



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ**

Μεταπτυχιακή διατριβή

Συγκριτική μελέτη της χημικής σύστασης αιθέριων ελαίων
καθώς και υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του γένους *Salvia*
και της βιοδραστικότητάς τους



Αντωνία Ελένη Χ. Λιόλιου

Επιβλέπων Καθηγητής:
Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α

Αθήνα
2021

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή διατριβή

Συγκριτική μελέτη της χημικής σύστασης αιθέριων ελαίων
καθώς και υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του γένους *Salvia*
και της βιοδραστικότητάς τους

“Comparative study of the chemical composition of essential oils as well
as hydroalcoholic extracts of the genus *Salvia* and their bioactivity”

Αντωνία Ελένη Χ. Λιόλιου

Εξεταστική Επιτροπή:

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α (επιβλέπων)
Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α
Παναγιώτης Τρίγκας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

Συγκριτική μελέτη της χημικής σύστασης αιθέριων ελαίων καθώς και υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του γένους *Salvia* και της βιοδραστητικότητάς τους

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Περίληψη

Ένα από τα μεγαλύτερα γένη της οικογένειας, το γένος Ελελίφασκος *Salvia* L., εκπροσωπείται από περισσότερα από 900 είδη και διανέμεται ευρέως σε διάφορες περιοχές του κόσμου, δηλαδή στην περιοχή της Μεσογείου, τη Νότια Αφρική, την Κεντρική και Νότια Αμερική και τη Νοτιοανατολική Ασία. Στην Ελλάδα εντοπίζονται 23 αυτοφυή είδη με τις κοινές ονομασίες φασκομηλιά, αλισφακιά, σπατζιά, φλησκούνι κ.α. Το λατινικό όνομα του φασκόμηλου προέρχεται από τους παλιούς Λατίνους, οι οποίοι το ονόμασαν φυτό σωτηρίας (από το ρήμα *salvare* που σημαίνει «σώζω, θεραπεύω»), πιθανόν αναφερόμενοι στις ιδιότητές του. Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων και των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων τεσσάρων ειδών φασκόμηλου της οικογένειας *Lamiaceae* και της βιοδραστητικότητάς τους. Πιο συγκεκριμένα, το αιθέριο έλαιο των *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa*, *Salvia argentea* και *Salvia ringens* μετά την συλλογή και την ξήρανσή τους και κατόπιν υδρο-απόσταξης με συσκευή Clevenger, μελετήθηκε ως προς τη χημική του σύσταση με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS) προκειμένου να προσδιοριστούν τα πτητικά συστατικά που αυτό περιέχει. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών που ανιχνεύτηκαν στα αιθέρια έλαια. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (LC-DAD-MS). Τέλος, τα δείγματα ελέγχθηκαν ως προς τη βιοδραστητικότητά τους με τις δοκιμές DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu, δηλαδή εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με τις δοκιμασίες DPPH και ABTS, καθώς επίσης το ολικό φαινολικό περιεχόμενό τους με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu.

Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia fruticosa* το κύριο συστατικό ήταν η 1,8-κινεόλη με ποσοστό 48,50%. Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia argentea* το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου είναι το D-γερμακρένιο με ποσοστό 37,41%. Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia ringens* το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου είναι το E-καρνοφυλλένιο με ποσοστό 8,89%. Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia officinalis* το κύριο συστατικό του είναι η καμφορά με ποσοστό 24,32%. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ο ποιοτικός προσδιορισμός των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των τεσσάρων ειδών φασκόμηλου με LC-DAD-MS. Στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των ειδών του γένους *Salvia* ως κύριο συστατικό ανιχνεύτηκε το ροσμαρινικό

οξύ σε όλα τα είδη. Ο προσδιορισμός του αριθμού των ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων φασκόμηλου έγινε με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu και εκφράστηκε ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος/g ξηρού φυτικού υλικού. Χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός διαλυτών μεθανόλης/νερού σε αναλογία 70:30 (v/v). Τα δύο είδη *Salvia ringens* και *Salvia officinalis* παρουσίασαν την μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φαινολικών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Το *Salvia ringens* υπερیشύει με ποσοστό 91,3% ισοδύναμα γαλλικού οξέος και αμέσως μετά το *Salvia officinalis* με ποσοστό 90,5% ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Τέλος, η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων έγινε με τη δοκιμασία του DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) καθώς και με τη δοκιμασία του ABTS και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτήθηκε για να προκαλέσει παρεμπόδιση στην οξείδωση του υποστρώματος κατά 50% (IC₅₀). Για τη δοκιμασία του DPPH, το υδρομεθανολικό εκχύλισμα που παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το *Salvia ringens*, καθώς έχει το μικρότερο IC₅₀ (4.53 μg/mL) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Ακολουθεί το *Salvia officinalis* (11.13 μg/mL), το *Salvia fruticosa* (22,16 μg/mL), ενώ το λιγότερο δραστικό υδρομεθανολικό εκχύλισμα είναι το *Salvia argentea* (38,68 μg/mL). Για την περίπτωση του ABTS, το υδρομεθανολικό εκχύλισμα που παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το *Salvia officinalis*, καθώς παρουσιάζει την μικρότερη τιμή IC₅₀ (5.87 μg/mL) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Ακολουθεί το *Salvia ringens* (6.03 μg/mL), το *Salvia fruticosa* (8.96 μg/mL), ενώ το λιγότερο δραστικό υδρομεθανολικό εκχύλισμα είναι το *Salvia argentea* (15.4 μg/mL).

Επιστημονική περιοχή: Αιθέρια έλαια

Λέξεις κλειδιά: *Salvia* spp., Αιθέρια έλαια, Υδρο-απόσταξη, Αέρια χρωματογραφία-Φασματομετρία μαζών, Υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, Φαινολικές ενώσεις, Υγρή χρωματογραφία-Φασματομετρία μαζών, LC-DAD-MS, DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu

Comparative study of the chemical composition of essential oils as well as hydroalcoholic extracts of the genus *Salvia* and their bioactivity

Department of Food Science and Human Nutrition
Laboratory of General Chemistry

Abstract

One of the largest genera of the family *Lamiaceae*, the genus *Salvia* L., is represented by more than 900 species and is widely distributed in various parts of the world, namely in the Mediterranean region, South Africa, Central and South America and Southeast Asia. In Greece, 23 native species have been recognized as *lisfakia*, *spatzia*, *fliskouni* etc. The Latin name *Salvia* derives from the word *salvare*, a verb which means “save, heal”, it is a name adopted by the ancient Latins, who probably relate the plant with its pharmaceutical properties. This study focused on the chemical analysis of the essential oils and hydromethanolic extracts of four *Salvia* species, namely *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa*, *Salvia argentea* and *Salvia ringens*. Chemical analysis of the essential oil was performed with gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) in order to determine its volatile content, while liquid chromatography mass spectrometry (LC-DAD-MS) was used to identify the active metabolites of the extracts. *Salvia fruticosa* main compound was 1,8-cineole (48.50%), while for *Salvia argentea* D-germacrene was the compound detected in abundance (37.41%). *Salvia ringens* was rich in E-caryophyllene (8.89%) and finally, for *Salvia officinalis* the main compound detected was camphor (24.32%). Regarding LC-DAD/MS analysis, Rosmarinic acid was detected in all species. The number of total phenolic components of sage was determined by the Folin – Ciocalteu method and expressed as equivalents of gallic acid/g of dry plant material. The two species *Salvia ringens* and *Salvia officinalis* showed the highest amount of total phenolics compared to the other samples. *Salvia ringens* predominates with 91.3% equivalents of gallic acid and immediately followed by *Salvia officinalis* with 90.5% equivalents of gallic acid. Finally, the antioxidant capacity of hydromethanolic extracts was evaluated with the DPPH test (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) as well as by the ABTS test and results were expressed as the amount of antioxidant required to cause 50% inhibition of substrate oxidation (IC_{50}). For the DPPH test, the hydromethanolic extract with the strongest antioxidant activity is *Salvia ringens*, as it has the lowest IC_{50} value (4.53 $\mu\text{g} / \text{mL}$) compared to the other samples. *Salvia officinalis* (11.13 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and *Salvia fruticosa* (22.16 $\mu\text{g} / \text{mL}$) follow, while the less active hydromethanolic extract is *Salvia argentea* (38.68 $\mu\text{g} / \text{mL}$). In the case of ABTS assay, the hydromethanolic extract that has the strongest antioxidant activity is *Salvia officinalis*, as it has the lowest IC_{50} (5.87 $\mu\text{g} / \text{mL}$) compared to the other

samples. It is followed by *Salvia ringens* (6.03 µg / mL), *Salvia fruticosa* (8.96 µg / mL), while the least active hydromethanolic extract is *Salvia argentea* (15.4 µg / mL).

Scientific area: Essential oils

Key words: *Salvia* spp., Essential oils, Hydro-distillation, Gas chromatography-Mass spectrometry, Hydromethanolic extracts, Phenolic compounds, Liquid chromatography-Mass spectrometry, LC-DAD-MS, DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu

Στην οικογένειά μου ...

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων», υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Πέτρου Ταραντίλη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Πέτρο Ταραντίλη, τόσο για το αξιόλογο και πολύ ενδιαφέρον θέμα που μου ανέθεσε, όσο και για την αμέριστη υποστήριξη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ευγενική και οικεία στάση του. Πιο συγκεκριμένα, με την εμπιστοσύνη και την επιστημονική του καθοδήγηση συνέβαλε στην αποπεράτωση της διπλωματικής μου εργασίας. Παρά το πλήθος των επιστημονικών του ανειλημμένων υποχρεώσεων, ήταν πρόθυμος να αφιερώσει χρόνο, παρέχοντας χρήσιμες συμβουλές για την επιτυχή έκβαση και ρύθμιση διαφόρων θεμάτων.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Τρίγκα για την διάθεση του φυτικού υλικού καθώς επίσης και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χρήστο Παππά για την συμμετοχή τους στην τριμελή μου επιτροπή, τη μελέτη και τη διόρθωση αυτής της εργασίας.

Ακολούθως, ευχαριστώ θερμά τα μέλη του Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού την κ. Δήμητρα Δαφερέρα και την κ. Νάντια Ασπρακά για την πολύτιμη συμβολή τους στην διεξαγωγή της παρούσας ερευνητικής μελέτης, για την φιλική τους διάθεση και την ειλικρινή προθυμία τους να συνεισφέρουν στην επίλυση τυχόν προβλημάτων.

Ακόμα, θα ήθελα να εκφράσω ιδιαίτερος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια Διδάκτορα Ελένη Κακούρη για την ανιδιοτελή μεταλαμπάδευση των επιστημονικών της γνώσεων, την συμβολή της στην καλλιέργεια ερευνητικού τρόπου σκέψης και την ερμηνεία πειραματικών φαινομένων, καθώς και για την καταλυτική βοήθεια που μου προσέφερε με την εργαστηριακή της εμπειρία παρόλο το δύσκολο και απαιτητικό πρόγραμμά της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες και συμφοιτήτριές μου Χαριτίνη Γεωργία Μπαμπάτσικου και Δήμητρα Κώστογλου για τη σημαντική βοήθεια και το αξιοσημείωτο ενδιαφέρον τους καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για το ευχάριστο και αρμονικό κλίμα στον χώρο του εργαστηρίου και την εξαιρετική συνεργασία και αλληλεγγύη που επιδείκνυαν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, η οποία με στήριξε, με στηρίζει και είναι δίπλα μου σε κάθε επιλογή μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	2
Abstract	4
Ευχαριστίες.....	7
Κατάλογος Εικόνων	10
Κατάλογος Πινάκων	10
Κατάλογος Σχημάτων	11
Κατάλογος Ραβδογραμμμάτων	11
Κατάλογος Διαγραμμμάτων	12
1 ^ο Κεφάλαιο: Εισαγωγή.....	13
1.1 Ιστορική Αναδρομή Φαρμακευτικών Αρωματικών Φυτών	13
1.2 Φαρμακευτικά Αρωματικά Φυτά	15
1.3 Ονομασία, καταγωγή και εξάπλωση του φασκόμηλου	16
1.4 Ιδιότητες και χρήσεις του φασκόμηλου	18
1.5 Παρουσίαση των Βοτάνων.....	20
1.5.1 <i>Salvia officinalis</i>	20
1.5.2 <i>Salvia fruticosa</i> Miller.....	21
1.5.3 <i>Salvia argentea</i>	22
1.5.4 <i>Salvia ringens</i>	23
1.6 Αιθέρια έλαια	24
1.6.1 Χημεία αιθερίων ελαίων.....	24
1.5.2 Παραλαβή αιθερίων ελαίων	26
1.6 Εκχυλίσματα Βοτάνων	28
1.6.1 Βιοδραστικά συστατικά εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών	28
1.6.2 Φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή	29
1.7 Δοκιμή DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο).....	30
1.8 Δοκιμή ABTS.....	31
1.9 Folin–Ciocalteu	32
1.10 Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)- Φασματομετρία Μαζών(Mass Spectrometry, MS)	32
1.11 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)–Φασματομετρία Μαζών (Mass Spectrometry, MS).....	35
1.12 Σκοπός της μελέτης	38
1.13 Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας.....	39
Κεφάλαιο 2 ^ο Υλικά και Μέθοδοι	40
2.1 Φυτικό υλικό	40

2.2 Χημικά.....	41
2.3 Παραλαβή υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων	41
2.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων.....	42
2.4.1 Δοκιμασία DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	43
2.4.2 Δοκιμασία ABTS (2,2'-azino-bis (3- ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid).....	43
2.5 Εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	44
2.6 Απόσταξη των ξηρών φυτικών δρογών με συσκευή Clevenger	45
2.7 Παραλαβή των αιθερίων ελαίων	46
2.8 Ανάλυση και ταυτοποίηση των αιθερίων ελαίων με Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)	47
2.9 Χημική ανάλυση με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC- DAD-MS).....	49
Κεφάλαιο 3° Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	50
3.1 Αποτελέσματα απόσταξης των φυτικών δρογών φασκόμηλου.....	50
3.2 Επισκόπηση χημικών ενώσεων των αιθερίων ελαίων των ειδών φασκόμηλου.	51
3.2.1 Αιθέριο έλαιο <i>Salvia fruticosa</i>	52
3.2.2 Αιθέριο έλαιο <i>Salvia argentea</i>	57
3.2.3 Αιθέριο έλαιο <i>Salvia ringens</i>	60
3.2.4 Αιθέριο έλαιο <i>Salvia officinalis</i>	65
3.3 Παραλαβή δευτερογενών μεταβολιτών <i>Salvia spp</i>	69
3.4 Ανάλυση εκχυλισμάτων του γένους <i>Salvia</i> με υγρή χρωματογραφία– φασματομετρία μαζών και φασματομετρία ορατού-υπεριώδους (LC-DAD-MS)	70
3.4.1 Χημικό προφίλ του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>Salvia officinalis</i>	71
3.4.2 Χημικό προφίλ του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>Salvia argentea</i>	75
3.4.3 Χημικό προφίλ του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>Salvia ringens</i>	78
3.4.5. Χημικό προφίλ του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>Salvia fruticosa</i>	80
3.5 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου	82
3.6 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων του γένους <i>Salvia</i>	85
3.6.1 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δοκιμασίας DPPH	85
3.6.2 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δοκιμής ABTS	89
3.6.3 Σύγκριση των δοκιμών DPPH και ABTS στα δείγματα φασκόμηλου.....	93
4. Συμπεράσματα.....	95
Βιβλιογραφία	99
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	99
Διεθνής Βιβλιογραφία.....	100

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.	Παγκόσμια κατανομή των ειδών <i>Salvia</i>	18
Εικόνα 2.	<i>Salvia officinalis</i>	21
Εικόνα 3.	<i>Salvia fruticosa</i> Miller	23
Εικόνα 4.	<i>Salvia argentea</i>	24
Εικόνα 5.	<i>Salvia ringens</i>	25
Εικόνα 6.	Μονάδα ισοπρενίου	26
Εικόνα 7.	Αιθέριο έλαιο <i>Salvia officinalis</i>	29
Εικόνα 8.	Απόσταξη με συσκευή Clevenger	29
Εικόνα 9.	Κατηγορίες πολυφαινολών	31
Εικόνα 10.	Σχηματικό διάγραμμα αέριου χρωματογράφου	34
Εικόνα 11.	Σχηματική παράσταση των οργάνων και μερών συσκευής HPLC	37
Εικόνα 12.	Υδρομεθανολικά εκχυλίσματα	43
Εικόνα 13.	Υδρο-απόσταξη φυτικού υλικού με συσκευή Clevenger	47
Εικόνα 14.	Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματόμετρο μαζών GC-MS SCION Brucker	49
Εικόνα 15.	Σύστημα υγρής χρωματογραφίας-συστοιχίας φωτοδιοδών-φασματομετρίας μαζών (LC-DAD-MS)	51
Εικόνα 16.	Δομές συστατικών αιθερίου ελαίου <i>Salvia fruticosa</i>	55
Εικόνα 17.	Δομές συστατικών αιθερίου ελαίου <i>Salvia argentea</i>	60
Εικόνα 18.	Δομές συστατικών αιθερίου ελαίου <i>Salvia ringens</i>	64
Εικόνα 19.	Δομές συστατικών αιθερίου ελαίου <i>Salvia officinalis</i>	69
Εικόνα 20.	Χρωματογραφήματα των τεσσάρων ειδών <i>Salvia</i> μετά την ανάλυση LC-DAD-MS	71
Εικόνα 21.	Δομές συστατικών υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>Salvia officinalis</i>	73
Εικόνα 22.	Δομές συστατικών υδρομεθανολικού εκχυλίσματος <i>Salvia argentea</i>	74
Εικόνα 23.	Χρωματογράφημα του <i>Salvia officinalis</i> μετά την ανάλυση του LC-DAD-MS	77
Εικόνα 24.	Χρωματογράφημα του <i>Salvia argentea</i> μετά την ανάλυση του LC-DAD-MS	80
Εικόνα 25.	Χρωματογράφημα του <i>Salvia ringens</i> μετά την ανάλυση του LC-DAD-MS	82
Εικόνα 26.	Χρωματογράφημα του <i>Salvia fruticosa</i> μετά την ανάλυση του LC-DAD-MS	84

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.	Ταξινόμηση τερπενίων.	27
Πίνακας 2.	Τεχνικές απόσταξης και εκχύλισης.	27
Πίνακας 3.	Πρόγραμμα ανάλυσης LC-DAD-MS.	50

