία αφορά την συνεισφορά κάποιων φαινολικών ενώσεων στις βιολογικές ιδιότητες συγκεκριμένων γενών της οικογένειας Lamiaceae, Το γένος *Salvia*, μεταξύ άλλων, εμφάνισε εξαιρετικά υψηλή αντιοξειδωτική ιδιότητα, η οποία πλέον θεωρείται πως σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος και των υδροξυκινναμωμικών παραγώγων.[10]

4.6 Αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης από το εκχύλισμα των φύλλων της *Salvia verticillata*

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.8.2, έγινε διερεύνηση του κατάλληλου χρόνου επώασης, της κατάλληλης συγκέντρωσης του ενζύμου, της σειράς με την οποία προστίθενται τα αντιδραστήρια και της αναλογία μεταξύ τους.

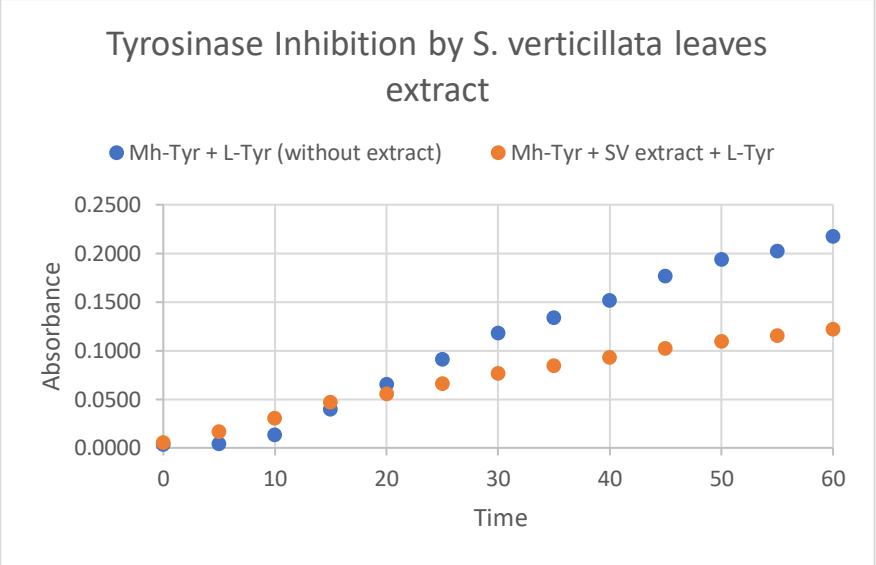
4.6.1 Διερεύνηση των τελικών συνθηκών του πειραματικού πρωτοκόλλου

Αρχικά, διερευνήθηκε η συγκέντρωση του ενζύμου σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Δοκιμάστηκε συγκέντρωση 250, 500 και 700 υ/mL του ενζύμου της τυροσινάσης έναντι διαλύματος L-τυροσίνης συγκέντρωσης 0.1Μ. Ακόμη, δοκιμάστηκε διαφορετική σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων στην πλάκα. Συγκεκριμένα, εστιάσαμε στο βήμα της προσθήκης της L-τυροσίνης, δοκιμάζοντας προσθήκη του υποστρώματος πριν και μετά την προσθήκη του ενζύμου. Το συμπέρασμα ήταν πως το υπόστρωμα είναι καλύτερο να προστίθεται στο τέλος, αφού είναι πιθανό αν αφεθεί στο κελίο με την μεθανόλη και το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) να ξεκινήσει ενδεχομένως η κατακρήμνιση του. Το παραπάνω διαπιστώθηκε από την μέτρηση της απορρόφησης, αφού σε όλες τις δοκιμές μας γνώμονας ήταν η απορρόφηση του εκάστοτε κελίου. Για παράδειγμα, με συγκέντρωση ενζύμου 250 υ/mL, η απορρόφηση του κελίου ήταν τόσο χαμηλή που δεν ήταν δυνατό να συγκριθεί τελικά με εκείνη του κελίου που είχε προστεθεί δείγμα.

Πιο αναλυτικά, μετρώντας την απορρόφηση στα 492 nm κάθε πέντε λεπτά κατά την διάρκεια μίας ώρας, προέκυψε πως η κατάλληλη συγκέντρωση ενζύμου έτσι ώστε η απορρόφηση να αυξάνεται ραγδαία μέχρι τα 30 λεπτά ενώ κοντά στα 40 λεπτά να ξεκινάει ένα πλατώ, είναι ίση με 700 υ/mL. Αυτό υποδεικνύει πως μεγάλο μέρος της τυροσίνης είχε οξειδωθεί σε ντοπακινόνη και

πράγματι ο κατάλληλος χρόνος για να μετρήσουμε την αναστολή του ενζύμου από ένα φυτικό εκχύλισμα ή το κοζικό οξύ ήταν μετά από 30 λεπτά επώασης.

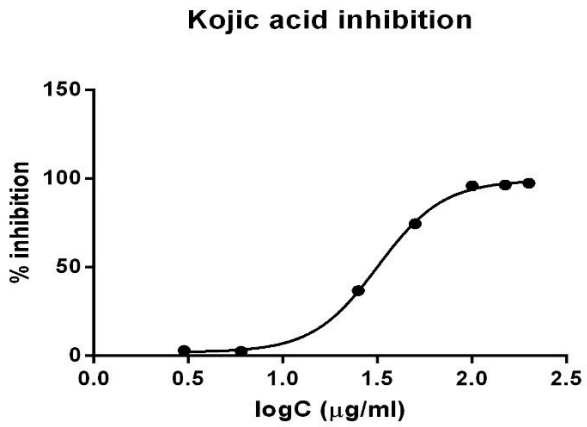
Παράλληλα, αφού επιλέχθηκαν οι τελικές συνθήκες του πρωτόκολλου, δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις εκχυλίσματος από 3 έως 1000 μg/mL. Η μεγαλύτερη αναστολή του ενζύμου που επιτεύχθηκε από το εκχύλισμα βρέθηκε ίση με 35,13 % σε συγκέντρωση εκχυλίσματος 200 μg/mL. Τα παραπάνω φαίνονται στην Εικόνα 38.



Εικόνα 38. Διάγραμμα απορρόφησης - χρόνου της πορείας της αντίδρασης του τυροσίνης-τυροσινάσης (μπλε) και της τυροσινάσης παρουσία του εκχυλίσματος των φύλλων (πορτοκαλί) με συγκέντρωση 200 μg/mL και υποστρώματος

Μετά τα 30 λεπτά, με προσθήκη του εκχυλίσματος στην αντίδραση του ενζύμου-υποστρώματος, παρατηρείται σαφώς μικρότερος ρυθμός αύξησης της απορρόφησης περίπου στο μισό, με άλλα λόγια το εκχύλισμα φαίνεται πως δρα ως αναστολέας του ενζύμου.