Πίνακας 4.	Σύννοψη των αποδόσεων επί τοις εκατό (%) εκφρασμένων ως ποσοτήτων (mL) ανά 100 g ξηρού φυτικού υλικού τεσσάρων ειδών αιθερίου ελαίου φασκόμηλου.	51
Πίνακας 5.	Σύσταση αντιπροσωπευτική για το αιθέριο έλαιο <i>Salvia fruticosa</i> με την τεχνική GC-MS.	53
Πίνακας 6.	Σύσταση αντιπροσωπευτική για το αιθέριο έλαιο <i>Salvia argentea</i> με την τεχνική GC-MS.	59
Πίνακας 7.	Σύσταση αντιπροσωπευτική για το αιθέριο έλαιο <i>Salvia ringens</i> με την τεχνική GC-MS.	62
Πίνακας 8.	Σύσταση αντιπροσωπευτική για το αιθέριο έλαιο <i>Salvia officinalis</i> με την τεχνική GC-MS.	69
Πίνακας 9.	Αποδόσεις σε mg των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων δειγμάτων <i>Salvia</i> spp.	70
Πίνακας 10.	Σύσταση αντιπροσωπευτική για το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του <i>Salvia officinalis</i> με την τεχνική LC-DAD-MS.	73
Πίνακας 11.	Σύσταση αντιπροσωπευτική για το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του <i>Salvia argentea</i> με την τεχνική LC-DAD-MS.	76
Πίνακας 12.	Σύσταση αντιπροσωπευτική για το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του <i>Salvia ringens</i> με την τεχνική LC-DAD-MS.	79
Πίνακας 13.	Σύσταση αντιπροσωπευτική για το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του <i>Salvia fruticosa</i> με την τεχνική LC-DAD-MS.	81
Πίνακας 14.	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων φασκόμηλου.	83
Πίνακας 15.	Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων με βάση τη δοκιμή DPPH.	88
Πίνακας 16.	Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων με βάση τη δοκιμή ABTS.	92

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.	Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου <i>Salvia fruticosa</i> .	55
Σχήμα 2.	Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου <i>Salvia argentea</i> .	60
Σχήμα 3.	Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου <i>Salvia ringens</i> .	62
Σχήμα 4.	Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου <i>Salvia officinalis</i> .	68

Κατάλογος Ραβδογραμμάτων

Ραβδόγραμμα 1.	Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων εκφρασμένο σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.	84
Ραβδόγραμμα 2.	Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων.	88

Ραβδόγραμμα 3.	Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων.	92
Ραβδόγραμμα 4.	Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων φασκόμηλου με βάση τις δοκιμές ABTS και DPPH.	93

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1.	Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.	83
Διάγραμμα 2.	Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox	85
Διάγραμμα 3.	Υδρομεθανολικό εκχύλισμα <i>Salvia fruticosa</i> .	86
Διάγραμμα 4.	Υδρομεθανολικό εκχύλισμα <i>Salvia ringens</i> .	86
Διάγραμμα 5.	Υδρομεθανολικό εκχύλισμα <i>Salvia argentea</i> .	87
Διάγραμμα 6.	Υδρομεθανολικό εκχύλισμα <i>Salvia officinalis</i> .	87
Διάγραμμα 7.	Πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος.	89
Διάγραμμα 8.	Υδρομεθανολικό εκχύλισμα <i>Salvia ringens</i> .	90
Διάγραμμα 9.	Υδρομεθανολικό εκχύλισμα <i>Salvia argentea</i> .	90
Διάγραμμα 10.	Υδρομεθανολικό εκχύλισμα <i>Salvia officinalis</i> .	91
Διάγραμμα 11.	Υδρομεθανολικό εκχύλισμα <i>Salvia ringens</i> .	91

1^ο Κεφάλαιο: Εισαγωγή

1.1 Ιστορική Αναδρομή Φαρμακευτικών Αρωματικών Φυτών

Ήδη από την αρχαιότητα, προκειμένου να αντιμετωπίσουν διάφορες ασθένειες, οι άνθρωποι έψαχναν τα φάρμακά τους στη φύση. Αρχικά οι άνθρωποι επέλεγαν τα φυτά με βάση το ένστικτό τους, όπως και τα ζώα. Εξαιτίας της μη επαρκούς πληροφόρησης για τις αιτίες των ασθενειών καθώς και για το ποια φαρμακευτική ουσία και το πώς θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία, οι άνθρωποι βασίστηκαν στην μέχρι τότε εμπειρία και παρατήρηση. Με τον καιρό, ανακαλύφθηκαν οι λόγοι για τη χρήση συγκεκριμένων φαρμακευτικών φυτών για τη θεραπεία συγκεκριμένων ασθενειών. Έτσι, η χρήση των φαρμακευτικών φυτών εγκατέλειψε σταδιακά το εμπειρικό πλαίσιο και βασίστηκε σε διερευνητικά γεγονότα (Gunnar, 2003, Gerhand, 2003).

Οι Σουμέριοι και οι Ασσύριοι ήταν οι πρώτοι λαοί, σε τεκμήρια των οποίων, βρέθηκαν πληροφορίες σχετικά με τα φαρμακευτικά αρωματικά φυτά το 2200π.Χ. Πιο συγκεκριμένα, η αρχαιότερη γραπτή μαρτυρία της χρήσης φαρμακευτικών φυτών για την παρασκευή φαρμάκων έχει βρεθεί σε πινακίδα από πηλό των Σουμερίων (Petrovska *et al.*, 2012, Βογιατζή-Καμβούκου, 2004).

Το κινεζικό βιβλίο "Pen T'Sao" το οποίο γράφτηκε από τον αυτοκράτορα Shen Nung γύρω στο 2500 π.Χ., περιέχει 365 φάρμακα (αποξηραμένα μέρη φαρμακευτικών φυτών), ένα για κάθε μέρα του έτους, πολλά από τα οποία χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα (Petrovska *et al.*, 2012).

Κατά την αρχαία περίοδο οι Αιγύπτιοι έκαναν χρήση ορισμένων φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών στη μумιοποίηση των νεκρών, στην παρασκευή αρωμάτων, στις θρησκευτικές τελετές, στα τρόφιμα και στην ιατρική για την αντιμετώπιση ασθενειών. Σημαντικό εύρημα από εκείνη την εποχή είναι ο Πάπυρος Embers, που γράφτηκε γύρω στο 1550 π.Χ. (Petrovska *et al.*, 2012).

Δεν είναι γνωστό πότε ακριβώς άρχισε η ελληνική θεραπευτική. Διακρίνεται σε τρεις περιόδους την Προϊπποκρατική περίοδο, την Ιπποκρατική περίοδο και την Αλεξανδρινή ή Ελληνιστική. Πιο συγκεκριμένα κατά την Προϊπποκρατική περίοδο οι θεοκρατικές απόψεις αντικαθίστανται από φιλοσοφικές αντιλήψεις. Οι φιλοσοφικές σχολές συντέλεσαν στην ανάπτυξη των θετικών επιστημών και της θεραπευτικής,

καθώς υπάρχουν και έμμεσες πληροφορίες από επιγραφές, αναθηματικές πλάκες και από μη ιατρικά έργα, όπως τα Ομηρικά και Ορφικά έπη. Κατά την Ιπποκρατική περίοδο (459-370 π.Χ.) η θεραπευτική απέκτησε την δική της υπόσταση ως ανεξάρτητη επιστήμη. Θεμελιωτής αυτής της επιστήμης υπήρξε ο Ιπποκράτης που θεωρείται «πατέρας της ιατρικής». Μελέτησε τις θεραπευτικές ιδιότητες των φυτών και κατέγραψε περίπου 400 είδη βοτάνων. Ο Θεόφραστος ο Ερέσιος είναι ο πρώτος και πιο ολοκληρωμένος γνώστης της βοτανικής. Στα δύο βιβλία του «Περὶ φυτῶν ἱστορία» και «Περὶ φυτῶν αἰτιῶν», περιγράφονται ονομαστικά τα φυτά, η γένεσή τους, η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η μορφολογία τους, η γεωγραφική προέλευση και τέλος η ιαματική τους δράση. Λόγω της εκτίμησής του για τα εν λόγω θέματα, κέρδισε το προσωνύμιο του «πατέρα της βοτανικής», δεδομένου ότι έχει μεγάλο μερίδιο στην ταξινόμηση και την περιγραφή των φαρμακευτικών φυτών. Κατά την Αλεξανδρινή ή Ελληνιστική περίοδο δεν συναντάμε κάτι αξιόλογο, τα φυτά μελετώνται μόνο για την χρησιμότητά τους (Γρηγοράτος, 2002, Κατσιώτης, 2015).

Την περίοδο της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας ο πιο σημαντικός συγγραφέας για τα φαρμακευτικά φυτά ήταν ο Διοσκουρίδης, «ο πατέρας της φαρμακογνωσίας. Περίπου το 77 μ.Χ. έγραψε το έργο «Περὶ ὕλης ἰατρικῆς». Ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος (23 μ.Χ.-79 μ.Χ.), σύγχρονος του Διοσκουρίδη μελέτησε περίπου 1000 φαρμακευτικά φυτά στο βιβλίο του «Φυσική Ιστορία».

Μετά την πτώση της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας ακολούθησε η λιγότερο παραγωγική περίοδος του Μεσαίωνα, κατά την οποία δεν σημειώθηκαν σημαντικές επιστημονικές πρόοδοι, διότι η επίδραση του μυστικισμού πάνω στον τομέα της έρευνας των αρωματικών φυτών ήταν μεγάλη. Οι δεξιότητες θεραπείας, καλλιέργειας φαρμακευτικών φυτών και προετοιμασίας φαρμάκων μεταφέρθηκαν σε μοναστήρια.

Τα ταξίδια του Marco Polo (1254-1324) στην τροπική Ασία, την Κίνα και την Περσία, η ανακάλυψη της Αμερικής (1492) και τα ταξίδια του Vasco De Gama στην Ινδία (1498), είχαν ως αποτέλεσμα την εισαγωγή πολλών φαρμακευτικών φυτών στην Ευρώπη. Βοτανικοί κήποι εμφανίστηκαν σε όλη την Ευρώπη και έγιναν προσπάθειες για την καλλιέργεια οικιακών φαρμακευτικών φυτών και αυτών που εισήχθησαν από τον παλιό και τον νέο κόσμο.

Τον 18^ο αιώνα ο Κάρολος Λινναίος μετέβαλε το σύστημα ονομάτων σε διωνυμικό. Το όνομα κάθε είδους αποτελείται από το όνομα του γένους, με ένα αρχικό κεφαλαίο γράμμα, και το όνομα του είδους, με ένα αρχικό μικρό γράμμα.

Οι αρχές του 19ου αιώνα ήταν ένα σημείο καμπής στη γνώση και τη χρήση των φαρμακευτικών φυτών. Η ανακάλυψη, η τεκμηρίωση και η απομόνωση αλκαλοειδών από διάφορα φυτά, καθώς και άλλων ουσιών, όπως η απομόνωση του μίγματος των καρδιακών γλυκοζιτών, σηματοδότησε την αρχή της επιστημονικής φαρμακογωγίας. Με την αναβάθμιση των χημικών μεθόδων, ανακαλύφθηκαν και άλλες δραστικές ουσίες από φαρμακευτικά φυτά όπως οι τανίνες, τα αιθέρια έλαια, οι βιταμίνες, οι ορμόνες κ.λπ (Petrovska *et al.*, 2012).

Τα τελευταία χρόνια τα φαρμακευτικά αρωματικά φυτά παρουσιάζουν ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον και ζήτηση παγκοσμίως καθώς η πλειονότητα των φυσικών προϊόντων ,που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα προέρχεται από τα φυτά.

1.2 Φαρμακευτικά Αρωματικά Φυτά

Το φυτικό βασίλειο περιλαμβάνει τουλάχιστον 350.000 διαφορετικά είδη. Ανάμεσά τους, εκτιμάται ότι υπάρχουν περίπου 18.000 είδη αρωματικών φυτών και 60.000 είδη φαρμακευτικών φυτών. Τα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά (ΦΑΦ) μπορούν να ταξινομηθούν σε τουλάχιστον πενήντα οικογένειες (π.χ. *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Geraniaceae*, *Labiatae*, *Rutaceae*, κ.λπ.). Η διάκριση ανάμεσα στα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά (ΦΑΦ) δεν είναι σαφής, καθώς πολλές φορές έχουν και τις δύο ιδιότητες (Γρηγοράτος, 2002).

Ο όρος φαρμακευτικά αποδίδεται σε φυτά που όταν καταναλωθούν από έμβιο οργανισμό παρουσιάζουν θεραπευτική δράση λόγω των χημικών ουσιών που περιέχουν. Κατά κανόνα τα φυτά αυτά συνδέονται με μια μακροχρόνια εμπειρική χρήση και λαϊκή παράδοση.

Ο όρος αρωματικά αποδίδεται πρωτίστως σε φυτά που περιέχουν αρωματικές ουσίες σε ένα ή σε όλα τους τα τμήματα. Το χαρακτηριστικό άρωμα των φυτών

αυτών οφείλεται στην παρουσία πτητικών συστατικών, τα οποία περιέχουν αιθέρια έλαια.

Τα φαρμακευτικά αρωματικά φυτά αυτούσια, ή τα αιθέρια έλαια, ή τα εκχυλίσματά τους χρησιμοποιούνται:

- ✓ Στην φαρμακευτική βιομηχανία,
- ✓ Στην αρωματοποιία,
- ✓ Στην βιομηχανία καλλυντικών
- ✓ Σαν πρόσθετα στην βιομηχανία τροφίμων, με πολλαπλούς ρόλους (ενισχυτικά γεύσης, αρωματικοί παράγοντες, αντιοξειδωτικά)
- ✓ Στην βιομηχανία ποτών
- ✓ Σε νέα προϊόντα όπως σε αγροχημικά (εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα)

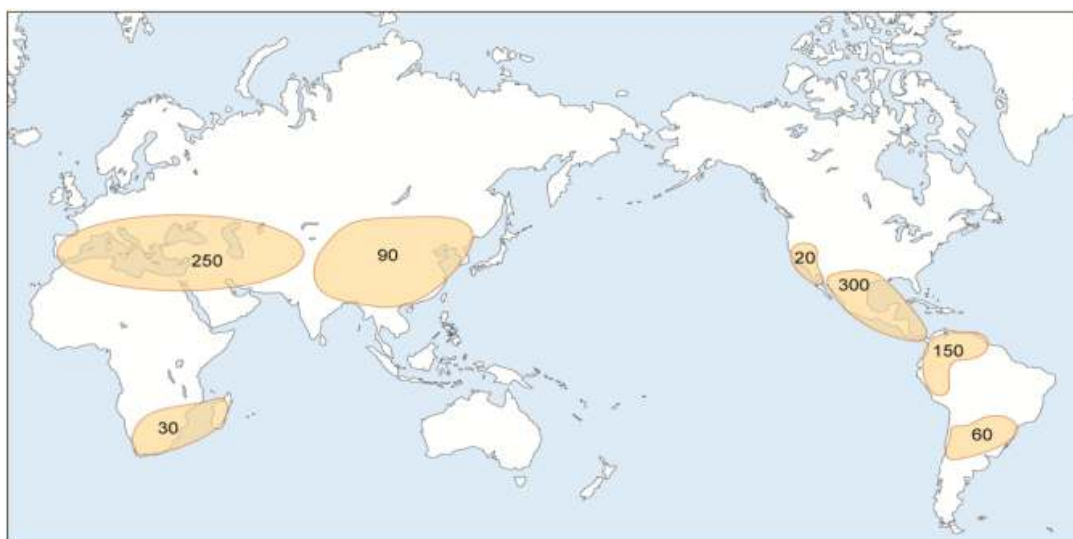
Σύμφωνα με όλους τους παραπάνω τομείς που χρησιμοποιούν τα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι τα τελευταία έχουν μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον σε παγκόσμιο επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα η παγκόσμια αγορά φαρμακευτικών αρωματικών φυτών ανέρχεται στους 440.000 τόνους με κέρδη 1,3 δις αμερικανικού νομίσματος. Τα οικονομικά στοιχεία που μπορούν να διατεθούν για την Ελλάδα είναι περιορισμένα και έχουν την μορφή εκτιμήσεων. Σε σχέση με την έκτασή της ωστόσο περιλαμβάνει 6300 αυτοφυή φυτικά είδη και υποείδη γεγονός που την καθιστά την πλουσιότερη χλωρίδα της Ευρώπης σε σχέση με την επιφάνειά της. Από αυτά τα 500-600 φυτικά είδη είναι φαρμακευτικά αρωματικά φυτά (Γρηγοράτος, 2002, Κατσιώτης, 2015).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκαν τέσσερα είδη που ανήκουν στο γένος Ελελίφασκος (*Salvia*) και στην οικογένεια των Χειλανθών (*Lamiaceae*). Πιο συγκεκριμένα τα είδη είναι το *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa*, *Salvia argentea* και *Salvia ringens*.

1.3 Ονομασία, καταγωγή και εξάπλωση του φασκόμηλου

Η οικογένεια των Χειλανθών (*Lamiaceae*) περιλαμβάνει 200 γένη και 3000 είδη. Ένα από τα μεγαλύτερα γένη της οικογένειας, το γένος Ελελίφασκος *Salvia L.*,

εκπροσωπείται από περισσότερα από 900 είδη και διανέμεται ευρέως σε διάφορες περιοχές του κόσμου όπως φαίνεται και στην εικόνα 1, δηλαδή στην περιοχή της Μεσογείου, τη Νότια Αφρική, την Κεντρική και Νότια Αμερική και τη Νοτιοανατολική Ασία (Torcu *et al.*, 2006). Στην Ελλάδα εντοπίζονται 23 αυτοφυή είδη με τις κοινές ονομασίες φασκομηλιά, αλισφακιά, σπατζιά, φλησκούνι κ.α. Το λατινικό όνομα του φασκόμηλου προέρχεται από τους παλιούς Λατίνους, οι οποίοι το ονόμασαν φυτό σωτηρίας (από το ρήμα *salvare* που σημαίνει «σώζω, θεραπεύω»), πιθανόν αναφερόμενοι στις ιδιότητές του (Gerhard,2003).



Εικόνα 1. Παγκόσμια κατανομή ειδών *Salvia* και παρουσίαση, κατά προσέγγιση, των αριθμών των ειδών που εμφανίζονται σε κάθε περιοχή (Hachew *et al.*, 2020).

Υπάρχουν λίγες συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τις τρέχουσες στατιστικές της αγοράς για τη βιώσιμη συγκομιδή φασκόμηλου. Υπάρχουν πιστοποιημένοι χειριστές που εμπορεύονται βιολογικά άγρια συλλεγόμενα φασκόμηλα από ευρωπαϊκές χώρες που απαιτούν εφαρμογή και επιθεώρηση βιώσιμων σχεδίων διαχείρισης άγριων πόρων. Η ενημέρωση του European Herb Growers Association (EUROPAM) το 2010 σχετικά με την παραγωγή φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών (MAP) στην Ευρώπη, αν και δεν είναι συγκεκριμένη, δείχνει ότι η εμπορική καλλιέργεια αυξήθηκε στη Βουλγαρία ενώ η άγρια συλλογή μειώθηκε. Επιπλέον, δείχνει ότι το φασκόμηλο παραμένει ένα από τα κύρια φαρμακευτικά βότανα που παράγονται στη Γερμανία. και ότι εξακολουθεί να καλλιεργείται στη Ρουμανία και στην Ελλάδα σε συνεταιρισμούς (EUROPAM, 2010).