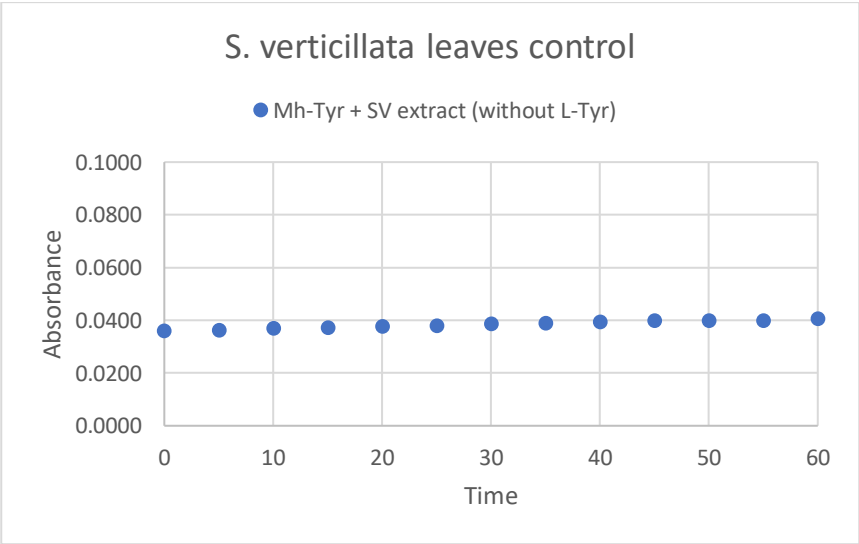
Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω υπολογίστηκε το IC_{50} του κοζικού οξέος, ο οποίος είναι γνωστός αναστολέας του ενζύμου κατά την βιβλιογραφία, στα 30 λεπτά αντίδρασης μέσω του προγράμματος Graphpad Prism 6 και βρέθηκε ίσο με 31.77 μg/mL, τοποθετώντας το κοντά σε τιμές διαθέσιμες στην βιβλιογραφία, ενδεικτικά ίσες με 25,23,13,14 και 18,87 (312,8 μM) μg/mL.[77,78,79]



Εικόνα 39. Διάγραμμα της αναστολής της τυροσινάσης από το κοζικό οξύ

4.6.2 Έλεγχος της δράσης των εκχυλισμάτων ως εναλλακτικό υπόστρωμα για την τυροσινάση

Για να ελεγχθεί η πιθανή δράση του εκχυλίσματος ως εναλλακτικό υπόστρωμα, παρακολουθήσαμε την πορεία της αντίδρασης ενζύμου-εκχυλίσματος με το χρόνο χωρίς να προσθέσουμε L-τυροσίνη, μετρώντας την απορρόφηση στα 492 nm κάθε πέντε λεπτά κατά την διάρκεια μίας ώρας όπως φαίνεται στην Εικόνα 40.



Εικόνα 40. Διάγραμμα απορρόφησης – χρόνου της πορείας της αντίδρασης του ενζύμου με το control του εκχυλίσματος των φύλλων

Παρατηρούμε ότι η απορρόφηση του control δεν μεταβάλλεται κατά την διάρκεια μίας ώρας, επομένως το εκχύλισμα δεν δρα ως εναλλακτικό υπόστρωμα για το ένζυμο.

4.6.3 Αποτελέσματα αναστολής του ενζύμου από το εκχύλισμα των φύλλων της *Salvia verticillata*

Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα που αφορούν την % αναστολή της τυροσινάσης από τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος και του κοζικού οξέος αντίστοιχα.

Πίνακας 14. Ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων των φύλλων και του κοζικού οξέος έναντι στην τυροσινάση. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση (n=3)

Αναστολέας	**% Αναστολή της τυροσινάσης**		
	6 μg/mL	**50 μg/mL**	**200 μg/mL**
Εκχύλισμα φύλλων *S.verticillata*	21.53 ± 2.80	32.29 ± 2.43	35.13 ± 1.44
Κοζικό οξύ	2.54 ± 0.97	74.62 ± 0.88	97.46 ± 1.76

Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αφορά την πιθανή αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης από μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ενός πληθυσμού της *S. verticillata* από την Ελλάδα, καθώς στην βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες διαθέσιμες μελέτες που αφορούν την αναστολή της τυροσινάσης από το συγκεκριμένο είδους φασκόμηλου.

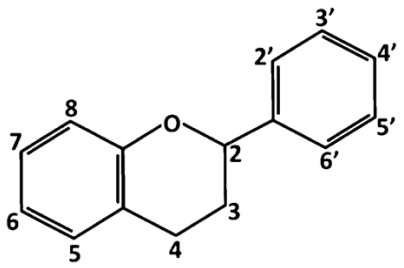
Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Zengin et al, το μεθανολικό εκχύλισμα της *S. verticillata* φαίνεται να μην εμφανίζει καθόλου αναστολή έναντι του ενζύμου, σε συμφωνία με τα υπόλοιπα μεθανολικά εκχυλίσματα της δημοσίευσης. Στην συγκεκριμένη μελέτη, την μεγαλύτερη αναστολή εμφάνισε το υδατικό εκχύλισμα της *S. verticillata*.[33]

Αντίθετα, στην δική μας περίπτωση το εκχύλισμα των φύλλων προέρχεται από εκχύλιση με 70 % (aq.) MeOH, προκαλεί αναστολή του ενζύμου που φτάνει το 35.13 % σε συγκέντρωση 200 μg/mL, αλλά βέβαια δε δίνει δοσοεξαρτώμενη αναστολή. Αυτό το αποτέλεσμα φαίνεται να συμφωνεί με άλλη μελέτη που αφορά το είδος, πιο συγκεκριμένα αιθανολικό εκχύλισμα εναέριων τμημάτων της *S.verticillata*, το οποίο σε συγκέντρωση 100 μg/mL προκαλεί 35,94 %

αναστολή του ενζύμου. [80] Ακόμη, στη βιβλιογραφία αναφέρεται μεθανολικό εκχύλισμα της *S.officinalis,* το οποίο φαίνεται να προκαλεί 32,3 % αναστολή του ενζύμου σε συγκέντρωση 100 και 200 μg/mL. [37]

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα αναστολέων της τυροσινάσης και έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια. Η παρουσία και η θέση της υποκατάστασης στο μόριο της μπορεί να κρίνει εάν μία πολυφαινόλη ενδέχεται να δράσει ως αναστολέας του ενζύμου. Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή φαίνεται να αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως οι πιο ισχυροί αναστολείς, με το ενδιαφέρον να επικεντρώνεται στην εύρεση του μηχανισμού με τον οποίο δρουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, καθώς και στο πως μία λειτουργική ομάδα μπορεί να παίξει κρίσιμο ρόλο σε αυτή την δράση. [35,34]