1.4 Ιδιότητες και χρήσεις του φασκόμηλου

Το φασκόμηλο χρησιμοποιήθηκε για ιατρικούς σκοπούς από αρχαίες κοινωνίες στην Ελλάδα, την Αίγυπτο και τη Ρώμη (Blumenthal *et al*, 2000). Το φύλλο του φασκόμηλου αναφέρεται στα γραπτά του Ιπποκράτη, του Παράκελσου και του Διοσκουρίδη. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι το χρησιμοποιούσαν για την αύξηση της γονιμότητας, ενώ οι αρχαίοι Έλληνες το χρησιμοποιούσαν προκειμένου να σταματήσει η αιμορραγία, να θεραπεύσει μικρές δερματικές πληγές, να θεραπεύσει τη βραχνάδα ή τον βήχα και να βελτιώσει τη λειτουργία της μνήμης (Blumenthal *et al*, 2000). Ο Άγγλος βοτανολόγος John Gerard (1545-1607) ισχυρίστηκε ότι το φασκόμηλο (συνήθως ένα τσάι φτιαγμένο από φύλλα) ήταν καλό για το κεφάλι, τον εγκέφαλο και τη μνήμη, (Woodward, 1994) και ο γιατρός / βοτανολόγος Nicholas Culpeper (1616-1654) πίστευε επίσης ότι βελτιώνει τη μνήμη (Culpeper,1992).

Στην Ινδία, τα φύλλα φασκόμηλου χρησιμοποιήθηκαν επίσης για τη θεραπεία του στομάχου και των στομαχικών αερίων και των λοιμώξεων του στόματος, της μύτης και του λαιμού (Blumenthal *et al.*, 2000). Ιστορικά, το φασκόμηλο έχει χρησιμοποιηθεί για την σταθεροποίηση της εμμηνόρροιας και για τη μείωση της παραγωγής μητρικού γάλακτος για τη διευκόλυνση του απογαλακτισμού. (DerMarderosian, *et al.*, 2002, Wichtl, *et al.*, 2004). Από τα αρχαία χρόνια στις περισσότερες χώρες της Μεσογείου, το φασκόμηλο ήταν δημοφιλές ως μαγειρικό βότανο για την ισχυρή και έντονη γεύση του, ειδικά στα πιάτα με κρέας και πουλερικά.

Το 1985, Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) ενέκρινε τη χρήση φασκόμηλου εσωτερικά για δυσπεψία και υπερβολική εφίδρωση ενώ εξωτερικά για φλεγμονή της μύτης και του λαιμού (Blumenthal *et a.l*, 2000). Το φασκόμηλο έχει επίσης δείξει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ένα από τα συστατικά του φασκόμηλου, το σαλβιανολικό οξύ (ένα φαινολικό οξύ), έχει αντιμικροβιακή δράση κατά του *Staphylococcus aureus* (DerMarderosian, *et al.*, 2002), ένα κοινό βακτήριο που είναι υπεύθυνο για λοιμώξεις του δέρματος και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) υποδηλώνει τη χρήση του φασκόμηλου για φλεγμονή των ούλων, καθώς και των βλεννογόνων του στόματος και του λαιμού (Blumenthal *et al*, 2000).

Το 2009, ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) δημοσίευσε μια τελική μονογραφία που αντικαθιστά τις μονογραφίες των εθνικών αρχών της ΕΕ (συμπεριλαμβανομένων των γερμανικών μονογραφιών) για την καταχώριση παραδοσιακών φυτικών φαρμακευτικών προϊόντων στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα που περιέχουν φασκόμηλο ως δραστικό συστατικό. Προϋπόθεση εγγραφής είναι ότι η ποιότητα συμμορφώνεται με τις αντίστοιχες μονογραφίες των ποιοτικών προτύπων της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (π.χ. Sage Leaf PhEur ή Sage Tincture PhEur). Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο του φασκόμηλου, ο EMA κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι κίνδυνοι δεν υπερβαίνουν τα οφέλη. Έτσι, δεν θα αναπτυχθεί μονογραφία φυτικής προέλευσης της Ευρωπαϊκής Κοινότητας έως ότου γίνουν διαθέσιμα νέα στοιχεία κλινικής ασφάλειας και αποτελεσματικότητας.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, σύμφωνα με την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) το φασκόμηλο εντάσσεται στον κανονισμό ως συστατικό τροφής και ως συστατικό συμπληρώματος διατροφής. Το φύλλο του φασκόμηλου αναφέρεται ως GRAS (Generally Recognized as Safe) για χρήση ως μπαχαρικό, καρύκευμα ή φυσική γεύση, ενώ το αιθέριο έλαιο φασκόμηλου είναι αρωματικός παράγοντας κατά GRAS.

Με βάση την παραδοσιακή χρήση του φασκόμηλου ως βοήθημα στη μνήμη, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές φαρμακολογικές έρευνες σχετικά με τη βιοδραστικότητά του. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κυκλικά μονοτερπένια 1,8-κινεόλη και α-πινένιο, καθώς και η καμφορά, ήταν υπεύθυνα για την αναστολή της χολινεστεράσης. Επιπλέον, η 1,8-κινεόλη, καθώς και το α- και β-πινένιο φάνηκαν εν μέρει υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική δράση του φασκόμηλου. Επειδή πιστεύεται ότι η νόσος του Alzheimer (AD) οφείλεται, κατά ένα μεγάλο ποσοστό σε φλεγμονή και βλάβη που προκαλείται από προ-οξειδωτικές ενώσεις που δρουν στα εγκεφαλικά κύτταρα και επειδή οι αναστολές της χολινεστεράσης είναι μια τυπική θεραπεία για ασθενείς με AD, χρειάστηκαν κλινικές μελέτες για το φασκόμηλο για να προσδιοριστεί εάν θα μπορούσε να είναι η κατάλληλη θεραπεία για την αντιμετώπιση της νόσου. Μια κλινική μελέτη του 2010 των Moss *et al.* διερεύνησε την επίδραση των αιθέριων ελαίων του *S. officinalis* και άλλων ειδών στη γνωστική λειτουργία και τη διάθεση σε 135 υγιείς ενήλικες. Η ομάδα του *S. officinalis* παρουσίασε σημαντικά καλύτερη απόδοση και έλεγχο από τις υπόλοιπες ομάδες όσον αφορά την βραχυπρόθεσμη μνήμη. Ακόμα, σε μια έρευνα των Akhondzadeh *et al.* του 2003 τα

αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά αφού δείχνουν την αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος *Salvia officinalis* στη διαχείριση της ήπιας έως μέτριας νόσου του Alzheimer. Επιπλέον, το *Salvia officinalis* μπορεί να μειώσει την σύγχυση σε ασθενείς με νόσο Alzheimer. Ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για την επικύρωση των αποτελεσμάτων (Akhondzadeh *et al.*, 2003, Moss *et al.*, 2010).

Έχουν επίσης διεξαχθεί κλινικές μελέτες σε ανθρώπους για άλλες πτυχές του φασκόμηλου. Το 2009, οι Scharowal *et al.*, αξιολόγησαν τη σχετική αποτελεσματικότητα ενός ψεκασμού φασκόμηλου/εχινάκειας και ενός ψεκασμού χλωρεξιδίνης/λιδοκαΐνης στη θεραπεία του οξέος πονόλαιμου. Τα αποτελέσματα ήταν εξίσου καλά και στις δύο περιπτώσεις (Scharowal *et al.*, 2009).

Μια μελέτη του 2007 των Reuter *et al.* διερεύνησε τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις ενός εκχυλίσματος φασκόμηλου χρησιμοποιώντας τη δοκιμή υπεριώδους ερυθήματος. Οι περιοχές δοκιμής ήταν στις πλάτες των 40 υγιών εθελοντών, οι οποίοι ακτινοβολήθηκαν με την ελάχιστη υπεριώδη ακτινοβολία πρόκλησης ερυθήματος, στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 2% w/w ενός εμπορικά διαθέσιμου εκχυλίσματος φασκόμηλου, 1% μάρτυρα υδροκορτιζόνης, 0,1% μάρτυρας βηταμεθαζόνης, αλοιφή εικονικού φαρμάκου και χωρίς θεραπεία. Το εκχύλισμα φασκόμηλου μείωσε σημαντικά το ερυθήμα που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο και σε παρόμοιο βαθμό με την υδροκορτιζόνη (Reuter *et al.*, 2007).

1.5 Παρουσίαση των Βοτάνων

1.5.1 *Salvia officinalis*

Μεταξύ των 900 διαφορετικών ειδών του γένους *Salvia*, το *Salvia officinalis* L. αποδίδει το υψηλότερο ποσοστό σε αιθέριο έλαιο και καλλιεργείται εμπορικά για αιώνες για τη χρήση του στα τρόφιμα καθώς και για τις θεραπευτικές του ιδιότητες.

Είναι ένας μικρός πολυετής αειθαλής θάμνος (εικόνα 2), με ύψος και άνοιγμα κόμης μέχρι 70 εκ. με βλαστό πολύκλαδο, τετραγωνικό και χνουδωτό. Ανθίζει στις αρχές του καλοκαιριού, κατά τους μήνες Απρίλιο και Μάιο και τα άνθη είναι μεγάλα



Εικόνα 2. *Salvia officinalis*

μέχρι 3 εκ. με μπλε-μωβ χρώμα. Τα εξαιρετικά αρωματικά του λουλούδια με άφθονο νέκταρ είναι ελκυστικά για τις πεταλούδες και τις μέλισσες. Τα φύλλα του είναι ασημένια-πράσινα, μακρόστενα, με έντονες νευρώσεις και πολύ αρωματικά. Το *S. officinalis* μπορεί να καλλιεργηθεί σε ξηρές, λοφώδεις περιοχές, σε αργιλώδη εδάφη, έως 750 μέτρα υψόμετρο. Προτιμά τις ψυχρές, εύκρατες και υποτροπικές συνθήκες που επικρατούν σε ζεστό και ξηρό καιρό για την ανάπτυξή του. Η περιοχή που έχει αρκετή ηλιοφάνεια με εύφορο αργιλώδες έδαφος σε ελαφρώς όξινο pH και έδαφος με καλή αποστράγγιση είναι ιδανική για καλλιέργεια φασκόμηλου. Πολλαπλασιάζεται με μοσχεύματα ή σπόρους. Στην Ελλάδα είναι ευρύτατα διαδεδομένο σε ορεινές κυρίως περιοχές (Ghorbani *et al.*, 2017).

Μεταξύ των διαφορετικών ειδών *Salvia*, το *S. officinalis* είναι γνωστό ότι περιέχει τη μέγιστη ποσότητα αιθέριου ελαίου στα φύλλα σε ξηρό βάρος. Η απόδοση αιθέριου ελαίου από φύλλα φασκόμηλου αναφέρεται ότι κυμαίνεται από 1,1 έως 2,8% σε ξηρό βάρος και εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως μέση θερμοκρασία, υγρασία και βροχόπτωση. Η μελέτη των Porte *et al.* το 2013 έδειξε ότι τα ξηρά φύλλα του *S. officinalis* από το Ρίο ντε Τζανέιρο αποδίδουν υψηλή ποσότητα και συγκεκριμένα 2,3% αιθέριο έλαιο μέσω της διαδικασίας υδρο-απόσταξης. Επιπλέον είναι πλούσιο σε πολυφαινολικές ενώσεις όπως το ροσμαρινικό οξύ, το καφεϊκό οξύ κ.α. (Porte *et al.*, 2013).

1.5.2 *Salvia fruticosa* Miller

Το *Salvia fruticosa* ή αλλιώς ελληνικό φασκόμηλο, χρησιμοποιείται πιθανώς από το 1400 π.Χ. καθώς έχει βρεθεί ότι απεικονίζεται στην τοιχογραφία "γαλάζιο πουλί" στην Κνωσό (Rivera *et al.*, 994).

Αυτοφύεται στην Ανατολική Μεσόγειο, την Βόρεια Αφρική και την Ασία, ενώ υπάρχει σε αφθονία στο Ισραήλ. Προτιμά εδάφη αμμώδη, χαλικώδη, ασβεστολιθικά με έκθεση στον ήλιο, με εύρος pH από 6,5 – 8 (προτιμότερο ουδέτερο) σε υψόμετρο έως 900 μέτρα.

Είναι πλούσιος αιθαλής και έντονα αρωματικός θάμνος (εικόνα 3) και το ύψος του φτάνει έως 160 cm. Είναι πολύκλαδος και έχει πυκνό ριζικό σύστημα και ημιξυλώδεις βλαστούς καλυμμένους λευκό χνούδι. Τα φύλλα είναι λογχοειδή, απλά



Εικόνα 3. *Salvia fruticosa* Miller

ή με δύο πλευρικούς λοβούς στη βάση τους, με διαφορετικό χρωματισμό στις δύο όψεις τους (γκριζοπράσινα). Τα άνθη σχηματίζουν ταξιανθία βότρυ και κάθε σπόνδυλος περιλαμβάνει 5-9 δίχειλα, ιώδη ή ρόδινα άνθη. Ανθίζει από τον Μάρτιο μέχρι τον Ιούνιο ενώ ο πολλαπλασιασμός του γίνεται με μοσχεύματα. Είναι σημαντική πηγή ροσμαρινικού οξέος, το οποίο παρουσιάζει μια σειρά από ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις, π.χ. αντιακή, αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική. Η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο του *Salvia fruticosa* κυμαίνεται από 1,1–5,1%. Τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου (1,8-κινεόλη, α-θουγιόνη, β-θουγιόνη, καμφορά κ.ά), διαφέρουν ανάλογα με την περιοχή προέλευσης. Αποτελεί παραδοσιακό φαρμακευτικό προϊόν φυτικής προέλευσης για πιθανή θεραπεία της ήπιας δυσπεψίας, την ανακούφιση της υπερβολικής εφίδρωσης και τη πιθανή θεραπεία των φλεγμονών στο στόμα ή το λαιμό και παρουσιάζει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση (Grigoriadou *et al.*, 2020, Leontaritou *et al.*, 2020).

1.5.3 *Salvia argentea*

Το *Salvia argentea* που ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* είναι πολυετής πόα που προέρχεται από την περιοχή της Μεσογείου, τη βορειοδυτική Αφρική (βόρεια Αλγερία, Μαρόκο και Τυνησία), τη νότια Ευρώπη (Ισπανία, Πορτογαλία, Νότια Ιταλία, Σικελία, Μάλτα, Αλβανία, Βουλγαρία, Σλοβενία, Κροατία, Βοσνία, Μαυροβούνιο, Σερβία και Ελλάδα) και Δυτική Ασία (Τουρκία). Αυτή η οικογένεια

είναι γνωστή για τον πλούτο της σε πολλές χημικές ουσίες ικανές να επιδείξουν διάφορες αξιοσημείωτες φαρμακολογικές δραστηριότητες (Benabdesslem *et al.*, 2017).

Είναι γνωστό από την αρχαιότητα με την ονομασία ασημένιο ή αργυρό φασκόμηλο, από τη λατινική λέξη *argentum*=ασήμι, λόγω των μάλλινων ασημένιων φύλλων του. Τα φύλλα έχουν ωοειδές σχήμα, έχουν μια αργυρόχρωμη εμφάνιση (εικόνα 4), όπως προαναφέρθηκε, είναι μεγάλα και οι δύο επιφάνειες των φύλλων



Εικόνα 4. *Salvia argentea*

καλύπτονται έντονα με μεταξωτές τρίχες που του δίνουν μια μάλλινη εμφάνιση και βελούδινη υφή, καλυμμένα με πυκνό χνούδι. Τα λουλούδια εμφανίζονται την άνοιξη ή το καλοκαίρι σε μίσχους που μοιάζουν με κηροπήγια και υψώνονται πάνω από το φύλλωμα. Τα ασυνήθιστα λευκά λουλούδια χρωματίζονται με κίτρινο ή ροζ. Το ύψος του φτάνει τα 60 εκατοστά. Η ταξιανθία είναι αραιή διακλαδισμένη, τριχωτή και ιδιαίτερα κολλώδης. Σπόνδυλοι με 4-8 άνθη. Εμφανίζεται κυρίως σε πετρώδεις πλαγιές και σε ηφαιστειακά εδάφη από 1500 έως 2200 μέτρα υψόμετρο. Οι ρίζες του *Salvia argentea* ανθεκτικές στη θερμότητα και την

ξηρασία, αλλά είναι ευαίσθητες στην υγρασία κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Riccobono *et al.*, 2015).

Το αιθέριο έλαιο του *Salvia argentea* κυμαίνεται από 0,4-0,5%, αποτελείται κυρίως από οξυγονωμένα σесκιτερπένια, τα οποία διαθέτουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές (Benabdesslem *et al.*, 2017).

1.5.4 *Salvia ringens*

Το *Salvia ringens* είναι ένα ανθεκτικό ποώδες πολυετές βότανο (εικόνα 5) που φτάνει σε ύψος τα 60 cm. Είναι αυτοφυές φυτό της Βαλκανικής χερσονήσου και της Μεσογείου, με πολλές αποικίες να αναπτύσσονται στον Όλυμπο στα 1900 μέτρα.

Αναπτύσσεται επιπλέον, σε κωνοφόρα δάση σε χαμηλότερο υψόμετρο και πιο συγκεκριμένα μεταξύ 490-1300 μέτρα.

Καλλιεργούνταν ήδη από το 1913 σαν καλλωπιστικό στους αγγλικούς κήπους. Οι ανθοφόροι βλαστοί έχουν φύλλα στο κατώτερο τμήμα τους, τα οποία είναι γκριζοπράσινα. Από το καλοκαίρι έως το φθινόπωρο, το φυτό παράγει ψηλούς ανθοφόρους μίσχους με δύο έως τέσσερα άνθη στην κορυφή, σε μεγάλες αποστάσεις. Ανθίζει Μάιο μέχρι Σεπτέμβριο και είναι ανθεκτικό στην ξηρασία. Τα άνθη του είναι μπλε-ιώδη και είναι πολύ επιδεικτικά και μεγάλα, διατηρούνται σε ένα μικρό κάλυκα καλυμμένο με μαλλιά και αδένες. Ακόμα έχει ευχάριστο και έντονο άρωμα. Τα εναέρια μέρη του φυτού, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων και των λουλουδιών, χρησιμοποιήθηκαν ευρέως στην εθνοϊατρική για την παρασκευή φαρμάκων και εγχύσεων από τους ντόπιους. Το συγκεκριμένο επίθετο, *ringens*, αναφέρεται στα ανοιχτά λουλούδια με δύο χείλη (Alimpić *et al.*, 2015, Georgiev *et al.*, 2013, Tzakou *et al.*, 2003).



Εικόνα 5. *Salvia ringens*

Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι τα άνθη του *S. ringens* περιέχουν υψηλότερες ποσότητες φλαβονοειδών σε σύγκριση με τα φύλλα (Georgiev *et al.*, 2013). Ακόμα, η μελέτη των Alimpić *et al.*, το 2015 έδειξε ότι το αιθέριο έλαιο του *Salvia ringens* κυμαίνεται από 0,5-0,6% και οι απομονωμένες κύριες ενώσεις είχαν σημαντική αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση, καθώς επίσης ότι η ρίζα του *S. ringens* παρουσιάζει σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι πολλών ανθρώπινων καρκινωμάτων.