Ειδικότερα, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ένα υδροξύλιο στην θέση 7 του σκελετού των φλαβονοειδών της εικόνας 41 φαίνεται πως παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανασταλτική δράση έναντι στην τυροσινάση.[34] Έχουν γίνει διάφορες μελέτες γύρω από την επίδραση τόσο του αριθμού όσο και της θέσης των υδροξυλίων των φλαβονοειδών. Για παράδειγμα, έχει μελετηθεί η σχέση δομής-ανασταλτικής δράσης φλαβονοειδών προερχόμενων από τον κίτρο καθώς και από ένα εσπεριδοειδές που φύεται κυρίως σε τροπικά κλίματα ονόματι jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). [34, 81] Η νοραρτοκαρπετίνη και η διϋδρομορίνη είναι κάποια από τα μόρια που μελετήθηκαν, υποδεικνύοντας πως η μεθοξυλίωση του υδροξυλίου της θέσης 7 μπορεί σχεδόν να μηδενίσει την ανασταλτική δράση ενός μορίου έναντι στην τυροσινάση.[34] Ακόμη, σύμφωνα με τους Lee et al. η πρενυλίωση ή βινυλίωση φλαβονοειδών δεν ενίσχυσε την ανασταλτική τους δράση. [82]



Εικόνα 41. Βασικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς

Επομένως, φαίνεται πως το υδροξύλιο της θέσης 7 πιθανώς συμβάλλει στην πρόσδεση ενός αναστολέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Γενικότερα, στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι υδροξύλια στον Α και Β δακτύλιο ενός

φλαβονοειδούς, συγκεκριμένα στις θέσεις C6-C8 και C2'-C4', φαίνεται να μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της τυροσινάσης. [34]

Τέλος, πολυφαινόλες όπως η λουτεολίνη και η απιγενίνη, οι οποίες έχουν μία ομάδα υδροξυλίου στην θέση C4', καθώς και το ροσμαρινικό οξύ, παράγωγα των οποίων περιέχονται σε αφθονία στο εκχύλισμα της *S. verticillata,* έχουν αναφερθεί ως από τους πιο ισχυρούς αναστολείς της τυροσινάσης. Μία πιθανή εξήγηση για τον παραπάνω ισχυρισμό θα μπορούσε να είναι και οι παρόμοιες δομικές ιδιότητες με την L-τυροσίνη.[37]

Από τα παραπάνω, είναι κατανοητό πως το εκχύλισμα δύναται να χρησιμοποιηθεί ως λευκαντικός παράγοντας σε διαφόρων ειδών φαρμακευτικά και καλλυντικά σκευάσματα, δίνοντας αφορμή για περαιτέρω διερεύνηση σχετικά με την διαφοροποίηση της λευκαντικής δράσης του εκχυλίσματος που προκύπτει από διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης.

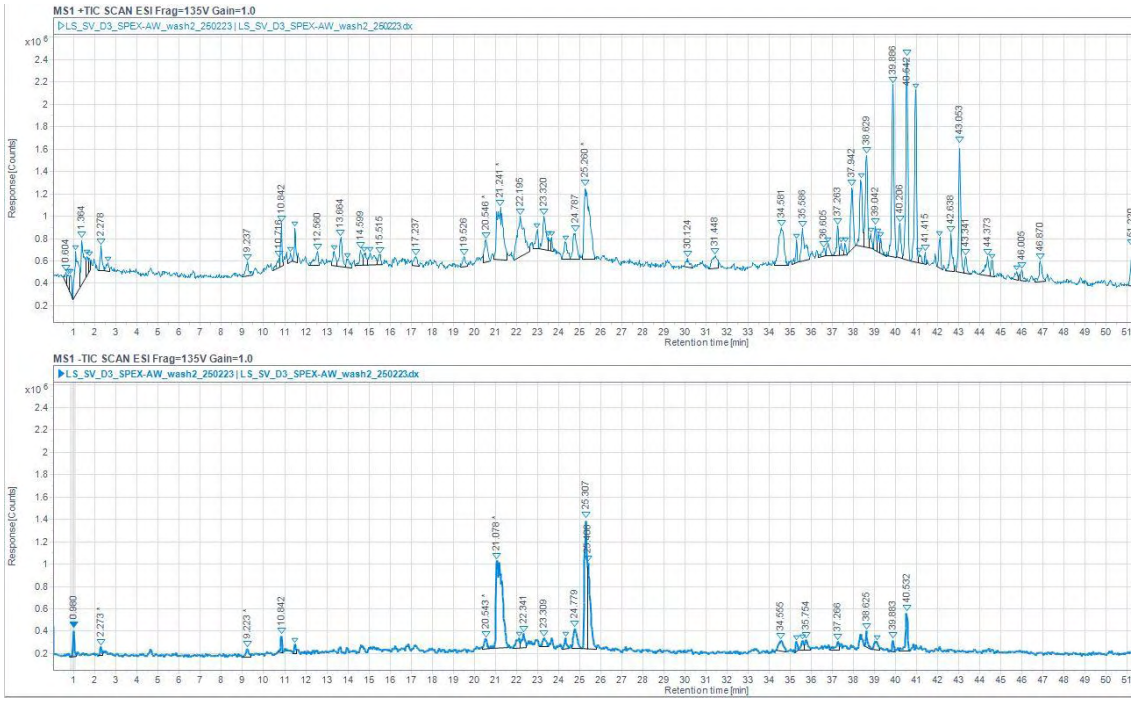
4.7 Αποτελέσματα κλασμάτωσης του εκχυλίσματος των φύλλων της *Salvia verticillata*

Όπως αναλύθηκε στην υποενότητα 3.9, η κλασμάτωση έγινε με δύο διαφορετικά είδη στηλών SPE (Solid Phase Extraction). Λόγω των εντυπωσιακών αποτελεσμάτων του εκχυλίσματος σχετικά με την δράση του ως αντιοξειδωτικός και λευκαντικός παράγοντας, θεωρήσαμε πως θα ήταν ενδιαφέρον να προσπαθήσουμε να κλασματώσουμε το εκχύλισμα και να εξετάσουμε τα επιμέρους κλάσματα για τις ιδιότητες τους. Το δεύτερο κομμάτι δεν πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, όμως πρόκειται να πραγματοποιηθεί από το εργαστήριο μας μελλοντικά.