1.6 Αιθέρια έλαια

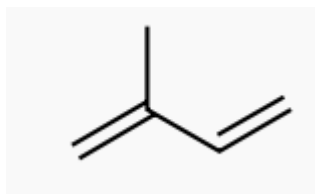
1.6.1 Χημεία αιθερίων ελαίων

Αιθέρια έλαια ορίζονται τα μίγματα των πτητικών ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, τα οποία βρίσκονται στα φύλλα, στους βλαστούς και στα

αναπαραγωγικά όργανα, δηλαδή στους ανθοφόρους οφθαλμούς, τα άνθη, τους καρπούς και τους σπόρους των φυτών. Τα μίγματα αυτά προσδίδουν στο φυτό που τα παράγει μια χαρακτηριστική οσμή και το προστατεύουν από ασθένειες και εχθρούς καθώς και από διάφορες αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η υψηλή θερμοκρασία και το ψύχος. Συνήθως δύο ή τρία από τα συστατικά των αιθερίων ελαίων βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά, τα οποία περιέχονται σε ίχνη. Παραδείγματος χάρη η 1,8- κινεόλη αποτελεί το 46-58,9% του αιθερίου ελαίου του φασκόμηλου *Salvia fruticosa* Miller, ακολουθούμενη από την βιριντιφλορόλη σε ποσοστό 2,1-7%, ωστόσο μια ουσία που περιέχεται σε ένα μίγμα αιθερίου ελαίου σε χαμηλό ποσοστό μπορεί να αλλάξει εντελώς το άρωμά του. Η σύνθεση των αιθερίων ελαίων είναι αποτέλεσμα αποκλειστικά φυσικών ενζυματικών αντιδράσεων.

Η ποσοτική και ποιοτική σύσταση των αιθερίων ελαίων, εξαρτώνται από το χημειότυπο του φυτού, τη γεωγραφική θέση, το στάδιο ανάπτυξης, της καλλιεργητικές φροντίδες (λίπανση, άρδευση), τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, την ημερομηνία και τη συχνότητα συγκομιδής, καθώς και τον χρόνο υδρο-απόσταξης.

Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων διακρίνονται στα οξυγονούχα και μη οξυγονούχα. Στα οξυγονούχα συστατικά ανήκουν οι αλκοόλες, οι αλδεύδες, οι κετόνες, οι φαινόλες, τα οξέα και οι εστέρες. Αντιθέτως στα μη οξυγονούχα ανήκουν οι υδρογονάνθρακες που έχουν μικρή συμβολή στο άρωμα κι τα κυριότερα είναι τα μονοκυκλικά και τα δικυκλικά τερπένια. Από τα οξυγονούχα συστατικά οι εστέρες συμβάλλουν πιο πολύ στο άρωμα των αιθερίων ελαίων.



Εικόνα 6. Μονάδα Ισοπρενίου

Τα αιθέρια έλαια σχεδόν στο σύνολό τους είναι τερπένια και αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων. Η δομή τους προκύπτει από την συνένωση κεφαλής-ουράς μονάδων ισοπρενίου (2-μέθυλο-1,3-βουταδιένιο)

(εικόνα 7). Ο άνθρακας 1, ονομάζεται κεφαλή της ισοπρενικής μονάδας, ενώ ο άνθρακας 4 θεωρείται η ουρά της. Τα τερπένια ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν. Έτσι, τα μονοτερπένια είναι ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα και βιοσυντίθενται από δύο μονάδες ισοπρενίου, τα σесκιτερπένια έχουν 15 άτομα άνθρακα και προέρχονται από τρία μόρια ισοπρενίου (Δόρδας 2012, Jakovljević *et al.*, 2019, Κουτελιδάκης, 2014).

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των τερπενίων

Ταξινόμηση των τερπενίων		
Αριθμός ατόμων άνθρακα	Μονάδες ισοπρενίου	Ταξινόμηση
10	2	Μονοτερπένιο
15	3	Σεσκιτερπένιο
20	4	Διτερπένιο
25	5	Σεστερτερπένιο
30	6	Τριτερπένιο
40	8	Τετρατερπένιο

1.5.2 Παραλαβή αιθερίων ελαίων

Η παραλαβή των αιθερίων ελαίων γίνεται με απόσταξη, με εκχύλιση και με μηχανική παραλαβή. Η επιλογή της μεθόδου έχει να κάνει με το είδος του φυτού αλλά και το τμήμα του φυτού που θα χρησιμοποιήσουμε, την περιεκτικότητά του σε αιθέριο έλαιο, την αξία του αιθερίου ελαίου στην αγορά καθώς και την χημική του σύσταση. Πιο συγκεκριμένα, οι μέθοδοι απόσταξης και εκχύλισης είναι οι εξής:

Πίνακας 2. Τεχνικές Απόσταξης & Εκχύλισης

Τεχνικές Απόσταξης:	Τεχνικές Εκχύλισης:
<ul style="list-style-type: none"> ○ Απόσταξη με υδρατμούς (Steam distillation, SD) ○ Μικρο-απόσταξη με υδρατμούς εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (Micro-Steam distillation extraction, MSDE) ○ Παραλαβή από το χώρο πάνω από 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Απλή εκχύλιση σε «θερμοκρασία δωματίου» ή «εν θερμώ» ○ Εκχύλιση με συσκευή Soxhlet ○ Εκχύλιση υγρού ή στερεού

<p>το φυτό (Head Space,HS)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Απόσταξη με κενό (Vacuum Head Space Distillation, VHSD) 	<p>σώματος διαλυμένου σε υγρό από άλλο υγρό (Liquid-Liquid Extraction)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction) ○ Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultra Sound Assisted Extraction, USE) ○ Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Micro-Wave Assisted Extraction, MWAE) ○ Μικρό-εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-Phase Microextraction, SPME)
--	--

Οι κλασικές μέθοδοι απομόνωσης των πτητικών συστατικών, που είναι υπεύθυνα για το άρωμα ενός φυτού, βασίζονται συνήθως στην εκχύλιση με διαλύτη (extraction) και στην απόσταξη με υδρατμούς (Steam Distillation Extraction, SD). Στην υδροαπόσταξη (εικόνα 9), το προς απόσταξη φυτικό υλικό, τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με νερό, η οποία συνδέεται με ψυκτήρα και με θερμαντική συσκευή. Το χαρακτηριστικό της μεθόδου αυτής είναι ότι το νερό και το φυτικό υλικό είναι σε άμεση επαφή. Στην υδροαπόσταξη πρέπει να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του φυτικού υλικού, ώστε να μην συμβαίνει θερμική διάσπαση διαφόρων συστατικών του αιθερίου ελαίου (εικόνα 8). Με αυτή την μέθοδο αποστάζονται άνθη, καρποί, πέταλα, ρίζες, κλπ. Βασικό μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι, πολλές φορές η δημιουργία συστατικών που δεν αντιπροσωπεύουν το πραγματικό άρωμα του φυτού. Ευαίσθητες ενώσεις, για παράδειγμα μπορούν να υποβαθμιστούν ή να καταστραφούν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απομόνωσης. Το δείγμα εμπλουτίζεται σε συστατικά υψηλού σημείου ζέσεως, με αποτέλεσμα η επί τις εκατό ποσοτική κατανομή των συστατικών να είναι διαφορετική από αυτή στο φυτό.



Εικόνα 7. Αιθέριο έλαιο *S. officinalis*



Εικόνα 8. Απόσταξη με συσκευή Clevenger

1.6 Εκχυλίσματα Βοτάνων

1.6.1 Βιοδραστικά συστατικά εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών

Τα εκχυλίσματα των βοτάνων διαθέτουν βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες διαφέρουν πολύ από την άποψη των δομών, των βιολογικών ιδιοτήτων και των μηχανισμών δράσης τους. Οι ενώσεις αυτές ορίζονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που προκαλούν πιθανώς φαρμακολογικές ή και τοξικολογικές επιδράσεις στον άνθρωπο και τα ζώα (Κουτελιδάκης, 2015). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται εντός των φυτών εμπλέκονται σε κάποιες βιοσυνθετικές και μεταβολικές δραστηριότητες που συνδέονται με την ανάπτυξή τους. Αρκετοί από αυτούς έχει βρεθεί ότι επιτελούν σημαντικές λειτουργίες, όπως η προστασία, η έλξη ή παραγωγή σήματος. Διάφορα φυτοχημικά συστατικά, ειδικά πολυφαινόλες (όπως φλαβονοειδή, φαινυλ-προπανοειδή, φαινολικά οξέα, τανίνες, κ.λπ.) είναι γνωστό ότι είναι υπεύθυνα για τη σάρωση των ελεύθερων ριζών και τις αντιοξειδωτικές δραστηριότητες των φυτών. Οι πολυφαινόλες έχουν πολλές βιολογικές επιδράσεις. Γενικά, οι πολυφαινόλες μοιράζονται τα ίδια χημικά πρότυπα, μία ή περισσότερες φαινολικές ομάδες για τις οποίες αντιδρούν ως δότες υδρογόνου και με αυτόν τον τρόπο εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Τα τελευταία χρόνια, τα εκχυλίσματα πολλών φυτών έχουν ελεγχθεί για τις αντιοξειδωτικές τους δραστηριότητες. Μεταξύ αυτών, το φασκόμηλο (*Salvia officinalis* L.) είναι γνωστό για τις αντιοξειδωτικές του

ιδιότητες και τα περισσότερα από τα ενεργά συστατικά του έχουν ταυτοποιηθεί. Έχει αποδειχθεί ότι τα αντιοξειδωτικά αποτελέσματα οφείλονται κυρίως στις φαινολικές ενώσεις του φυτού. Ωστόσο, αυτές οι μελέτες σχετικά με τα άλλα είδη *Salvia* είναι πολύ περιορισμένες (Nickavar, 2007, Κουτελιδάκης, 2015)

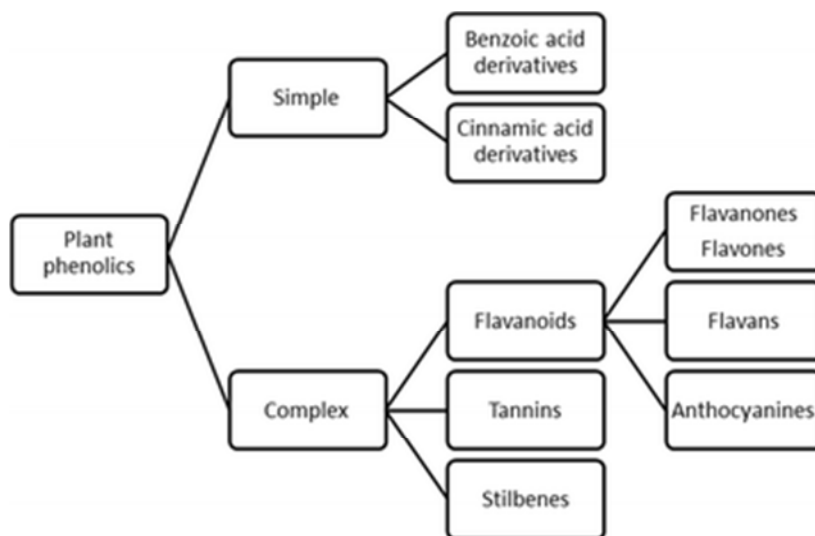
1.6.2 Φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή

Με τον όρο φαινολικές ενώσεις εννοούμε μια κατηγορία ενώσεων που αποτελούνται από έναν αρωματικό δακτύλιο που φέρει μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Προκύπτουν, όπως προαναφέρθηκε, ως δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, δηλαδή παράγονται μέσω συγκεκριμένων βιοσυνθετικών μονοπατιών και προστατεύουν τα φυτά από το οξειδωτικό στρες, την υπεριώδη ακτινοβολία, τις μολύνσεις και άλλους παράγοντες.

Τα φαινολικά οξέα περιλαμβάνουν υδροξυ- και μεθοξυ- παράγωγα του κινναμωμικού οξέος, όπως για παράδειγμα τα κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ. Οι ενώσεις αυτές εντοπίζονται σε πολλά φυτά τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και ως εστέρες με διάφορους υδατάνθρακες. Βρίσκονται σε όλα τα μέρη του φυτού όπως στους σπόρους, τα φύλλα, τα άνθη και το βλαστό. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιαλλεργικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Kontogianni, 2014, Κουτελιδάκης 2015).

Τα φλαβονοειδή θεωρούνται παράγωγα της βενζο-γ-πυρόνης. Τα φλαβονοειδή συνήθως συσσωρεύονται στα επιδερμικά κύτταρα των φυτικών οργάνων, όπως είναι τα φύλλα, τα άνθη, ο βλαστός, οι ρίζες κ.τ.λ. Πολλά είναι υπεύθυνα για τον χρωματισμό των άνθεων. Απαντούν συνηθέστερα υπό την μορφή γλυκοζιτών, αλλά και ως αγλυκόνες (Sakihama, 2002). Τα φλαβονοειδή υποδιαιρούνται στις εξής κατηγορίες (εικόνα 9):

1. Φλαβονόλες
2. Φλαβανόνες
3. Φλαβόνες
4. Φλαβαν-3-όλες
5. Φλαβανονόλες
6. Άλατα του κατιόντος φλαβυλίου όπως οι ανθοκυανιδίνες
7. Ισοφλαβόνες



Εικόνα 9. Κατηγορίες πολυφαινολών

1.7 Δοκιμή DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο)

Η μεθοδολογία DPPH αναπτύχθηκε από τον Blois (1958) και στη συνέχεια τροποποιήθηκε και από άλλους επιστήμονες, όπως τους Brand-Williams *et al.*, και χρησιμοποιεί τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH, η οποία έχει έντονο μωβ χρώμα, το οποίο μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά στα 517 nm. Παρουσία ενώσεων που είναι ικανές είτε να μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο είτε να γίνεται αμοιβαία συνεισφορά ενός πρωτονίου, το DPPH θα αποχρωματιστεί. Στη βιβλιογραφία, η μέθοδος σάρωσης ελευθέρων ριζών 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλίου ($C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394.33$) προσφέρει την πρώτη προσέγγιση για την αξιολόγηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού μιας ένωσης, ενός εκχυλίσματος ή άλλων βιολογικών πηγών. Η μέθοδος είναι μοναδική κατά τη διεξαγωγή της αντίδρασης του δείγματος με DPPH σε διαλύτη μεθανόλη/νερό, η οποία διευκολύνει την εκχύλιση αντιοξειδωτικών ενώσεων από το δείγμα. Αν και η μέθοδος DPPH χρησιμοποιείται ευρέως, έχει κάποιους περιορισμούς. Το ριζικό τμήμα του μορίου είναι ένα άτομο αζώτου που βρίσκεται στο κέντρο της δομής. Ενώ το ριζικό σύστημα είναι ελεύθερα προσβάσιμο σε μικρά

μόρια, μεγαλύτερα μόρια μπορεί να έχουν περιορισμένη πρόσβαση στο ριζικό τμήμα λόγω στερεοχημικών εμποδίων. Επιπλέον, υλικά όπως τα καροτενοειδή έχουν επίσης ισχυρή απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος με το DPPH, γεγονός που επηρεάζει τον προσδιορισμό (Kedare *et al.*, 2011).

1.8 Δοκιμή ABTS

Η ανάλυση ABTS, που αναπτύχθηκε από τους Miller *et al.*, είναι παρόμοια με τη μέθοδο DPPH στο ότι και οι δύο χρησιμοποιούν μια έντονα χρωματισμένη σταθερή ριζική ένωση. Σε αντίθεση με τη μέθοδο DPPH, στην οποία η ριζική μορφή του DPPH έχει ήδη δημιουργηθεί και διατίθεται στο εμπόριο, το ABTS πρέπει να οξειδωθεί στη ριζική μορφή κατιόντος στην αρχή κάθε δοκιμασίας. Η τροποποιημένη τεχνική για τη δημιουργία ρίζας κατιόντος ABTS περιλαμβάνει άμεση παραγωγή του πράσινου-μπλε χρωμοφόρου ABTS μέσω της αντίδρασης μεταξύ ABTS και υπερθειικού καλίου. Αυτό το χρωμοφόρο έχει τρία μέγιστα απορρόφησης σε μήκη κύματος 645, 734 και 815 nm. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών σε αυτή τη ρίζα ακολουθεί έναν μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίων, ο οποίος γίνεται αντιληπτός ως αποχρωματισμός, που αντιστοιχεί στο πότε η ρίζα ABTS μειώνεται από τα αντιοξειδωτικά. Με αυτόν τον τρόπο, ο βαθμός αποχρωματισμού καθιστά δυνατή την αξιολόγηση του ποσοστού αναστολής της ρίζας κατιόντων ABTS, η οποία προσδιορίζεται ως συνάρτηση της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικού και του χρόνου αντίδρασης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox. Μειονέκτημα της μεθόδου μπορεί να είναι το γεγονός ότι η κινητική της αντίδρασης με ορισμένα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι αργή και ως εκ τούτου, μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η μέθοδος είναι εφαρμόσιμη στη μελέτη τόσο υδατοδιαλυτών όσο και διαλυτών σε λιπίδια αντιοξειδωτικών, καθαρών ενώσεων και εκχυλισμάτων τροφίμων (Re *et al.*, 1999, Nenadis *et al.*, 2004).

1.9 Folin–Ciocalteu

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο προσδιορίζεται με τη χρήση του αντιδραστηρίου Folin–Ciocalteu. Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιήθηκε αρχικά το 1972 από τους Folin και Ciocalteu για τη μέτρηση της τυροσίνης. Το αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ($H_3PMo_{12}O_{40}$) και φωσφο-βολφραμικά ($H_3PW_{12}O_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Συγκεκριμένα το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750 nm και η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τον δείκτη Folin-Ciocalteu εκφράζονται συνήθως ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Παρ' όλο που ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, η μέθοδος προσδιορισμού είναι απλή, πρακτική και με αναπαραγώγιμα αποτελέσματα (Ainsworth *et al.*, 2007).

1.10 Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)- Φασματομετρία Μαζών(Mass Spectrometry, MS)

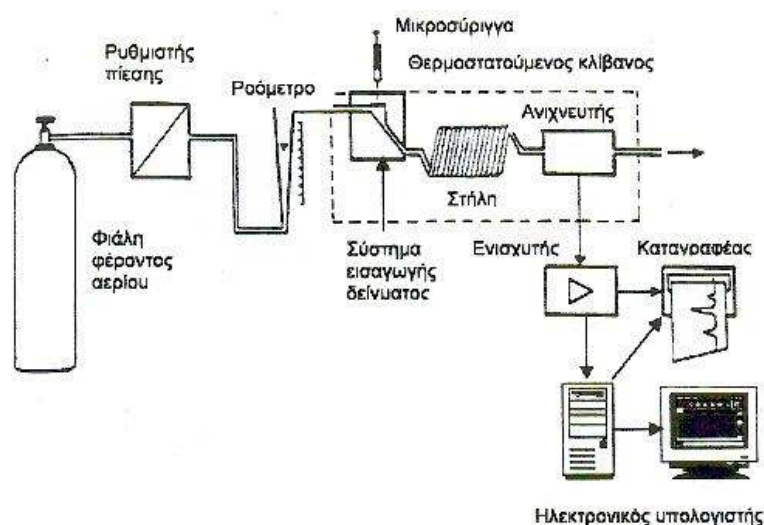
Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) είναι η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με την συσκευή (συγκρότημα οργάνων) "αέριο χρωματογράφο", και στην οποία ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανή αέρια, όπως άζωτο ή ήλιο σε ελεγχόμενες θερμοκρασίες ενώ η στατική φάση είναι είτε στερεό προσροφητικό (π.χ. πυριτική πηκτή) είτε στερεό προσροφητικό που συνιστά την στερεή ή φέρουσα φάση με μόνιμη επικάλυψη υγρής φάσης (Ανδρικόπουλος, 2015, Hao *et al.*, 2007).

Ανάλογα με τα παραπάνω είδη της στατικής φάσης η μέθοδος GC διακρίνεται αντίστοιχα σε αέρια-στερεή χρωματογραφία (gas-solid chromatography, GSC) και σε αέρια-υγρή χρωματογραφία (gas-liquid chromatography, GLC). Με την μέθοδο GSC οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί γίνονται με την αρχή της προσρόφησης, ενώ με την

μέθοδο GLC γίνονται με την αρχή της κατανομής ή με συνδυασμό προσρόφησης-κατανομής (Ανδρικόπουλος, 2015).

Μια συσκευή αέριας χρωματογραφίας (εικόνα 10) αποτελείται από διάφορα όργανα και εξαρτήματα, τα οποία συνδεδεμένα κατάλληλα λειτουργούν ως ενιαίο σύνολο. Τα βασικά όργανα και μέρη ενός συγκροτήματος GC είναι:

- (1) Οβίδα ή φιάλη φέροντος αερίου (κινητής φάσης)
- (2) Ρυθμιστής πίεσης-ροόμετρο
- (3) Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- (4) Θερμοστατούμενος κλίβανος
- (5) Στήλη χρωματογραφίας
- (6) Ανιχνευτής
- (7) Ενισχυτής
- (8) Καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής



Εικόνα 10. Σχηματικό διάγραμμα αέριου χρωματογράφου

Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) είναι βασικά μέθοδος διαχωρισμού και όχι μέθοδος ταυτοποίησης των συστατικών ενός δείγματος. Όταν όμως αυτή συνδυαστεί με τη φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) τότε γίνεται ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του

φέροντος αερίου. Αρκετοί κατασκευαστές οργάνων προσφέρουν αεριοχρωματογράφους, που μπορούν να συζευχθούν άμεσα με φασματομέτρα μαζών (MS) ταχείας σάρωσης. Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης, το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z) και την καταγραφή τους. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος (MB) της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους (Ανδρικόπουλος, 2015, Tere *et al.*, 2005).

Τα φασματομέτρα μαζών αποτελούνται από:

1. Το θάλαμο ιοντισμού, όπου μετατρέπεται η ένωση σε ιόντα, συνήθως κατιόντα με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου,
2. Τον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο m/z ,
3. Τον ανιχνευτή.

Ο χώρος όπου δημιουργούνται και επιταχύνονται τα ιόντα διατηρείται σε κατάσταση υψηλού κενού. Με το υψηλό κενό δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες θέρμανσης ατμοί της προς προσδιορισμό ουσίας χωρίς τη διάσπασή της, που οδηγούνται στο θάλαμο ιοντισμού. Επίσης απομακρύνονται τα μόριά της και τα ουδέτερα προϊόντα της διάσπασης από το χώρο της ανάλυσης μετά από κάθε μέτρηση.

Ο αναλυτής αποτελείται από ένα σωλήνα σε σχήμα τόξου, που βρίσκεται μέσα σε ομογενές μαγνητικό πεδίο μεγάλης έντασης και σε διεύθυνση κάθετη προς τις δυναμικές γραμμές του μαγνητικού πεδίου. Με δύο κυκλικές οπές μεταβλητής ακτίνας στην αρχή και στο τέλος του σωλήνα ένα μέρος από τα ιόντα που δεν εστιάζονται στο κέντρο των διαφραγμάτων απορρίπτεται (Ανδρικόπουλος, 2015).

Ο συνηθέστερος τρόπος ιοντισμού είναι με βομβαρδισμό των αερίων μορίων της ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων (EI). Κατά τον ιοντισμό της ένωσης με ηλεκτρόνια, ο οποίος επιτυγχάνεται με βομβαρδισμό μορίων αυτής με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενέργειας, δημιουργείται με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μέρους της ένωσης μια κατιοντική ρίζα, που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν. Οι κατιοντικές αυτές ρίζες επιταχύνονται αρχικά με ηλεκτρικό πεδίο και στη συνέχεια κινούνται μέσα στο

μαγνητικό πεδίο, οπότε εκτρέπονται και διαχωρίζονται με βάση το m/z . Άλλοι τρόποι σχηματισμού ιόντων είναι ο χημικός ιοντισμός (CI), η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (FI), ο βομβαρδισμό με γρήγορα ουδέτερα άτομα Xe ή Ar ή ιόντα Cs (FIB).

Οι συνηθέστεροι αναλυτές είναι ο αναλυτής τομέα, ο τετραπολικός αναλυτής, η παγίδα ιόντων και ο αναλυτής χρόνου πτήσης.

Λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων, όπως η μεγάλη ευαισθησία, η ταχύτητα και η απλότητα, η αέρια χρωματογραφία είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για αναλυτικούς σκοπούς.

Ο ποιοτικός προσδιορισμός, δηλαδή η ταυτοποίηση των συστατικών ενός μίγματος μπορεί να γίνει με σύγκριση του χρόνου συγκράτησης ($t_{Rχ}$) της άγνωστης ουσίας με αυτόν ($t_{Rσ}$) συγκεκριμένης πρότυπης ουσίας, με τη μέθοδο του εμβολιασμού (spiking), καθώς και με προσδιορισμό του δείκτη συγκράτησης Kovats (Kovats retention index).

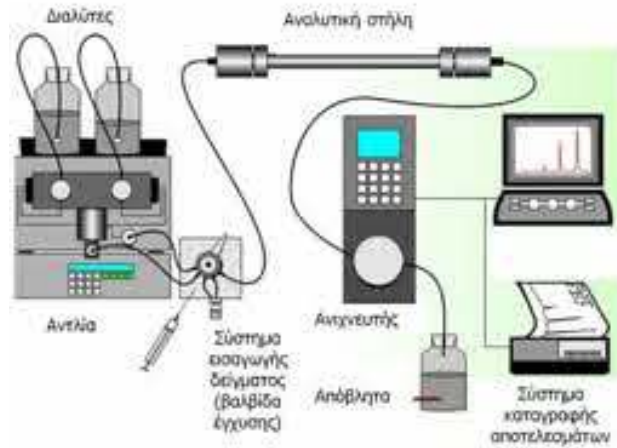
Η περιοχή που περικλείεται από την κορυφή του χρωματογραφήματος και τη βασική γραμμή, αντιστοιχεί στο εμβαδόν της κορυφής το οποίο σχετίζεται με την ποσότητα του αντίστοιχου συστατικού μέσα στο δείγμα. Η ποσοτική ανάλυση γίνεται είτε με βάση το % εμβαδόν (percentage of total), είτε με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου (external standard), είτε με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου (internal standard), όπου παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα της υπό μελέτη ουσίας, στα οποία όμως προστίθεται σταθερή ποσότητα μιας ένωσης που δεν υπάρχει στο δείγμα (εσωτερικό πρότυπο). Η ίδια ποσότητα προστίθεται και στο άγνωστο δείγμα και στην συνέχεια κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς όπου ο λόγος των εμβαδών των κορυφών της ουσίας και του εσωτερικού προτύπου είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης της υπό μελέτη ουσίας. Η μέθοδος αυτή αποτρέπει από σφάλματα που οφείλονται σε μεταβολές φυσικών παραμέτρων, αφού αυτά δεν επηρεάζουν τη σχέση μεταξύ ουσίας και εσωτερικού προτύπου (Ανδρικόπουλος, 2015).

1.11 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)–Φασματομετρία Μαζών (Mass Spectrometry, MS)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή απόδοσης (high pressure or performance- liquid chromatography, HPLC) είναι η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με την συσκευή (συγκρότημα οργάνων) "υγροχρωματογράφο", και στην οποία ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανείς διαλύτες (π.χ. οργανικοί διαλύτες, νερό, ρυθμιστικά διαλύματα) υπό ελεγχόμενη πίεση, ενώ η στατική φάση συνίσταται από πυριτική πηκτή (είτε ελεύθερο, είτε μόνιμα επικαλυμμένο, είτε δεσμευμένο με υποκαταστάτες) ή από πολυμερείς ενώσεις. Ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης η μέθοδος HPLC αποδίδει χρωματογραφικούς διαχωρισμούς σύμφωνα με τις αρχές της προσρόφησης ή της κατανομής ή συνδυασμού προσρόφησης-κατανομής, ή της ιοντο-ανταλλαγής ή της μοριακής διήθησης (Ανδρικόπουλος, 2015, Schoenmakers, 1990).

Μια συσκευή HPLC (εικόνα 11) αποτελείται από διάφορα όργανα και εξαρτήματα, τα οποία είναι συνδεδεμένα σε κοινή λειτουργία και λειτουργούν ως ενιαίο συγκρότημα. Τα βασικά όργανα και μέρη ενός συγκροτήματος HPLC είναι τα παρακάτω:

1. Οι φιάλες (reservoirs) (γυάλινες φιάλες αντιδραστηρίων) των υγρών διαλυτών της κινητής φάσης.
2. Ο θάλαμος της εισαγωγής του δείγματος ή εγχυτής δείγματος (injector)
3. Η στήλη ανάλυσης του δείγματος (analytical column)
4. Οι αντλίες πίεσης (pumps) για την ροή των διαλυτών (συνήθως μία ή δύο) με την βαλβίδα ανάμιξης και προγραμματισμού ροής των διαλυτών.
5. Οι ανιχνευτές (detector), για την ανίχνευση των διαχωρισμένων συστατικών του δείγματος.
6. Ο ολοκληρωτής ή υπολογιστής για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.
7. Ο καταγραφέας για την καταγραφή του χρωματογραφήματος



Εικόνα 11. Σχηματική παράσταση των οργάνων και μερών συσκευής HPLC

Υπάρχουν πολλά είδη ανιχνευτών HPLC, η λειτουργία καθ' ενός από τους οποίους βασίζεται σε ανίχνευση διαφορετικής ιδιότητας, φυσικής ή χημικής του δείγματος. Οι φασματοφωτομετρικοί ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού (ultraviolet-visible, UV-VIS) είναι φασματοφωτόμετρα υπεριώδους-ορατού στην κυνελίδα των οποίων το δείγμα απορροφά την ακτινοβολία ενός ορισμένου μήκους κύματος. Η απορρόφηση οφείλεται στους διπλούς δεσμούς των μορίων του δείγματος, ενώ μόρια κορεσμένα έχουν πολύ μικρή ανιχνευσιμότητα με τον συγκεκριμένο ανιχνευτή. Η επιλογή του μήκους κύματος λ εξαρτάται από την φύση των μορίων. Οι ανιχνευτές φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometers, MS ή LC-MS) για την λειτουργία τους απαιτούν εξάτμιση των διαλυτών έκλυσης. Η μεταφορά του δείγματος έκλυσης από την συσκευή HPLC στον ανιχνευτή LC-MS γίνεται μέσω ενός ειδικού οργάνου, του διασυνδετή (Interface) στον οποίο επίσης γίνεται και ο ιονισμός του δείγματος γιατί ο ανιχνευτής MS λειτουργεί υπό κενό. Η μεταφορά του δείγματος γίνεται με μετατροπή του σε νέφος σταγονιδίων, το οποίο επιτυγχάνεται με θέρμανση (Thermospray, TS), με ηλεκτρική φόρτιση (Electro spray, ES) καθώς και με δέσμη σωματιδίων (Particle Beam, PB). Ο ιονισμός του δείγματος γίνεται με διάφορες τεχνικές όπως η θέρμανση, η ηλεκτρική φόρτιση, με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια με προηγούμενη απομάκρυνση του διαλύτη και με χημικό ιονισμό με μόρια CH_4 ή NH_3 χωρίς την απαραίτητη απομάκρυνση του διαλύτη (Ανδρικόπουλος, 2015, Schoenmakers, 1990)..

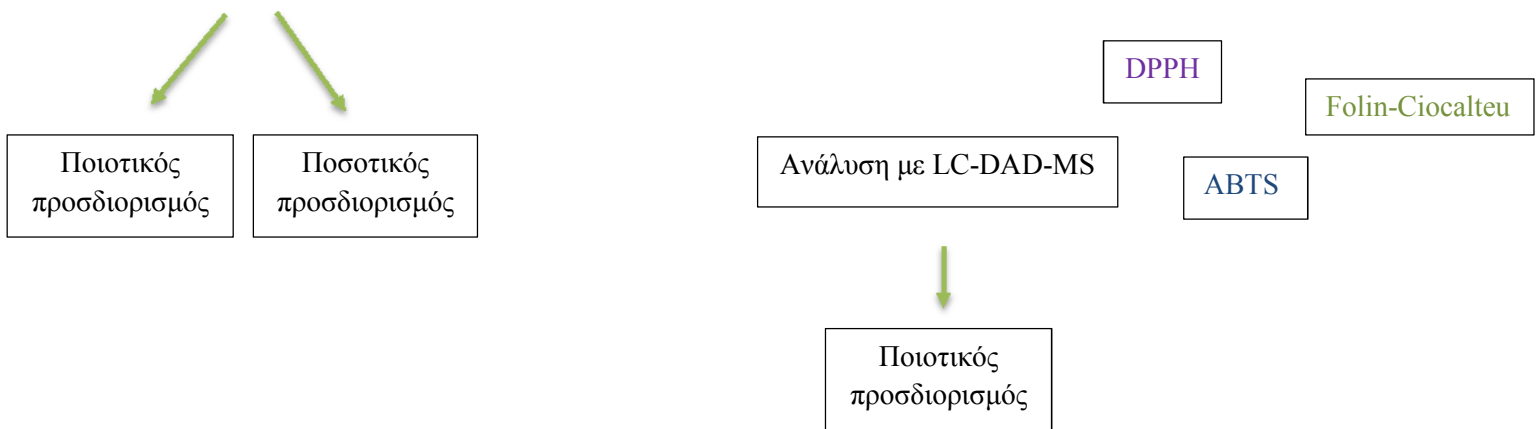
1.12 Σκοπός της μελέτης

Σήμερα, ο κόσμος εξελίσσεται και αναπτύσσεται με ταχύτατους ρυθμούς και τα δημογραφικά στοιχεία του πληθυσμού μεγαλώνουν συνεχώς. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, η χρήση φυσικών διαθέσιμων πόρων να είναι μια νέα πρόκληση και να έχει γίνει μια τυπική προσέγγιση, όπου το επιτρέπει το περιβάλλον. Ωστόσο είναι υψηλής προτεραιότητας το να γίνεται αυτό σε περιοχές που έχουν ευνοϊκές κλιματολογικές συνθήκες. Η ελληνική περιοχή είναι ένα ευνοϊκό μέρος, όπου τα αρωματικά φυτά αποτελούν σημαντικό φυσικό πόρο. Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά είναι σημαντικοί παράγοντες για την αειφόρο ανάπτυξη, την προστασία του περιβάλλοντος και τη δημόσια υγεία.

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η σύγκριση της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων και των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων τεσσάρων ειδών φασκόμηλου της οικογένειας *Lamiaceae* και της βιοδραστικότητάς τους. Πιο συγκεκριμένα, το αιθέριο έλαιο των *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa*, *Salvia argentea* και *Salvia ringens* μετά την συλλογή και την ξήρανσή τους και κατόπιν υδρο-απόσταξης, μελετήθηκε ως προς τη χημική του σύσταση με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών προκειμένου να προσδιοριστούν τα πτητικά συστατικά που αυτό περιέχει. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών που ανιχνεύτηκαν στα αιθέρια έλαια. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών. Τέλος, τα δείγματα ελέγχθηκαν ως προς τη βιοδραστικότητά τους με τις δοκιμές DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu.

1.13 Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας





Κεφάλαιο 2^ο Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη προκειμένου να γίνει η παραλαβή των αιθερίων ελαίων καθώς και η παρασκευή των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων αντίστοιχα είναι τα τέσσερα είδη φασκόμηλου του γένους *Salvia*, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae* και είναι το *Salvia officinalis*, το *Salvia fruticosa*, το *Salvia argentea* και το *Salvia ringens*. Το *Salvia argentea* και το *Salvia ringens* συλλέχθηκαν από τον κ. Παναγιώτη Τρίγκα, Επίκουρο Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής). Πιο συγκεκριμένα, το *Salvia ringens* συλλέχθηκε στο όρος Παρνασσός, δυτικά από τη διασταύρωση για Χ.Κ. Κελάρια, σε ασβεστολιθικά πρανή σε δάσος ελάτης και σε υψόμετρο 1700 m στις 18/6/2019. Το *Salvia argentea* συλλέχθηκε και αυτό στο όρος Παρνασσός, περίπου 0,5 km μετά τη διασταύρωση για Χ.Κ. Κελάρια με κατεύθυνση προς Χ.Κ. Φτερόλακα, σε ασβεστολιθικά βράχια και σε υψόμετρο 1700 m στις 18/6/2019. Το *Salvia officinalis* και το *Salvia fruticosa* προήλθαν από καλλιέργεια του Γεωπονικού Πανεπιστημίου.

Το σύνολο των δειγμάτων ήταν τέσσερα και αναλύθηκαν τα αιθέρια έλαια και τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματά τους. Τα τμήματα του φυτού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα άνθη και τα φύλλα και αφαιρέθηκαν οι ξυλοποιημένοι βλαστοί και οι ρίζες με το χέρι. Όλα τα φυτικά τμήματα ήταν αποξηραμένα και κονιορτοποιήθηκαν με mixer

και στην περίπτωση των αιθερίων ελαίων, αλλά και στην περίπτωση των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων.

2.2 Χημικά

Για την παραλαβή των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη HPLC grade, καθαρότητας 99,9% της εταιρείας Fisher Chemical και απιονισμένο νερό. Για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών με την δοκιμασία DPPH και ABTS χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη HPLC grade, καθαρότητας 99,9% της εταιρείας Fisher Chemical, απιονισμένο νερό, σκόνη DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) της Sigma-Aldrich και καφεϊκό οξύ από την εταιρεία Sigma-Aldrich, σκόνη ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, diammonium salt) καθαρότητας 98%, από την εταιρεία Alfa Aesar και Trolox ((S)-6-Methoxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid). Ακόμα, για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήριο Folin & Ciocalteu, γαλλικό οξύ και ανθρακικό νάτριο καθαρότητας $\geq 99,0\%$ από την Sigma-Aldrich. Για την ανάλυση της υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (LC-MS grade, καθαρότητας $\geq 99,0\%$ της εταιρείας Fisher Chemical) και πρότυπες ενώσεις. Για την παραλαβή των πτητικών συστατικών χρησιμοποιήθηκε διαιθυλαιθέρας και πετρελαϊκός αιθέρας της εταιρείας VMR, καθαρότητας 99,9% και περιεκτικότητα σε BHT (5 ppm). Επίσης, για την ανάλυση της αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες εξάνιο, ακετόνη, άνυδρο θειικό μαγνήσιο MgSO_4 της εταιρείας Sigma-Aldrich και κυκλοεξανόνη καθαρότητας $\geq 99,0\%$ της εταιρείας Merck.