4.7.1 Ποιοτική σύγκριση των κλασμάτων

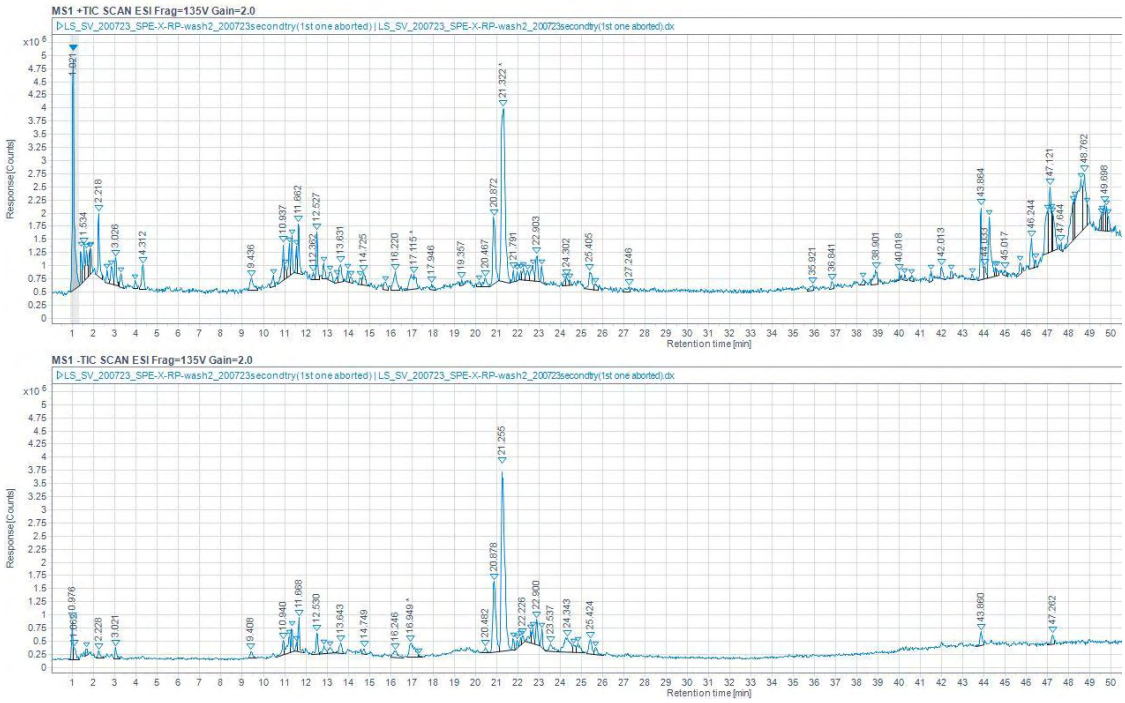
Στην Εικόνα 42 φαίνεται το χρωματογράφημα θετικού και αρνητικού ιονισμού του wash 2 που προέρχεται από το στηλάκι Strata-X-AW Polymeric Weak Anion Exchange. Το συγκεκριμένο wash ήταν 100% MeOH και όπως φαίνεται παρέσυρε κυρίως τα λιγότερο πολικά μόρια του εκχυλίσματος, καθώς παρατηρούμε ένα επιβαρυμένο προφίλ προς το τέλος του χρωματογραφήματος, ενώ πιο πολικά μόρια (ροσμαρινικό οξύ, μεθυλο-ροσμαρινικό οξύ κ.ά) φαίνεται να βρίσκονται σε πολύ μικρότερη ποσότητα. Ακόμη, αν και το ροσμαρινικό οξύ περιέχεται στο συνολικό εκχύλισμα σε

ποσότητα 3,5 φορές μεγαλύτερη από το μεθυλο-ροσμαρινικό οξύ, στο συγκεκριμένο κλάσμα φαίνεται να έχουν την ίδια ποσότητα.



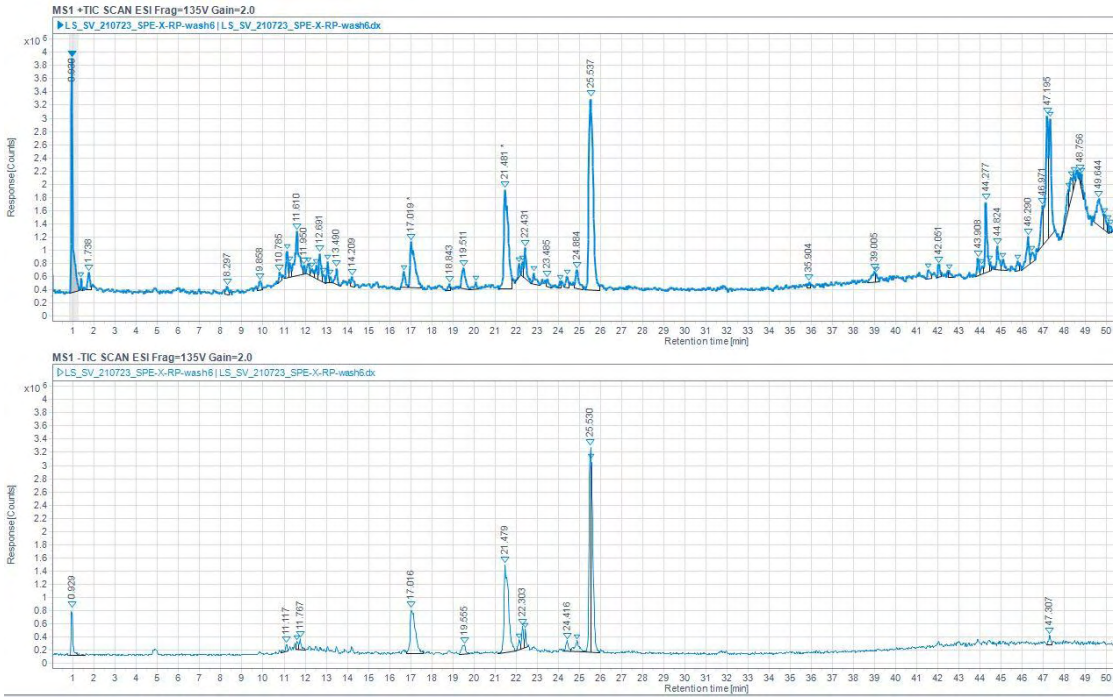
Εικόνα 42. Χρωματογράφημα θετικού και αρνητικού ιονισμού του wash 2 από Strata-X-AW Polymeric Weak Anion Exchange της *S.verticillata*

Από τα wash που προέρχονται από το στηλάκι Strata-X- Polymeric Reversed Phase, ενδιαφέρον εμφάνισαν τα wash 2 και wash 6 και παρουσιάζονται στα χρωματογραφήματα θετικού και αρνητικού ιονισμού των Εικόνων 43 και 44 αντίστοιχα.



Εικόνα 43. Χρωματογράφημα θετικού και αρνητικού ιονισμού του wash 2 από Strata-X-Polymeric Reversed Phase της *S.verticillata*

Το wash 2 από το στηλάκι Strata-X- Polymeric Reversed Phase αποτελείται από 15% (aq.) MeOH. Στο χρωματογράφημα της Εικόνας 43 παρατηρούμε ένα σχετικά όχι επιβαρυμένο προφίλ, με κύρια ένωση το ροσμαρινικό οξύ. Ωστόσο, το μεθυλο-ροσμαρινικό οξύ, φαίνεται να βρίσκεται μόνο σε ίχνη. Σύμφωνα με το τελικό αναλυτικό πρόγραμμα της ενότητας 3.3.2 καθώς και με τη ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών που έχει πραγματοποιηθεί, ένα ποσοστό οργανικού διαλύτη σαν αυτό φαίνεται να βοηθάει στον διαχωρισμό δύο εκ των κύριων ενώσεων του εκχυλίσματος.