2.3 Παραλαβή υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων

Για την παραλαβή των δευτερογενών μεταβολιτών με εκχύλιση έγινε πρώτα καθαρισμός του δείγματος από τις πτητικές ουσίες και μετά η εκχύλιση με μεθανόλη/νερό. Αρχικά ποσότητα 2g λειοτριβμένου φυτικού υλικού τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη και εμποτίστηκε με 30 mL πετρελαϊκού αιθέρα και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων τύπου GRANT σταθερής συχνότητας 35 kHz, στους 25°C για 15 λεπτά και το ληφθέν εκχύλισμα διηθήθηκε υπό κενό με φιάλη Büchner. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές και ο συνολικός όγκος διαλύτη που

χρησιμοποιήθηκε ήταν 90 mL. Μετά το πέρας της εκχύλισης με πετρελαϊκό αιθέρα το διήθημα που παραλήφθηκε δεν χρησιμοποιείται και το στερεό υλικό, καθαρό πλέον από λιπαρές ουσίες, στεγνώθηκε με άζωτο και στη συνέχεια εκχυλίστηκε εκ νέου με διάλυμα μεθανόλης/νερού σε αναλογία 70:30 (v/v) (MeOH/H₂O, 70:30). Πιο συγκεκριμένα, 2g του λειοτριβμένου υλικού τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη και εμποτίστηκαν με 30 mL διαλύματος μεθανόλης/νερού. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων στους 25°C για 15 λεπτά και το ληφθέν υδρομεθανολικό εκχύλισμα διηθήθηκε υπό κενό. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές και ο συνολικός όγκος διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε ήταν 90 mL (εικόνα 13). Έπειτα το υδρομεθανολικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) με αντλία κενού έως ότου ο οργανικός διαλύτης να εξατμιστεί πλήρως, ενώ το στερεό υπόλειμμα απορρίφθηκε. Το συμπύκνωμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια και λυοφιλοποιήθηκε. Τέλος, τα φιαλίδια με τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C για μελλοντική χρήση.



Εικόνα 12. Υδρομεθανολικά εκχυλίσματα *Salvia argentea* & *Salvia ringens*.

2.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων

2.4.1 Δοκιμασία DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Τα τέσσερα δείγματα του γένους *Salvia* που εκχυλίστηκαν μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τη δοκιμή του διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)(DPPH). Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα εργασίας DPPH συγκέντρωσης 4 mg/mL διαλύτη και στη συνέχεια παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς με οχτώ συγκεντρώσεις πρότυπης ουσίας Trolox. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν διάλυμα μεθανόλη/νερό σε αναλογία 70:30 (v/v). Από κάθε δείγμα υδρομεθανολικού εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν 50 μL σε διάφορες συγκεντρώσεις, στα οποία προστέθηκαν 5 mL από το διάλυμα εργασίας του DPPH. Τα μίγματα ομογενοποιήθηκαν σε αναδευτήρα vortex και επώαστηκαν για 30 λεπτά σε σκοτεινό, ξηρό μέρος και σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα και χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας ο διαλύτης. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο στα 517 nm. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράστηκε σε μg/mL ισοδύναμα Trolox και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτήθηκε για να προκαλέσει παρεμπόδιση στην οξείδωση του υποστρώματος κατά 50% (IC₅₀). Τέλος, η % παρεμπόδιση υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Inhibition (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \cdot 100$$

,όπου A control η απορρόφηση του μάρτυρα και A sample η απορρόφηση του αγνώστου διαλύματος.

2.4.2 Δοκιμασία ABTS (2,2'-azino-bis (3- ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

Τα τέσσερα δείγματα του γένους *Salvia* που εκχυλίστηκαν μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τη δοκιμή του ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diamonium salt]. Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα εργασίας της ρίζας ABTS^{•+} συγκέντρωσης 7 mM και υπερθειϊκού καλίου συγκέντρωσης 2,45 mM. Πιο συγκεκριμένα, για την παρασκευή 10 mL του stock διαλύματος ζυγίστηκαν 38,4 mg ABTS και 6,62 mg υπερθειϊκού καλίου σε δύο

γυάλινα φιαλίδια. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στο stock διάλυμα ήταν το απεσταγμένο νερό. Ομογενοποιήθηκε σε αναδευτήρα vortex και επώαστηκε για 12-16 ώρες σε σκοτεινό μέρος με σταθερή θερμοκρασία δωματίου. Πριν την ανάλυση υπολογίστηκε η κατάλληλη αραιώση του αρχικού πυκνού διαλύματος, το οποίο αραιώθηκε με διαλύτη μεθανόλη/νερό σε αναλογία 70:30 προκειμένου να παρασκευαστεί το διάλυμα εργασίας. Στη συνέχεια, ποσότητα 30 μL από το κάθε δείγμα υδρομεθανολικού εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις αναμίχθηκαν με 3 mL διαλύματος εργασίας ABTS. Τα φιαλίδια ομογενοποιήθηκαν σε αναδευτήρα vortex και επώαστηκαν για 6 λεπτά σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων με φασματοφωτόμετρο στα 734 nm. Ακολούθησαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το καφεϊκό οξύ. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράστηκε σε $\mu\text{g/mL}$ ισοδύναμα Trolox και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτήθηκε για να προκαλέσει παρεμπόδιση στην οξείδωση του υποστρώματος κατά 50% (IC_{50}).

Τέλος, η % παρεμπόδιση υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Inhibition (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \cdot 100$$

,όπου A_{control} η απορρόφηση του μάρτυρα και A_{sample} η απορρόφηση του αγνώστου διαλύματος.

2.5 Εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Τα τέσσερα δείγματα του γένους *Salvia* που εκχυλίστηκαν μελετήθηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε ολικά φαινολικά με την δοκιμή Folin-Ciocalteu. Αρχικά, για την ανάλυση παρασκευάστηκε το διάλυμα του ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 7,5% (w/v). Πιο συγκεκριμένα, σε μία φιάλη των 100 mL τοποθετήθηκαν 7,5g ανθρακικού νατρίου. Στην συνέχεια, προστέθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι την χαραγή και η φιάλη τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο για 15 λεπτά προκειμένου να αναδευτεί και να ομογενοποιηθεί το περιεχόμενο. Έπειτα, για την παρασκευή του stock

διαλύματος σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο μετρήθηκαν 2 mL του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL και συμπληρώθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Ακόμα, ζυγίστηκαν 2 mg από τα λυοφιλοποιημένα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, στα οποία προστέθηκε 1 mL διαλύτη μεθανόλη/νερό σε αναλογία 70:30 (v/v). Για την ανάλυση αναμίχθηκαν 450 μ L απεσταγμένο νερό, 50 μ L δείγματος και 2,5 mL από το διάλυμα εργασίας και αναδεύτηκαν στο vortex. Μετά από 5 λεπτά προστέθηκαν 2 mL ανθρακικού νατρίου και τα φιαλίδια αναδεύτηκαν ξανά στο vortex και στη συνέχεια επώαστηκαν μιάμιση ώρα σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο στα 765 nm. Επιπλέον, παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος από την οποία υπολογίστηκε η περιεκτικότητα του κάθε δείγματος σε ολικές φαινολικές ενώσεις ως ιοδύναμα του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE).

2.6 Απόσταξη των ξηρών φυτικών δρογών με συσκευή Clevenger

Η παραλαβή των αιθερίων ελαίων από τα τέσσερα φυτικά υλικά πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υδρο-απόσταξης με χρήση της συσκευής Clevenger (εικόνα 13). Οι χημικές ενώσεις διαχωρίστηκαν με την βοήθεια του ατμού, ώστε να μην υποβαθμίζεται η ποιότητα του αιθερίου ελαίου. Επιπλέον, με την μέθοδο αυτή υπάρχει μικρότερη απώλεια οργανικής ύλης. Το φυτικό υλικό συγκεκριμένα τα φύλλα και τα άνθη των τεσσάρων ειδών *Salvia*, κατατμήθηκαν με μίξερ προκειμένου να αυξηθούν οι επιφάνειες που είναι πλούσιες σε ελαιοφόρους αδένες προς διευκόλυνση της συλλογής των αιθερίων ελαίων. Έπειτα, αφού ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας, μεταφέρθηκαν σε γυάλινη εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 2L. Στην φιάλη προστέθηκαν 800 mL απεσταγμένο νερό και αφού αναδεύτηκε το περιεχόμενο προστέθηκαν ακόμα 400 mL απεσταγμένο νερό μέχρι να εξασφαλιστεί η άμεση επαφή όλου του φυτικού υλικού με το νερό. Ακόμα, προστέθηκαν κομμάτια πορσελάνης για τον ομαλό βρασμό του μίγματος καθώς και για την ανάδυσή του. Έπειτα, η φιάλη τοποθετήθηκε σε θερμομανδύα και αμέσως μετά συνδέθηκε με τη συσκευή Clevenger, δηλαδή έναν γυάλινο κατακόρυφο σωλήνα συνδεδεμένο με τον ψυκτήρα και βαθμονομημένο σε mL σωλήνα με στρόφιγγα στο κάτω μέρος. Στο

σημείο αυτό προστέθηκαν 100 mL απεσταγμένου νερού. Αναλυτικότερα, η προσθήκη απιονισμένου νερού σε αυτή τη φάση συντέλεσε στο να διατηρηθεί σταθερή η ωσμωτική πίεση καθώς και στο να αποτραπεί η διαφυγή ατμών σε αντίθετη κατεύθυνση από αυτήν του ψυκτήρα, ο οποίος διαβρεχόταν με νερό βρύσης. Στην συνέχεια, η παροχή θερμότητας ρυθμίστηκε με τρόπο τέτοιο ώστε η θερμοκρασία να αυξάνεται σταδιακά και με αυτόν τον τρόπο να προστατεύονται οι ευαίσθητες στην θερμοκρασία χημικές ενώσεις. Η υπερκείμενη της υδατικής, φάση του αιθέριου ελαίου συσσωρεύτηκε στον βαθμονομημένο σωλήνα και το νερό που αποσταζόταν ανακυκλωνόταν συνεχώς και επέστρεφε στη φιάλη. Η απόσταξη διήρκησε 3 ώρες, όταν πλέον παρατηρήθηκε ότι η ποσότητα του αιθέριου ελαίου στον βαθμονομημένο σωλήνα δεν αυξάνεται άλλο.



Εικόνα 13. Υδρο-απόσταξη φυτικού υλικού με συσκευή Clevenger

2.7 Παραλαβή των αιθερίων ελαίων

Μετά το πέρας της απόσταξης το αιθέριο έλαιο παρέμεινε μία ώρα στη συσκευή έως ότου μειωθεί η θερμοκρασία του συστήματος και συλλεχθούν όλες οι πτητικές ενώσεις. Το αιθέριο έλαιο κάθε φυτικού υλικού μετρήθηκε στον βαθμονομημένο σωλήνα της συσκευής σε mL από την οποία υπολογίστηκε η απόδοση εκφρασμένη σε

mL/100 g ξηρού φυτικού υλικού και έπειτα μετά την απομάκρυνση της υδατικής φάσης, το αιθέριο έλαιο συλλέχθηκε σε ένα μικρό ποτήρι ζέσεως. Στο ποτήρι ζέσεως με το αιθέριο έλαιο προστέθηκε ελάχιστη ποσότητα άνυδρου θειϊκού μαγνησίου προκειμένου να απομακρυνθεί κάθε ίχνος υγρασίας και στη συνέχεια το μίγμα διηθήθηκε για να απομακρυνθεί το ένυδρο θειϊκό μαγνήσιο και παραλήφθηκε το αιθέριο έλαιο απαλλαγμένο από υγρασία. Στην περίπτωση που το αιθέριο έλαιο δεν ήταν δυνατό να παραληφθεί με τον παραπάνω τρόπο, διότι είχε σχηματίσει υδρόλυμμα ακολουθήθηκε άλλη διαδικασία. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υγρού-υγρού με διαλύτη τον διαιθυλαιθέρα σε διαχωριστική χοάνη. Ο διαλύτης χωρίστηκε σε τρία μέρη και η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε τρεις φορές έτσι ώστε να εκχυλιστεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα ελαίου. Στην περίπτωση σχηματισμού γαλακτώματος προστίθενται 10 mL κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου νατρίου. Μετά τον διαχωρισμό η οργανική φάση μεταφέρθηκε σε μια κωνική φιάλη. Έπειτα, η οργανική φάση συμπυκνώθηκε με αέριο άζωτο N₂ προκειμένου να εξατμιστεί ο διαλύτης μέχρι τελικό όγκο τα 5 mL. Τέλος, τα αιθέρια έλαια αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη σε γυάλινο φιαλίδιο έως ότου αναλυθούν σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματοόμετρο μαζών (GC-MS).

2.8 Ανάλυση και ταυτοποίηση των αιθερίων ελαίων με Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)

Αρχικά, πριν την ανάλυση του κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε συγκεκριμένη αραιώση σε αυτά με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύτη. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε 1mL (1000 μL) διαλύματος με αναλογία ελαίου/διαλύτη 1/10000 v/v (δηλαδή 2 αραιώσεις 1/100 v/v). Πιο συγκεκριμένα λήφθηκαν 10 μL αιθερίου ελαίου και 990 μL διαιθυλαιθέρα (1^η αραιώση) και έπειτα λήφθηκαν 10 μL από την 1^η αραιώση και σε αυτά προστέθηκαν 980 μL διαιθυλαιθέρα και 10μL πρότυπου διαλύματος κυκλοεξανόνης και το κάθε διάλυμα μεταφέρθηκε σε καθαρό γυάλινο φιαλίδιο (vial). Για την ποσοτική ανάλυση των συστατικών των αιθερίων ελαίων παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα κυκλοεξανόνης 10μL/mL, το οποίο περιείχε 50 μL κυκλοεξανόνης και 5 mL διαιθυλεθαίρα. Όπως προαναφέρθηκε για τον διαχωρισμό των συστατικών των αιθερίων ελαίων εφαρμόστηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας και για την ταυτοποίησή τους η

φασματομετρία μαζών (εικόνα 14). Πιο συγκεκριμένα, το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αέριος χρωματογράφος (SCION) συζευγμένος με ανιχνευτή φασματομέτρο μαζών και αυτόματο δειγματολήπτη (CP-8400), της εταιρείας Brucker. Η στήλη του χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν Rxi – 5Sil ms cap. Column 30m x0,25 mm, id 0.25 μ m. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He), με ταχύτητα ροής 1,0 mL/min σε σταθερή πίεση. Η θερμοκρασία στον εισαγωγέα ήταν 220°C και στην πηγή ιονισμού 230°C. Η πηγή λειτούργησε με ηλεκτρική τάση 70 eV. Το πρόγραμμα ανάλυσης, το οποίο είχε διάρκεια 63,33 min, περιλάμβανε άνοδο της θερμοκρασίας της στήλης, η οποία αρχικά ήταν στους 60°C και τελικά αυξανόταν βαθμιαία μέχρι τους 250°C με ρυθμό 3°C/λεπτό. Ο όγκος του προς ανάλυση δείγματος ήταν 1 μ L. Η ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών έγινε με σύγκριση των χρόνων συγκράτησης και των φασμάτων μαζών με αυτών των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών NIST που υπάρχουν στο λογισμικό του οργάνου και με δεδομένα της βιβλιογραφίας (Adams, 4th Edition). Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με το εμβαδόν των κορυφών των συστατικών ενώ ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης αυτών με τη βοήθεια του εσωτερικού προτύπου, της κυκλοεξανόνης.



Εικόνα 14. Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματομέτρο μαζών (GC-MS SCION Brucker).

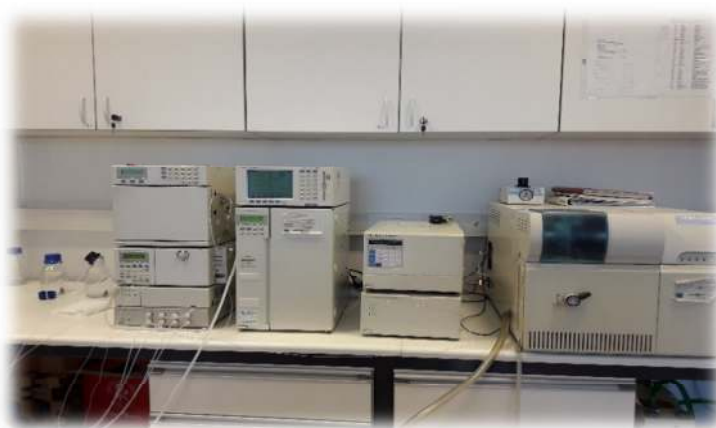
2.9 Χημική ανάλυση με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC-DAD-MS)

Ο ποιοτικός χαρακτηρισμός των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων *Salvia* πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων και φασματομετρία μαζών (LC-DAD-MS) (εικόνα 15) της εταιρείας SHIMADZU ρυθμισμένο σε όγκο ένεσης δείγματος 20μL. Τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1 mg/mL. Αναλυτικότερα, το σύστημα αποτελούνταν από αντλία LC-10ADvp, απαερωτή DGU-14A, βαλβίδα ανάμιξης διαλυτών FCV-10ALvp, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADvp, φούρνο στήλης CTO-10Avp, ανιχνευτή SPD-M10Avp, Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis) μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (DAD), φασματογράφο μάζας LC-MS 2010A, απλού τετραπόλου, μονάδα ελέγχου SCL-10Avp και λογισμικό LCMS solution 3.40.307. Το μήκος κύματος εργασίας ήταν τα 330nm. Οι συνθήκες του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στην λειτουργία του αρνητικού ιονισμού. Ως στατική φάση, χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης, Supelco Discovery HS C18, μήκους 25 cm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm και μεγέθους σωματιδίων 5 μm. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε κατάλληλες συγκεντρώσεις σε μεθανόλη για HPLC, αφού προηγήθηκε διήθηση σε φίλτρα, και ποσότητα 20 μL εισήχθη στον αυτόματο δειγματολήπτη. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0,4 mL/λεπτό ενώ η θερμοκρασία της στήλης ήταν 30°C. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανεστραμμένης φάσης και γι' αυτόν τον λόγο συνδυάστηκαν δύο διαλύτες. Πιο συγκεκριμένα, οι διαλύτες που αποτέλεσαν την κινητή φάση ήταν Α το νερό οξιτισμένο με μυρμηγκικό οξύ (0,25%) και Β η μεθανόλη. Η θερμοκρασία της πηγής ιονισμού ήταν 350°C. Το εύρος για το κλάσμα m/z ορίστηκε μεταξύ 50-1000 για τον αρνητικό ιονισμό. Πραγματοποιήθηκε βαθμιδωτή έκλυση διαλυτών προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των προς ανάλυση συστατικών. Το πρόγραμμα παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 3. Πρόγραμμα ανάλυσης LC-DAD-MS

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α% (v/v)	Διαλύτης Β% (v/v)
--------------	-------------------	-------------------

0	75	25
2	75	25
40	10	90
45	10	90
50	75	25
60	75	25



Εικόνα 15. Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας-συστοιχίας φωτοδιοδών-φασματομετρίας μαζών (LC-DAD-MS) που χρησιμοποιήθηκε.

Κεφάλαιο 3^ο Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 Αποτελέσματα απόσταξης των φυτικών δρογών φασκόμηλου

Από την υδρο-απόσταξη του φυτικού υλικού των ειδών του γένους *Salvia spp* και την παραλαβή των αιθερίων ελαίων τους, σημειώθηκαν οι ποσότητές τους σε mL με την προσεκτική παρατήρηση του βαθμονομημένου κυλινδρικού σωλήνα της αποστακτικής μηχανής Clevenger, στον οποίο συλλέγονταν τα αιθέρια έλαια. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι ποσότητες των ελαίων φασκόμηλου που λήφθηκαν από κάθε υδρο-απόσταξη.

Πίνακας 4. Σύνοψη των αποδόσεων επί τοις εκατό (%) εκφρασμένων ως ποσοτήτων (mL) ανά 100 g ξηρού φυτικού υλικού τεσσάρων ειδών αιθερίου ελαίου φασκόμηλου.

Φυτικό Υλικό	Ζύγιση (g)	Ποσότητα αιθερίου ελαίου μετά την υδρο-απόσταξη (mL)	Ποσότητα αιθερίου ελαίου (mL/100g ξηρού φυτικού υλικού)
<i>Salvia officinalis</i>	60	0,8	1,3
<i>Salvia ringens</i>	62,5	0,3	0,5
<i>Salvia argentea</i>	45,72	0,2	0,4
<i>Salvia fruticosa</i>	60	1,3	2,16

Οι παραπάνω τιμές χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση και την εκτίμηση των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών των αιθερίων ελαίων.

3.2 Επισκόπηση χημικών ενώσεων των αιθερίων ελαίων των ειδών φασκόμηλου.

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των επιμέρους συστατικών, που περιέχονται στα αιθέρια έλαια του φασκόμηλου, επιτεύχθηκαν με την επικυρωμένη μέθοδο της Αέριας Χρωματογραφίας συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (GC-MS). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αποτυπώθηκαν σε χρωματογράφημα και παρουσιάζονται παρακάτω. Έπειτα, με τη βοήθεια βιβλιογραφικών δεδομένων (ADAMS), επικυρωμένων ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών, του φάσματος μάζας καθώς και σύγκριση του χρόνου συγκράτησης (Retention time, RT) πιστοποιήθηκε η ταυτότητα των οργανικών ενώσεων που περιλαμβάνονται σε κάθε αιθέριο έλαιο, μέσω του προγράμματος AMDIS που χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση των κορυφών απορρόφησης των ιόντων στο φάσμα μάζας. Στους ακόλουθους πίνακες 5,6,7 και 8 παρουσιάζονται τα συστατικά και η χημική σύσταση του κάθε αιθερίου ελαίου και έπειτα παραθέτονται τα σχήματα 1,2,3,4 των αέριων χρωματογραφημάτων και οι δομές τους (εικόνα 16,17,18,19). Σε κάθε μία από τις ταυτοποιημένες ουσίες που παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες, αναγράφονται επίσης κάποια από τα κύρια χαρακτηριστικά τους, όπως ο χημικός τους τύπος και το μοριακό τους βάρος

(M.B.), καθώς και ο χρόνος συγκράτησης (Retention Time, RT) βασικό στοιχείο των χρωματογραφημάτων. Επιπλέον, παρουσιάζονται οι ποσότητες των συστατικών σε $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου καθώς και μg ανά 100 g ξηρού φυτικού υλικού.

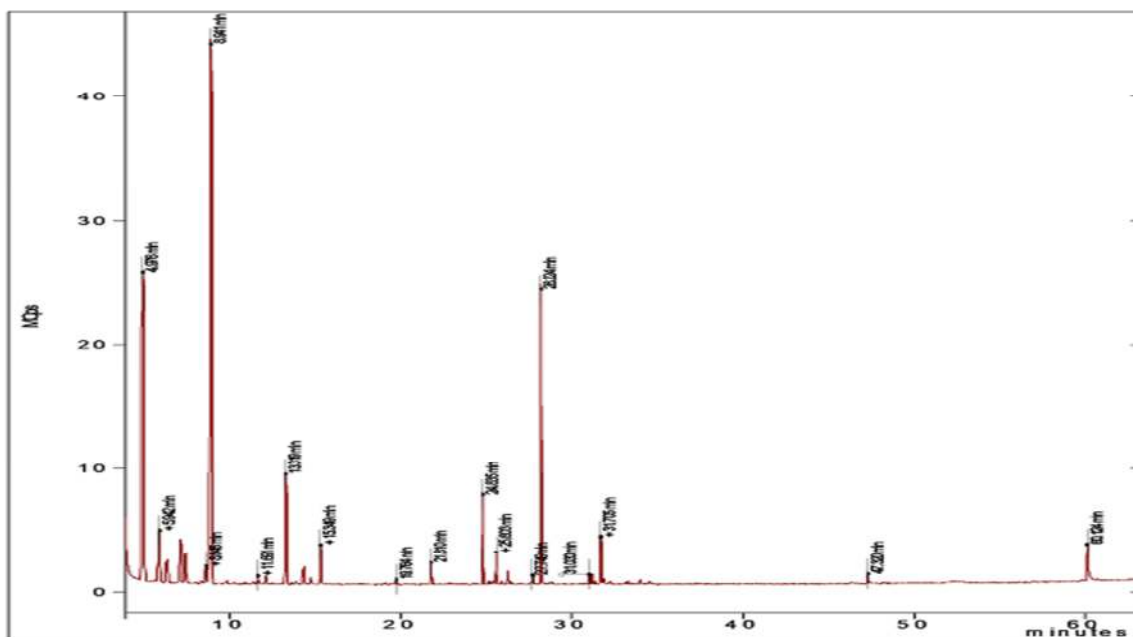
3.2.1 Αιθέριο έλαιο *Salvia fruticosa*

Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia fruticosa* ανιχνεύτηκαν 26 πτητικά συστατικά. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 5 το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου είναι η 1,8-κινεόλη με ποσοστό 48,50%. Ακολουθούν η καμφορά με ποσοστό 7,64%, το α -πινένιο (6,22%), το *E*-καρνοφυλλένιο (5,92%), το β -πινένιο (4,74%), το μυρκένιο (3,06%), ο 2-υδροξυλ-1-(υδροξυμεθυλ) έθυλ εστέρας του εξανοϊκού οξέος (3,06%), η βιριδιβλορόλη (3,02%), η α -τερπινεόλη (2,71%), το καμφένιο (2,67%) και η αρωμαδενδρίνη (2,08%). Ακολουθούν μικρότερα ποσοστά όπως αυτό της βορνεόλης (1,97%) και του π -κυμενίου (1,45%). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης συμφωνούν και με την βιβλιογραφία, αφού και σε πολλές άλλες μελέτες το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου του *Salvia fruticosa* ήταν η 1,8-κινεόλη σε ποσοστό από 27,78% έως 46,65%, ακολουθούσε η καμφορά σε ποσοστό από 5,2% έως 15,6%. Πιο συγκεκριμένα, οι Leontaritou *et al.*, (2020) στη μελέτη τους αναφέρουν ότι το κύριο συστατικό στο αιθέριο έλαιο του *Salvia fruticosa* ήταν η 1,8-κινεόλη και έπειτα η καμφορά, το α -πινένιο, το β -καρνοφυλλένιο και το καμφένιο. Ακόμα, οι Karik *et al.*, (2018) αλλά και οι Zgheib *et al.*, (2019) ανίχνευσαν σαν κύριο συστατικό την 1,8-κινεόλη, ενώ η δεύτερη μεγαλύτερη σε αφθονία ουσία ήταν το β -πινένιο. Ωστόσο, άλλες μελέτες όπως των Arikat *et al.*, (2004) αναφέρουν ως κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου του *Salvia fruticosa* την καμφορά και μετέπειτα την 1,8-κινεόλη, επίσης σημαντικό ποσοστό στο ίδιο δείγμα κατέχουν η α - και β -θουγιόνη. Το υπόλοιπο χημικό προφίλ του αιθερίου ελαίου του *Salvia fruticosa* σύμφωνα με την βιβλιογραφία δεν διαφέρει σημαντικά, καθώς οι ουσίες που ανιχνεύονται είναι κοινές (Leontaritou *et al.*, 2020, Karik *et al.*, 2018, Zgheib *et al.*, 2019, Arikat *et al.*, 2004).

Πίνακας 5. Σύσταση αντιπροσωπευτική για το αιθέριο έλαιο *Salvia fruticosa* με την τεχνική GC-MS.

Συστατικά	Χημικός Τύπος	M.B.	Retention time (min)	μg/mL αιθερίου ελαίου	μg/100g ξηρού φυτικού υλικού	% ποσοστό
1. <i>α</i> -πινένιο	C ₁₀ H ₁₆	136	5.942	1,42	3,07	6,22
2. Καμφένιο	C ₁₀ H ₁₆	136	6.383	0,61	1,32	2,67
3. <i>β</i> -πινένιο	C ₁₀ H ₁₆	136	7.179	1,08	2,34	4,74
4. Μυρκενίο	C ₁₀ H ₁₆	136	7.467	0,70	1,51	3,06
5. <i>ρ</i> -κυμένιο	C ₁₀ H ₁₄	134	8.646	0,33	0,71	1,45
6. 1,8-κινεόλη (ευκαλυπτόλη)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	8.941	11,04	23,93	48,50
7. <i>γ</i> -τερπινένιο	C ₁₀ H ₁₆	136	9.859	0,06	0,12	0,25
8. <i>cis</i> -θουγιόνη	C ₁₀ H ₁₆ O	152	11.691	0,13	0,29	0,58
9. <i>trans</i> - θουγιόνη	C ₁₀ H ₁₆ O	152	12.145	0,13	0,27	0,55
10. Καμφορά	C ₁₀ H ₁₆ O	152	13.319	1,74	3,77	7,64
11. <i>δ</i> -τερπινεόλη	C ₁₀ H ₁₈ O	154	14.293	Tr	Tr	Tr
12. Βορνεόλη	C ₁₀ H ₁₈ O	154	14.365	0,45	0,97	1,97
13. Τερπιν-4-όλη	C ₁₀ H ₁₈ O	154	14.744	0,10	0,23	0,46
14. <i>α</i> -τερπινεόλη	C ₁₀ H ₁₈ O	154	15.349	0,62	1,34	2,71
15. Καρβακρόλη	C ₁₀ H ₁₄ O	150	19.764	0,07	0,15	0,31
16. Οξικό <i>α</i> - τερπινύλιο	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	21.810	0,31	0,68	1,38
17. (<i>E</i>)- καρνοφυλλένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	24.835	1,35	2,92	5,92
18. Αρωμαδενδρίνη	C ₁₅ H ₂₄	204	25.603	0,47	1,03	2,08
19. <i>α</i> - χουμουλένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	26.282	0,20	0,44	0,90
20. Βιριδιφλορένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	27.749	0,12	0,27	0,54
21. Σπαθουλενόλη	C ₁₅ H ₂₄ O	220	31.030	0,14	0,31	0,63
22. Οξειδίο καρνοφυλλενίου	C ₁₅ H ₂₄ O	220	31.222	0,16	0,34	0,69

23.	Βιριδιφλορόλη	$C_{15}H_{26}O$	222	31.705	0,69	1,49	3,02
24.	Μανούλη	$C_{20}H_{34}O$	291	47.320	0,16	0,34	0,70
25.	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	$C_{16}H_{32}O_2$	256	60.124	0,70	1,51	3,06

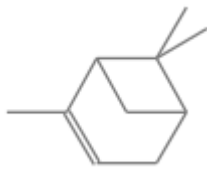


Σχήμα 1. Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου *Salvia fruticosa*

*N.I.: Not Identified

Παρακάτω παρουσιάζονται οι δομές των συστατικών που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο *Salvia fruticosa*, βάσει των οποίων διαχωρίζονται σε ομάδες, με επικρατέστερα τα τερπένια χαμηλού μοριακού βάρους. Από αυτές τις ενώσεις, η πιο χαρακτηριστική για το αιθέριο έλαιο *Salvia fruticosa* είναι το δικυκλικό οξυγονωμένο μονοτερπένιο 1,8-κινεόλη ή κοινώς ευκαλυπτόλη.

Μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες



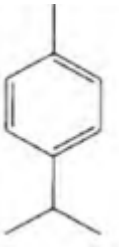
α-πινένιο



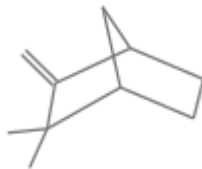
β-πινένιο



Μυρκένιο



p-κυμένιο

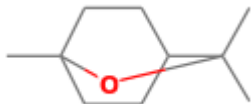


Καμφένιο

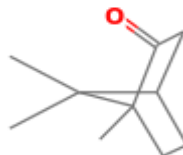


γ-τερπινένιο

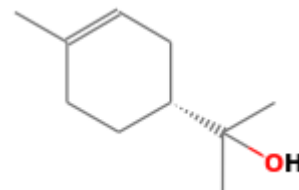
Οξυγονωμένα μονοτερπένια



1,8-κινεόλη



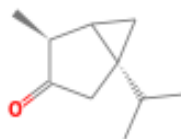
Καμφορά



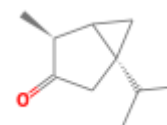
α-τερπινεόλη



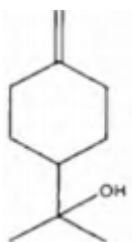
Βορνεόλη



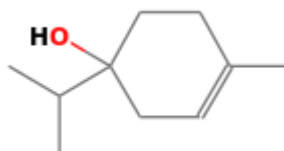
cis-θουγιόνη



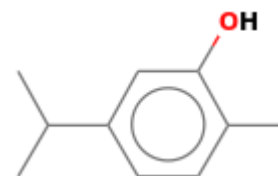
trans-θουγιόνη



δ-τερπινεόλη

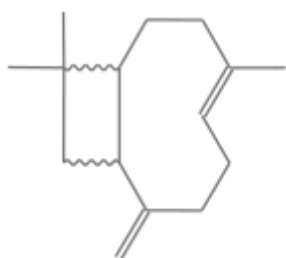


Τερπιν-4-όλη

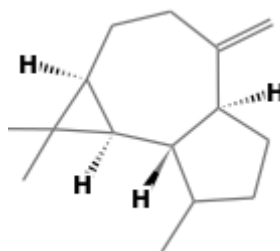


Καρβακρόλη

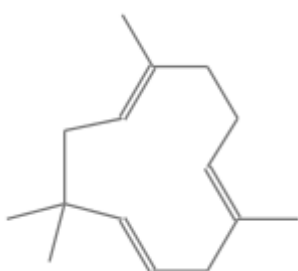
Σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες



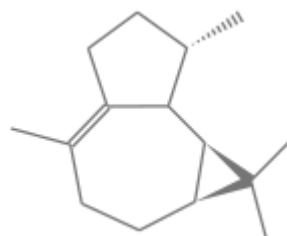
(E)-καρυοφυλλένιο



Αρωμαδενδρίνη

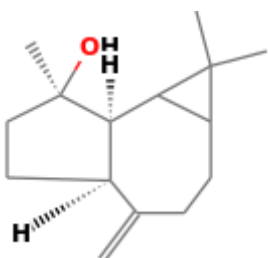


α-χουμουλένιο

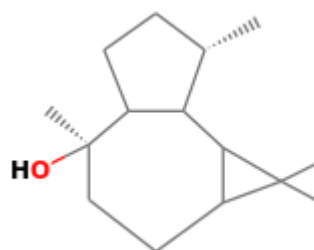


Βιριδιφλορένιο

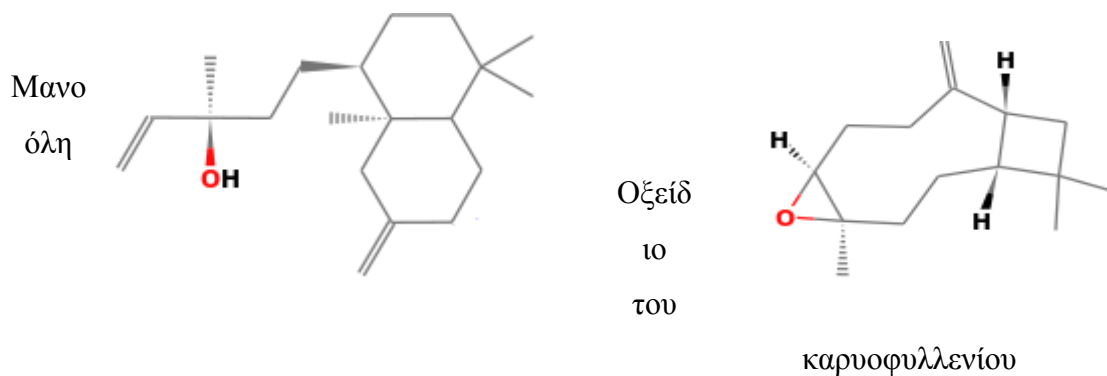
Οξυγονωμένα σεσκιτερπένια



Σπαθουλενόλη



Βιριδιφλορόλη



Εικόνα 16. Δομές συστατικών του αιθέριου ελαίου *Salvia fruticosa*

3.2.2 Αιθέριο έλαιο *Salvia argentea*

Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia argentea* ανιχνεύτηκαν 30 πτητικά συστατικά από τα οποία αναγνωρίστηκαν τα 20. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 6 το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου είναι το *D*-γερμακρένιο με ποσοστό 37,41%. Ακολουθούν το *E*-καρνοφυλλένιο (6,75%) και το οξείδιο του καρνοφυλλενίου (6,12%). Σημαντικά ποσοστά παρουσιάζουν και το δ -καδινένιο (2,50%), το α -φαρνεσένιο (1,93%), το Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol (1,74%), η αμπιενόλη (1,72%) και το α -χουμουλένιο (1,48%). Παρατηρείται λοιπόν από την ανάλυση του συγκεκριμένου δείγματος αιθέριου ελαίου η παρουσία σεσκιτερπενίων και οξυγονομένων σεσκιτερπενίων. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία τα αποτελέσματα από την ανάλυση αιθέριου ελαίου *Salvia argentea* διαφέρουν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας. Πιο συγκεκριμένα, οι Farhat *et al.* (2013), στην μελέτη τους ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου τη βιριδιφλορόλη σε ποσοστό 26,93%, ακολούθως την μανούλη (13,59%), την α -θουγιόνη (6,39%) και το α -χουμουλένιο (5,28%). Ακόμα, οι Riccobono *et al.*, (2015) ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου το υδρόξυ- α -χουμουλένιο σε ποσοστό 40,1%, ακολούθως το 1,3,8-*p*-methatriene σε ποσοστό 12,1%, τη γλοβουλόλη (7,4%) και το β -σεσκιφελανδρένιο (5,8%). Οι Couladis *et al.*, (2001) ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου τη βιριδιφλορόλη (32,4%) και ακολούθως την μανούλη (14,6%), το α -χουμουλένιο (10,7%), τη σπαθουλενόλη (4%), το εποξείδιο του χουμουλενίου II και το (*E*)-καρνοφυλλένιο. Τέλος, οι Velickovic *et al.*, (2014) ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου το οξείδιο του καρνοφυλλενίου σε ποσοστό 37,6% και ακολούθως το α -κοπαένιο (8,5%), το εποξείδιο του χουμουλενίου II (6,3%), το *D*-γερμακρένιο (3,9%) και το δ -καδιδένιο (2,4%). Γίνεται έτσι αντιληπτό από τα παραπάνω δεδομένα ότι στο συγκεκριμένο είδος ανιχνεύονται κοινές ουσίες με αυτές