Εικόνα 44. Χρωματογράφημα θετικού και αρνητικού ιονισμού του wash 6 από Strata-X-Polymeric Reversed Phase της *S.verticillata*

Αντίθετα, το wash 6 το οποίο προέρχεται από 45 % (aq.) MeOH φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ποσότητα μεθυλο-ροσμαρινικού οξέος από ότι ροσμαρινικού οξέος.

Το δύσκολο κατά την κλασμάτωση φυτικών εκχυλισμάτων είναι η απομάκρυνση των ενώσεων που περιέχονται σε μικρότερες ποσότητες, με σκοπό την μελέτη των κύριων ενώσεων τους. Το εκχύλισμα της *S. verticillata* είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, οπότε η κλασμάτωση του εκχυλίσματος της είναι αρκετά δύσκολη και σίγουρα απαιτεί μεγάλη ποσότητα φυτικού υλικού. Αυτή είναι η πρώτη προσπάθεια κλασμάτωσης του εκχυλίσματος των φύλλων ενός πληθυσμού της *S. verticillata* από την Ελλάδα με στήλη SPE (Solid Phase extraction). Στο παρελθόν έχουν γίνει αντίστοιχες προσπάθειες απομόνωσης δευτερογενών μεταβολιτών από διάφορα είδη φασκόμηλου, όμως τις περισσότερες φορές χρησιμοποιούνται στήλες τύπου FCC (Flash Column Chromatography) με διάφορα πληρωτικά υλικά, όπως η silica gel, το Sephadex LH-20 και το Diaion HP-20.[83,84,85]

5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η παρούσα έρευνα αποσκοπούσε στην μελέτη της αξιοποίησης των φύλλων και των ανθών του είδους *Salvia verticillata* L., για την βιομηχανία των καλλυντικών. Φυσικά, οι δράσεις που μελετήθηκαν μπορούν να βρουν εφαρμογή και σε άλλους κλάδους, για παράδειγμα στα συμπληρώματα διατροφής, στα τρόφιμα και σε φαρμακευτικά σκευάσματα.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε για πρώτη φορά το υδρομεθανολικό εκχύλισμα φύλλων και ανθών πληθυσμού του είδους *S. verticillata* από τα Καλάβρυτα, Αχαΐας για την σύστασή και το περιεχόμενό του σε πολικά μόρια. Επακολούθως, εξετάστηκε το περιεχόμενο του φυτού σε λιπαρά οξέα, καθώς αξιολογήθηκε και η αντιοξειδωτική και λευκαντική του δράση. Ακόμη, διενεργήθηκαν κάποιες προσπάθειες κλασμάτωσης του εκχυλίσματος των φύλλων, με απώτερο σκοπό την παραλαβή κάποιων κύριων ενώσεων του εκχυλίσματος. Τέλος, για λόγους φυτοχημικής σύγκρισης, αναλύθηκε πληθυσμός φύλλων του είδους *S. fruticosa* από την Τήνο στις Κυκλάδες για την σύσταση και το περιεχόμενο του σε πολικά μόρια και λιπαρά οξέα, αλλά και για την αντιοξειδωτική του δράση. Τα συμπεράσματα που διεξήχθησαν από τις παραπάνω αναλύσεις-συγκρίσεις είναι τα εξής :

- Από την ανάλυση των φύλλων της *S. verticillata* με UPLC-DAD-ESI-MS και των ανθών της με LC-MS ταυτοποιήθηκαν 28 και 34 ενώσεις αντίστοιχα. Η σύσταση τους ήταν παρόμοια, με μόνη διαφορά την ταυτοποίηση σε ίχνη κάποιων αβιετικών διτερπενίων στο εκχύλισμα των ανθών. Η χρήση δύο εξωτερικών προτύπων κατέληξε στην ποσοτικοποίηση 9 ενώσεων, φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών, για το κάθε μέρος του φυτού.
- Η ποσοτική σύσταση των εκχυλισμάτων των δύο τμημάτων του φυτού είναι κατά βάση παρόμοια, ωστόσο το εκχύλισμα των φύλλων περιέχει σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα ροσμαρινικού και μεθυλο-ροσμαρινικού οξεός. Το ροσμαρινικό οξύ δύναται να δρα μεταξύ άλλων ως αντιοξειδωτικός και λευκαντικός παράγοντας, συνεπώς τα εκχυλίσματα των φύλλων και των ανθών μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε αυτούσια σε καλλυντικά σκευάσματα, είτε ως βάση για περαιτέρω απομόνωση του ροσμαρινικού οξέος και άλλων παραγώγων του καφεϊκού οξέος.

- Στα εκχυλίσματα των φύλλων και των ανθών της *S. verticillata* ταυτοποιήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε σε σημαντική ποσότητα ο μεταβολίτης του καφεϊκού οξέος, dedihydro-salvianolic acid B/isomer. Το συγκεκριμένο μόριο έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία για το γένος *Salvia* μόνο μία φορά, συγκεκριμένα στο είδος *Salvia miltiorrhiza*. Η απομόνωση και ανάλυση του με την τεχνική NMR θα ήταν ένας παραπάνω τρόπος ταυτοποίησης του.
- Στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων της *S. fruticosa* ταυτοποιήθηκαν 30 ενώσεις, με το μεγαλύτερο ποσοστό των ενώσεων να κατηγοριοποιούνται ως φλαβονοειδή και αβιετικά διτερπένια. Από αυτές, ποσοτικοποιήθηκαν 10 ενώσεις, 8 φλαβονοειδή και 2 φαινολικά οξέα. Τα αβιετικά διτερπένια απαντώνται κατά κόρον στο συγκεκριμένο είδος, ενώ στο είδος της *S. verticillata* βρέθηκαν μόνο σε ίχνη, στο εκχύλισμα των ανθών. Τέλος, η σύσταση των δύο ειδών διαφοροποιείται σημαντικά και από το γεγονός ότι το ροσμαρινικό οξύ βρέθηκε στην μισή ποσότητα στο είδος *S. fruticosa* σε σχέση με το είδος *S.verticillata*.
- Η σύσταση σε λιπαρά οξέα των φύλλων και των ανθών της *S.verticillata*, βρέθηκε παρόμοια, όπως συμβαίνει και για τα πολικά μόρια. Τα δύο μέρη διαφέρουν μόνο ως προς το λαυρικό οξύ (φύλλα) και το τριδεκυλικό οξύ (άνθη). Συνολικά, τα δύο μέρη διαθέτουν μεγαλύτερο ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων, σε αντίθεση με αντίστοιχη μελέτη πληθυσμού του είδους από την Τουρκία, όπου τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι σε μεγαλύτερη αφθονία. Συγκριτικά με την σύσταση της *S. fruticosa*, πέραν αναμενόμενων λιπαρών οξέων του γένους *Salvia*, σαν το λινελαϊκό, το μυριστικό και το παλμιτικό οξύ, τα ευρήματα μεταξύ των δύο ειδών διαφέρουν. Ακόμη, τα φύλλα της *S. fruticosa*, σε αντίθεση με τα φύλλα της *S. verticillata*, εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων.
- Από τη σύγκριση του φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δράσης του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος των φύλλων και των ανθών της *S. verticillata,* προκύπτει πως η αντιοξειδωτική δράση και το φαινολικό τους περιεχόμενο είναι παρεμφερή. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, λόγω παρόμοιας φυτοχημικής σύστασης. Επιπλέον, το φαινολικό περιεχόμενο και η

αντιοξειδωτική δράση των φύλλων της *S. fruticosa* είναι σχεδόν 25% χαμηλότερα με στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με τα αποτελέσματα για τα φύλλα της *S. verticillata*.

- Τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος περιέχονται σε μεγάλη ποσότητα στα εκχυλίσματα του γένους *Salvia*, επομένως η απομάκρυνση και ο διαχωρισμός τους καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη διαδικασία. Στην δική μας μελέτη, η κλασμάτωση με SPE του εκχυλίσματος των φύλλων της *S. verticillata,* οδήγησε σε τρία κλάσματα προς αξιολόγηση. Στο πρώτο κλάσμα από την Strata-X-AW Polymeric Weak Anion Exchange, απομακρύνθηκε μεγάλη ποσότητα ροσμαρινικού και μεθυλο-ροσμαρινικού οξέος με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος των ενώσεων του κλάσματος να είναι λιγότερο πολικά μόρια που ταυτοποιήθηκαν μετά τα 34 λεπτά σύμφωνα με τον Πίνακα 7. Στα άλλα δύο κλάσματα με την Strata-X- Polymeric Reversed Phase καταφέραμε να διαχωρίσουμε το ροσμαρινικό οξύ από το μεθυλο-ροσμαρινικό οξύ, παραλαμβάνοντας ένα κλάσμα με σχεδόν καθόλου μεθυλο-ροσμαρινικό οξύ και ένα με μεγαλύτερη ποσότητα μεθυλο-ροσμαρινικού οξέος. Περαιτέρω κλασμάτωση και *in vitro* αξιολόγηση των κλασμάτων πρόκειται να λάβει χώρα μελλοντικά στο εργαστήριο.
- Τέλος, διερευνήθηκε η λευκαντική δράση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος των φύλλων της *S. verticillata,* μέσω της αναστολής του ενζύμου της τυροσινάσης. Σε συγκέντρωση 6, 50, 200 μg/mL εκχυλίσματος, επιτεύχθηκε έως 35.13 % αναστολή του ενζύμου. Επιπλέον, μελετήθηκε η πιθανή δράση του εκχυλίσματος ως εναλλακτικό υπόστρωμα του ενζύμου, το οποίο τελικά βρέθηκε αδρανές.

Συμπερασματικά, τα φύλλα και τα άνθη του είδους *S. verticillata* μπορούν να αξιοποιηθούν ως πηγή βιοδραστικών ενώσεων σε ποικίλα καλλυντικά σκευάσματα. Αρχικά, λόγω του υψηλού φαινολικού περιεχομένου τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αντιγηραντικά σκευάσματα ως φωτοπροστατευτικοί παράγοντες. Επίσης, αποδείξαμε πως το εκχύλισμα των φύλλων μπορεί να δράσει ως αναστολέας του ενζύμου της τυροσινάσης, δηλαδή ως λευκαντικός παράγοντας, και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε σκευάσματα που στοχεύουν σε κάποια δερματική βλάβη η οποία συνοδεύεται από συσσωρευμένη ποσότητα μελανίνης. Λόγω των λιπαρών οξέων που

ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα και στα άνθη του, θα ήταν ιδανική πρώτη ύλη για σκευάσματα που στοχεύουν στην καταπολέμηση δερματικών παθήσεων και της ακμής, συνδυαστικά με πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα λιπαρά οξέα είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθούν αυτούσια σε διάφορα σκευάσματα. Έτσι, οι αλκοόλες τους θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε άνυδρα στικ και εναιωρήματα, ενώ τροποποίηση της καρβοξυλικής τους ομάδας θα τα έκανε ιδανική πρώτη ύλη για προϊόντα καθαρισμού του δέρματος και των μαλλιών. Ακόμη, οι αμίνες των λιπαρών οξέων, όντας φορτισμένες μπορούν να προσελκύσουν τις πρωτεΐνες κερατίνης των μαλλιών και του δέρματος, οπότε θα ήταν ιδανική πηγή για σκευάσματα μαλλιών, παρομοίως με τους εστέρες των λιπαρών οξέων, οι οποίοι θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως μαλακτικές ουσίες.

6. Βιβλιογραφία

1. Desam, N. R., & Al-Rajab, A. J. (2021). The importance of natural products in cosmetics. In D. Pal & A. K. Nayak (Eds.), *Bioactive natural products for pharmaceutical applications* (pp. 643–685). Springer International Publishing.
2. 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.
3. Salviae officinalis folium - herbal medicinal product | European Medicines Agency (europa.eu) at https://www.ema.europa.eu
4. Naderi, N., Amini, H., Roghani, M., & Moazami, N. (2011). Effects of hydroalcoholic extract from *Salvia verticillata* on pharmacological models of seizure, anxiety and depression in mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10, 535-545.
5. Nikolova, M., & Aneva, I. (2017). European species of genus Salvia: Distribution, chemodiversity and biological activity. In V. Georgiev & A. Pavlov (Eds.), *Salvia biotechnology* (pp. 1-30). Springer International Publishing.
6. Dimopoulos, P., Raus, T., Bergmeier, E., Constantinidis, T., Iatrou, G., Kokkini, S., Strid, A., & Tzanoudakis, D. (2013). *Vascular plants of Greece: An annotated checklist*. Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem. Available at https://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/intro
7. Giannouli, A. L., & Kintzios, S. E. (2005). Essential oils of *Salvia* spp.: Examples of intraspecific and seasonal variation. In S. E. Kintzios (Ed.), *The genus Salvia* (pp. 43-64). CRC Press.
8. Katanić Stanković, J. S., Srećković, N., Mišić, D., Gašić, U., Imbimbo, P., Monti, D. M., & Mihailović, V. (2020). Bioactivity, biocompatibility and phytochemical assessment of lilac sage, *Salvia verticillata* L. (Lamiaceae)—A plant rich in rosmarinic acid. *Industrial Crops and Products*, *143*, 111932.
9. Stavropoulou, L. S., et al. (2024). Phytochemical profile and evaluation of the antioxidant, cyto-genotoxic, and antigenotoxic potential of *Salvia verticillata* hydromethanolic extract. *Plants*, *13*.

10. Trivellini, A., et al. (2016). Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: Bioactivity, industrial prospects, and role of "positive-stress." *Industrial Crops and Products*, *83*, 241–254.
11. Lee, C.-J., et al. (2011). The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food Chemistry*, *124*(3), 833–841.
12. Ben Taârit, M., et al. (2012). Fatty acids, phenolic changes, and antioxidant activity of clary sage (*Salvia sclarea* L.) rosette leaves grown under saline conditions. *Industrial Crops and Products*, *38*, 58–63.
13. Bagci, E., et al. (2004). Fatty acid and tocochromanol patterns of some *Salvia* L. species. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *59*, 305–309.
14. Cerone, M., & Smith, T. K. (2021). A brief journey into the history of and future sources and uses of fatty acids. *Frontiers in Nutrition*, *8*.
15. Desbois, A. (2012). Potential applications of antimicrobial fatty acids in medicine, agriculture, and other industries. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, *7*, 111–122.
16. Ibrahim, T. A. (2012). Chemical composition and biological activity of extracts from *Salvia bicolor* Desf. growing in Egypt. *Molecules*, *17*, 11315–11334.
17. Kelm, G. R., & Wickett, R. R. (2017). The role of fatty acids in cosmetic technology. In M. U. Ahmad (Ed.), *Fatty acids* (pp. 385–404). AOCS Press.
18. Bakoglu, A., Kilic, O., & Kokten, K. (2016). Fatty acid composition of the leaves of some *Salvia* taxa from Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, *52*.
19. Tel, G., et al. (2010). Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(11), 3189–3193.
20. Radovanovic Barjaktarevic, A., et al. (2021). Antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities of *Salvia verticillata* L. extracts. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *83*.
21. Al-Qudah, M. A., et al. (2014). Flavonoid and phenolic compounds from *Salvia palaestina* L. growing wild in Jordan and their antioxidant activities. *Phytochemistry*, *99*, 115–120.

22. Weng, X. C., & Wang, W. (2000). Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*. *Food Chemistry*, *71*(4), 489–493.
23. McCudden, C. (2020). Analgesics and anti-inflammatory drugs. In H. Ketha & U. Garg (Eds.), *Toxicology cases for the clinical and forensic laboratory* (pp. 67–74). Academic Press.
24. Boukhary, R., et al. (2016). Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Salvia fruticosa*: An HPLC determination of phenolic contents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)*, *2016*.
25. Ustun, O., & Sezik, E. (2011). Analgesic activity of *Salvia wiedemannii* Boiss. used in Turkish folk medicine. *Records of Natural Products*, *5*, 328–331.
26. Çadırcı, E., et al. (2012). Anti-inflammatory effects of different extracts from three *Salvia* species. *Turkish Journal of Biology*, *36*, 59–64.
27. Erbil, N., & Diğrak, M. (2015). Total phenolic and flavonoid contents, antimicrobial, and antioxidant properties of *Salvia verticillata* L. var. amasiaca and *Salvia microstegia* Boissand Bal from Turkish flora. *Journal of Microbiology and Antimicrobial Agents*.
28. Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, *170*, 378–385.
29. Coisin, M., et al. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of three *Salvia* species, widespread in Eastern Romania. *Analele Stiintifice ale Universitatii Al. I. Cuza din Iasi Sectiunea II a Biologie Vegetala*, *58*, 51–58.
30. Orhan, I. E., et al. (2007). Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry*, *103*, 1247–1254.
31. Karakaya, S., et al. (2020). A caryophyllene oxide and other potential anticholinesterase and anticancer agents in *Salvia verticillata* subsp. amasiaca (Freyn & Bornm.) Bornm. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, *32*, 1–14.
32. Khare, R., Upmanyu, N., & Jha, M. (2019). Exploring the potential effect of methanolic extract of *Salvia officinalis* against UV-exposed skin aging: In vivo and in vitro model. *Current Aging Science*.

33. Zengin, G., Llorent-Martínez, E. J., Córdova, M. L. F., Bahadori, M. B., Mocan, A., Locatelli, M., & Aktumsek, A. (2018). Chemical composition and biological activities of extracts from three *Salvia* species: *S. blepharochlaena*, *S. euphratica var. leiocalycina*, and *S. verticillata* subsp. amasiaca. *Industrial Crops and Products*, *111*, 11–21.
34. Chang, T.-S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*(6), 2440–2475.
35. Süntar, I., et al. (2011). Investigating wound healing, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of the ethanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia cyanescens* using in vivo and in vitro experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, *135*, 71–77.
36. Kang, H. S., et al. (2004). Rosmarinic acid as a tyrosinase inhibitor from *Salvia miltiorrhiza*. *Natural Product Sciences*, *10*, 80–84.
37. Juee, L. Y. M. (2022). Phytochemical characterization and mushroom tyrosinase inhibition of different extracts from *Salvia officinalis* L. leaves. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*.
38. Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, *13*(1), 20.
39. Dent, M., et al. (2013). The effect of extraction solvents, temperature, and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, *51*, 84–91.
40. Gkioni, M. D., Zeliou, K., Dimaki, V. D., Trigas, P., & Lamari, F. N. (2022). GC-MS and LC-DAD-MS phytochemical profiling for characterization of three native *Salvia* taxa from the Eastern Mediterranean with antiglycation properties. *Molecules*, *28*, 93.
41. Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, *877*(23), 2224–2234.
42. Andriopoulos, V., Gkioni, M. D., Koutra, E., Mastropetros, S. G., Lamari, F. N., Hatziantoniou, S., & Kornaros, M. (2022). Total phenolic content, biomass composition, and antioxidant activity of selected marine microalgal species with potential as aquaculture feed. *Antioxidants*, *11*(7), 1320.

43. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144.
44. Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*, 70–76.
45. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*, 25–30.
46. Mayr, F., et al. (2019). Mushroom tyrosinase-based enzyme inhibition assays are not suitable for bioactivity-guided fractionation of extracts. *Journal of Natural Products*, *82*(1), 136–147.
47. Andrade-Eiroa, A., et al. (2016). Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. Part II. *Trends in Analytical Chemistry*, *80*, 655–667.
48. Chemat, F., et al. (2017). Ultrasound-assisted extraction of food and natural products: Mechanisms, techniques, combinations, protocols, and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540–560.
49. Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, *12*(1), 1–10.
50. Oliveira-Alves, S. C., Vendramini-Costa, D. B., Betim Cazarin, C. B., Maróstica Júnior, M. R., Borges Ferreira, J. P., Silva, A. B., Prado, M. A., & Bronze, M. R. (2017). Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour, and oil. *Food Chemistry*, *232*, 295–305.
51. Chen, H., Zhang, Q., Wang, X., Yang, J., & Wang, Q. (2011). Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MSn. *Phytochemical Analysis*, *22*, 247–257.
52. Zimmermann, B. F., Walch, S. G., Tinzoh, L. N., Stühlinger, W., & Lachenmeier, D. W. (2011). Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *Journal of Chromatography B*, *879*, 2459–2464.

53. Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Acevska, J., Stanoeva, J. P., Karapandzova, M., Stefova, M., Dimitrovska, A., & Kulevanova, S. (2013). Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *Journal of Chromatography A*, *1282*, 38–45.
54. Atwi, M., Weiss, E.-K., Loupassaki, S., Makris, D. P., Ioannou, E., Roussis, V., & Kefalas, P. (2016). Major antioxidant polyphenolic phytochemicals of three *Salvia* species endemic to the island of Crete. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, *22*, 27–34.
55. Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I. P., & Tzakos, A. G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, *136*, 120–129.
56. Borrás Linares, I., Arráez-Román, D., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1218*, 7682–7690.
57. Liu, A.-H., Lin, Y.-H., Yang, M., Guo, H., Guan, S.-H., Sun, J.-H., & Guo, D.-A. (2007). Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC–MSn. *Journal of Chromatography B*, *846*, 32–41.
58. Liu, A.-H., Guo, H., Ye, M., Lin, Y.-H., Sun, J.-H., Xu, M., & Guo, D.-A. (2007). Detection, characterization, and identification of phenolic acids in danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1161*, 170–182.
59. Istasse, T., Jacquet, N., Berchem, T., Haubruge, E., Nguyen, B. K., & Richel, A. (2016). Extraction of honey polyphenols: Method development and evidence of cis isomerization ubertas academica. *Analytical Chemistry Insights*, *11*, 1–7.

60. Wang, J., Chen, S., Cheng, H., Yang, F., Wan, J., Bo, J., Liu, Y., Yang, J., Liu, J., & Zhou, G.-C. (2011). Identification, structural properties, and chelating capacity of miltipolone as a broad-spectrum inhibitor to cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*, 1117–1121.
61. Bendrihem, K. A., et al. (2024). Phytochemical screening, antioxidant properties, and photo-protective activities of *Salvia balansae* de Noé ex Coss. *Journal of Chemistry*, *22*(1).
62. Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., LaVoie, E. J., Huang, T.-C., & Ho, C.-T. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 4869–4873.
63. Gulsoy Toplan, G., Kurkcuoglu, M., Goger, F., Iscan, G., Agalar, H. G., Mat, A., Baser, K. H. C., Koyuncu, M., & Sarıyar, G. (2017). Composition and biological activities of *Salvia veneris* hedge growing in Cyprus. *Industrial Crops and Products*, *97*, 41–48.
64. Koutsoulas, A., Carnecka, M., Slanina, J., Tóth, J., & Slaninová, I. (2019). Characterization of phenolic compounds and antiproliferative effects of *Salvia pomifera* and *Salvia fruticosa* extracts. *Molecules*, *24*, 2921.
65. Ververis, A., Kyriakou, S., Ioannou, K., Chatzopoulou, P. S., Panayiotidis, M. I., Plioukas, M., & Christodoulou, K. (2023). Chemical profiling and antioxidant and anti-amyloid capacities of *Salvia fruticosa* extracts from Greece. *Plants*, *12*(18), 3191.
66. Oztekin, N., et al. (2010). Isolation and analysis of bioactive diterpenoids in *Salvia* species (*Salvia chionantha* and *Salvia kronenburgiii*) by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(2), 439–442.
67. Yumrutas, O., Sokmen, A., & Ozturk, N. (2011). Determination of in vitro antioxidant activities and phenolic compounds of different extracts of *Salvia verticillata* ssp. *verticillata* and spp. *amasiaca* from Turkey's flora. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *1*, 43–46.
68. Anacleto, S. (2016). *Chia crop (Salvia hispanica L.): Its history and importance as a source of polyunsaturated fatty acids omega-3 around the world: A review*. *Journal of Chemical Research and Food*, *1*, 1–4.

69. Topcu, G., et al. (2013). Terpenoids, essential oil composition, fatty acid profile, and biological activities of Anatolian *Salvia fruticosa* Mill. *Turkish Journal of Chemistry*, *37*, 619–626.
70. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7), 3382.
71. Alimpić, A., Oalđe, M., Matevski, V., Marin, P. D., & Duletić-Laušević, S. (2014). Antioxidant activity and total phenolic flavonoid contents of *Salvia amplexicaulis* Lam. extracts. *Archives of Biological Sciences*, 66, 307–316.
72. Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., & Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, *95*, 200–204.
73. Khiya, Z., Oualcadi, Y., Gamar, A., Berrekhis, F., Zair, T., & Hilali, F. E. (2021). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant activity of hydromethanolic extract and their fractions of the *Salvia officinalis* leaves from different regions of Morocco. *Journal of Chemistry*, *2021*, 1–8.
74. Kiliçkaya Selvï, E. (2020). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Salvia verticillata* L., *Salvia tomentosa* Mill., and *Phlomis lychnitis* L. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, *5*, 125–130.
75. Dawra, M., et al. (2023). Chemical characterization and antioxidant, antibacterial, antiacetylcholinesterase, and antiproliferation properties of *Salvia fruticosa* Miller extracts. *Molecules*, *28*, 62429.
76. Kyriakou, S., et al. (2021). Chemical and biological characterization of the anticancer potency of *Salvia fruticosa* in a model of human malignant melanoma. *Plants*, *10*, 2472.
77. El Aanachi, S., et al. (2021). In vitro study of the antioxidant, photoprotective, anti-tyrosinase, and anti-urease effects of methanolic extracts from leaves of six Moroccan Lamiaceae. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15*(2), 1785–1795.
78. Souza, P., et al. (2012). Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. *PLoS ONE*, *7*, e48589.
79. Athipornchai, A., et al. (2021). Potent tyrosinase inhibitory activity of curcuminoid analogues and inhibition kinetics studies. *Cosmetics*, *8*(2), 35.

80. Şenol, F. S., et al. (2016). Memory-vitalizing effect of twenty-five medicinal and edible plants and their isolated compounds. *South African Journal of Botany*, *102*, 102–109.
81. Ranasinghe, R. A. S. N., Maduwanthi, S. D. T., & Marapana, R. A. U. J. (2019). Nutritional and health benefits of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.): A review. *International Journal of Food Science*, *2019*, 4327183.
82. Lee, N. K., et al. (2004). Prenylated flavonoids as tyrosinase inhibitors. *Archives of Pharmacal Research*, *27*(11), 1132–1135.
83. İçen, M. S., et al. (2021). Isolation of rosmarinic acid and methyl rosmarinate as lipoxygenase inhibitors from *Salvia palaestina* Benth. by activity-guided fractionation. *South African Journal of Botany*, *141*, 177–182.
84. Oztekin, N., et al. (2010). Isolation and analysis of bioactive diterpenoids in *Salvia* species (*Salvia chionantha* and *Salvia kronenburgiii*) by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(2), 439–442.
85. Lu, Y., & Foo, L. (1999). Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, *51*, 91–94.