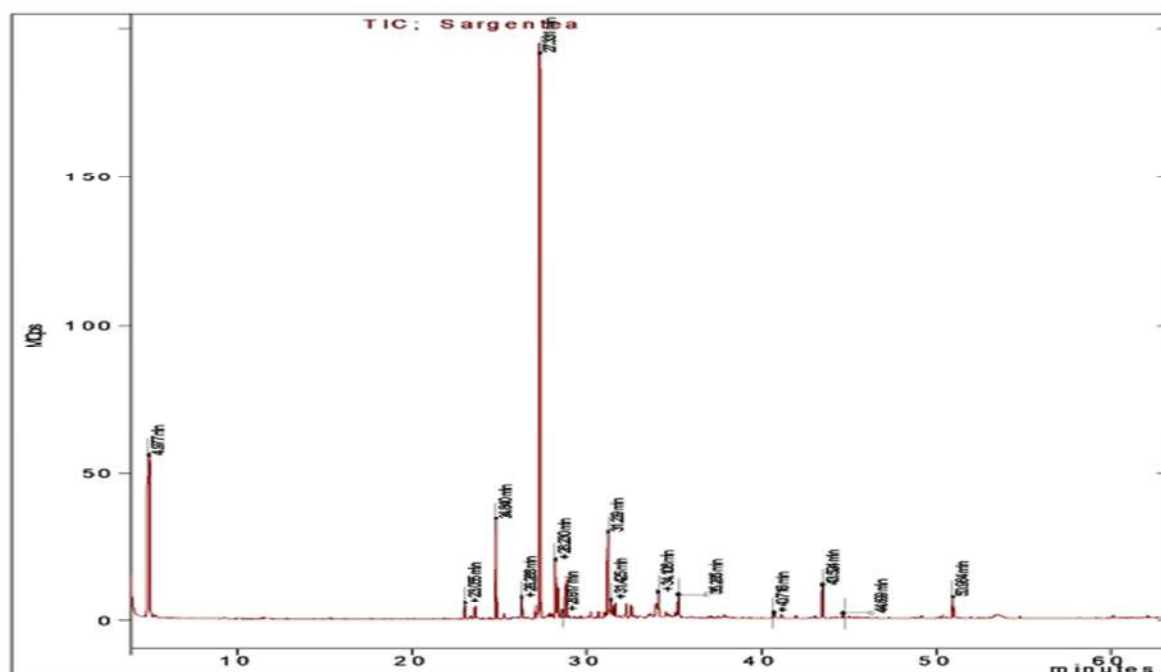
στην βιβλιογραφία, αλλά σε διαφορετικά ποσοστά με αποτέλεσμα την αλλαγή του κύριου συστατικού του αιθερίου ελαίου (Farhat *et al.*, 2013, Couladis *et al.*, 2001, Velickovic *et al.*, 2014).

Πίνακας 6. Σύσταση αντιπροσωπευτική για το αιθέριο έλαιο *Salvia argentea* με την τεχνική GC-MS.

Συστατικά	Χημικός Τύπος	M.B.	Retention time (min)	μg/mL αιθερίου ελαίου	μg/100g ξηρού φυτικού υλικού	% ποσοστό
1. α-κοπαένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	23.055	0,480	1,36	1,12
2. β-ελεμένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	23.636	0,362	1,03	0,84
3. (E)-καρνοφυλλένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	24.840	2,900	8,24	6,75
4. β-καπαένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	25.267	0,141	0,40	0,33
5. α-χουμουλένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	26.288	0,635	1,81	1,48
6. γ-μυρολένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	27.112	0,359	1,02	0,84
7. Γερμακρένιο D	C ₁₅ H ₂₄	204	27.331	16,070	45,69	37,41
8. Bicyclogermacrene	C ₁₅ H ₂₄	204	27.920	0,098	0,28	0,23
9. α-φαρνεσένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	28.355	0,829	2,36	1,93
10. γ-καδινένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	28.617	0,215	0,61	0,50
11. δ-καδινένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	28.850	1,074	3,05	2,50
12. N.I.	-	-	30.233	0,197	0,56	0,46
13. N.I.	-	-	30.703	0,186	0,53	0,43
14. Σπαθουλενόλη	C ₁₅ H ₂₄ O	220	31.038	0,169	0,48	0,39
15. Οξείδιο του καρνοφυλλενίου	C ₁₅ H ₂₄ O	220	31.229	2,629	7,47	6,12
16. N.I.	-	-	31.425	0,697	1,98	1,62
17. Salvial-4(14)-en-1-one	C ₁₅ H ₂₄ O	220	31.638	0,478	1,36	1,11
18. Εποξείδιο του χουμουλενίου II	C ₁₅ H ₂₄ O	220	32.282	0,317	0,90	0,74
19. N.I.	-	-	32.534	0,406	1,15	0,95
20. N.I.	-	-	33.688	0,080	0,23	0,19
21. α-καδινόλη	C ₁₅ H ₂₆ O	222	33.998	0,426	1,21	0,99
22. N.I.	-	-	34.108	0,867	2,47	2,02
23. N.I.	-	-	34.560	0,198	0,56	0,46

24.	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-ol	$C_{15}H_{24}O$	220	35.100	0,156	0,44	0,36
25.	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol	$C_{16}H_{32}O_2$	256	35.265	0,748	2,13	1,74
26.	6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone			40.716	0,170	0,48	0,40
27.	N.I.	-	-	41.149	0,143	0,41	0,33
28.	N.I.	-	-	43.524	1,048	2,98	2,44
29.	N.I.	-	-	44.699	0,143	0,41	0,33
30.	Αμπιενόλη	$C_{20}H_{34}O$	291	50.964	0,738	2,10	1,72

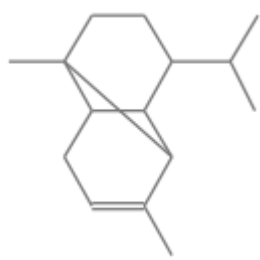
*N.I.: Not Identified



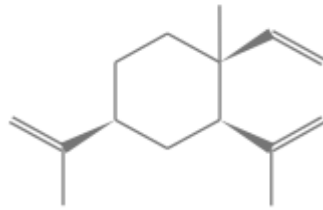
Σχήμα 2. Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου *Salvia argentea*

Παρακάτω παρουσιάζονται οι δομές (εικόνα 17) των κυριότερων συστατικών που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του *Salvia argentea*, βάσει των οποίων διαχωρίζονται σε ομάδες, με επικρατέστερα τα σεσκιτερπένια χαμηλού μοριακού βάρους.

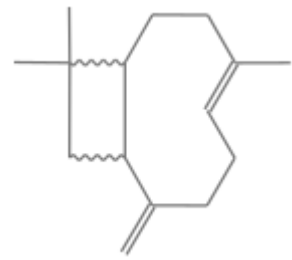
Σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες



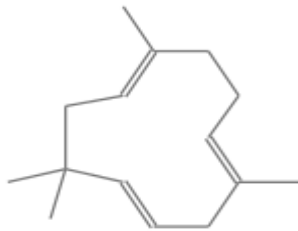
α-κοπαένιο



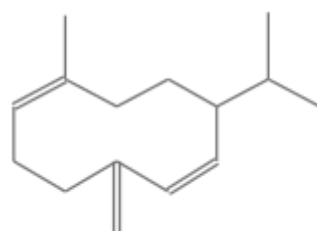
β-ελεμένιο



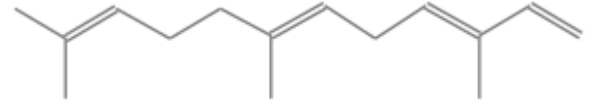
(E)-καροφυλλένιο



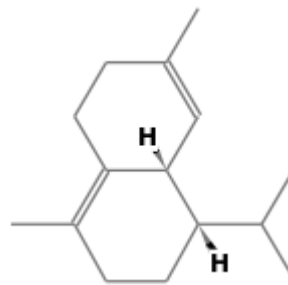
α-χουμουλένιο



Γερμακρένιο D

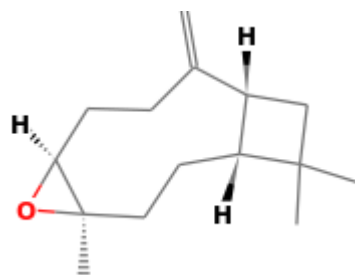


α-φαρνεσένιο

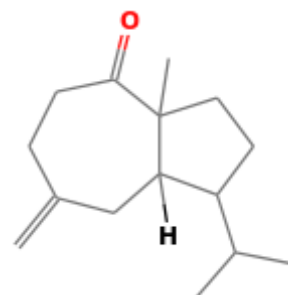


δ-καδινένιο

Οξυγονωμένα Σεσκιτερπένια



Οξείδιο του καροφυλλενίου



salvia-4(14)-en-1-one

Εικόνα 16. Δομές συστατικών αιθερίου ελαίου *Salvia argentea*

3.2.3 Αιθέριο έλαιο *Salvia ringens*

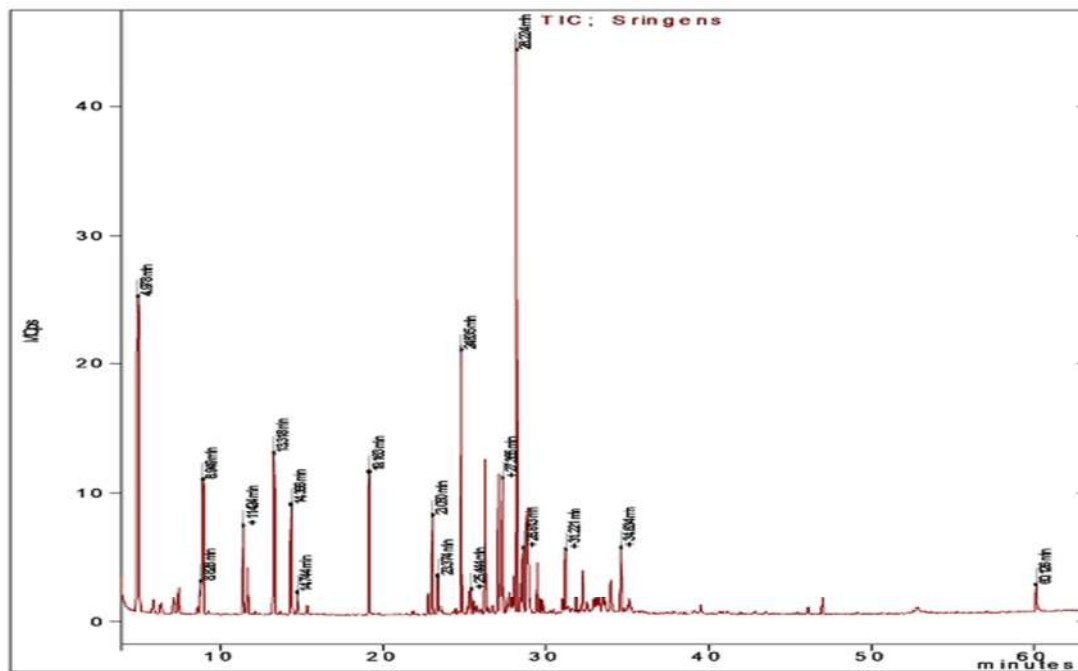
Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia ringens* ανιχνεύτηκαν 35 πτητικά συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 33. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 7 το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου είναι το *E*-καρνοφυλλένιο με ποσοστό 8,89% ακολουθεί η 1,8-κινεόλη με ποσοστό 6,17%. Έπειτα, η καμφορά με ποσοστό 5,72%, η α -κουρκουμίνη (5,28%), το α -χουμουλένιο (4,97%), το οξικό ισοβορνύλιο (4,54%), το γ -μυρολένιο (4,44%), η βορνεόλη (3,85), το δ -καδινένιο (3,58%), το α -κοπαένιο (3,24%) και η λιναλοόλη (3,07%). Έπειτα, ακολουθούν μικρότερα ποσοστά όπως το γ -καδινένιο (2,31%), το οξείδιο καρνοφυλλενίου (2,12%), η *cis*-θουγιόνη (1,73%), α -καδινόλη (1,42%), το εποξείδιο χουμουλενίου II (1,40%), το β -μπουρμπονένιο (1,28%) και το λιμονένιο (1,27%). Ωστόσο, στη βιβλιογραφία τα αποτελέσματα από την ανάλυση αιθερίου ελαίου *Salvia ringens* διαφέρουν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα, οι Alimpic *et al.* (2015), στην μελέτη τους ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου την ευκαλυπτόλη σε ποσοστό 31,99%, ακολούθως το καμφένιο (17,06%), την βορνεόλη (11,94%), το α -πινένιο (11,52%), την καμφορά (5,16%) και το οξικό βορνύλιο (4,52%). Ακόμα, οι Savikin *et al.*, (2011) ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου την ευκαλυπτόλη σε ποσοστό 33,8%, ακολούθως το α -πινένιο σε ποσοστό 10,6%, το μυρκένιο (9,8%), το οξικό βορνύλιο (4,7%) και η βορνεόλη (3,9%). Οι Georgiev *et al.*, (2012) ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου των φύλλων του *Salvia ringens* την καμφορά (17,2%) και ακολούθως τη βορνεόλη (7,2%), το β -πινένιο (6,0%), το D γερμακρένιο (3,5%), το λιμονένιο (3,5%) και το α -πινένιο (3,1%), ενώ στα άνθη το χημικό προφίλ του αιθερίου ελαίου παρουσίαζε αλλαγές κυρίως στα ποσοστά των συστατικών, αφού ως κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου ανίχνευσαν ξανά την καμφορά σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με αυτό των φύλλων (18,8%) και ακολούθως τη βορνεόλη (8,7%), το καμφένιο (5,0%), το β -πινένιο (4,0%), το α -καρνοφυλλένιο (3,4%) και την ευκαλυπτόλη (3,4%). Συνεπώς γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι το χημικό προφίλ του αιθερίου ελαίου ενός φυτικού είδους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το μέρος του φυτού που επιλέγεται κάθε φορά για ανάλυση, την περίοδο συλλογής του φυτικού είδους καθώς και τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς (Alimpic *et al.*, 2015, Savikin *et al.*, 2011, Georgiev *et al.*, 2012).

Πίνακας 7. Σύσταση αντιπροσωπευτική για το αιθέριο έλαιο *Salvia ringens* με την τεχνική GC-MS.

Συστατικά	Χημικός Τύπος	M.B.	Retention time (min)	μg/mL αιθερίου ελαίου	μg/100g ξηρού φυτικού υλικού	% ποσοστό	
1.	<i>α</i> -πινένιο	C ₁₀ H ₁₆	136	4.978	Tr	Tr	Tr
2.	Καμφένιο	C ₁₀ H ₁₆	136	5.94	Tr	Tr	Tr
3.	<i>β</i> -πινένιο	C ₁₀ H ₁₆	136	6.39	Tr	Tr	Tr
4.	Μυρκενίο	C ₁₀ H ₁₆	136	7.17	Tr	Tr	Tr
5.	<i>p</i> -κυμένιο	C ₁₀ H ₁₄	134	7.40	Tr	Tr	Tr
6.	λιμονένιο	C₁₀H₁₆	136	8.60	0,55	0,26	1,27
7.	1,8-κινεόλη	C₁₀H₁₈O	154	8.828	2,66	1,28	6,17
8.	λιναλοόλη	C₁₀H₁₈O	154	8.949	1,32	0,64	3,07
9.	<i>cis</i> -θουγιόνη	C ₁₀ H ₁₆ O	152	11.424	0,75	0,36	1,73
10.	Καμφορά	C₁₀H₁₆O	152	11.696	2,47	1,18	5,72
11.	Βορνεόλη	C₁₀H₁₈O	154	13.318	1,66	0,80	3,85
12.	τερπινέν-4-όλη	C ₁₀ H ₁₈ O	154	14.366	0,33	0,16	0,76
13.	<i>α</i> -τερπινεόλη	C ₁₀ H ₁₈ O	154	14.744	Tr	Tr	Tr
14.	Οξικό ισοβορνύλιο	C₁₂H₂₀O₂	196	15,35	1,96	0,94	4,54
15.	<i>α</i> -Ylangene	C ₁₅ H ₂₄	204	19.163	Tr	Tr	Tr
16.	<i>α</i> -κοπαένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	22,78	1,40	0,67	3,24
17.	<i>β</i> -μπουρμπονένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	23.050	0,55	0,26	1,28
18.	<i>(E)</i> -καρνοφυλλένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	23.374	3,83	1,84	8,89
19.	<i>β</i> -κοπαένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	24.835	0,33	0,16	0,77
20.	<i>α</i> -trans-μπεργαμοτένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	25.260	0,37	0,18	0,87
21.	αρωμαδερινή	C ₁₅ H ₂₄	204	25.444	Tr	Tr	Tr
22.	<i>α</i> -χουμουλένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	25,61	2,14	1,03	4,97
23.	<i>γ</i> -μυρολένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	26.283	1,91	0,92	4,44
24.	<i>α</i> -κουρκουμίνη	C ₁₅ H ₂₂	202	27.104	2,28	1,09	5,28
25.	<i>α</i> -μυρολένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	27.355	0,45	0,22	1,04
26.	<i>β</i> -μπισαμπολένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	28.063	0,49	0,24	1,15
27.	<i>γ</i> -καδινένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	28.458	1,00	0,48	2,31
28.	<i>δ</i> -καδινένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	28.613	1,54	0,74	3,58
29.	<i>cis</i> -καλαμενένιο	C ₁₅ H ₂₂	202	28.850	0,46	0,22	1,07
30.	N.I	-	-	28.921	0,84	0,40	1,95
31.	Οξείδιο του καρνοφυλλενίου	C₁₅H₂₄O	220	29.474	0,91	0,44	2,12
32.	Εποξείδιο του χουμουλενίου II	C₁₅H₂₄O	220	31.221	0,60	0,29	1,40

33.	α -καδινόλη	$C_{15}H_{26}O$	222	32.275	0,61	0,29	1,42
34.	N.I.	-	-	34.005	1,21	0,58	2,81
35.	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	$C_{16}H_{32}O_2$	256	34.634	0,48	0,23	1,12

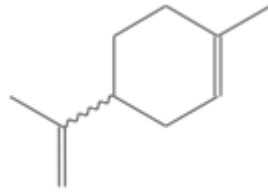
*N.I.: Not Identified



Σχήμα 3. Χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου *Salvia ringens*

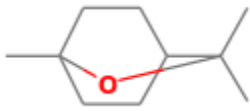
Παρακάτω παρουσιάζονται οι δομές των συστατικών (εικόνα 18) που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του *Salvia ringens*, βάσει των οποίων διαχωρίζονται σε ομάδες, με επικρατέστερα τερπένια χαμηλού μοριακού βάρους. Από αυτές τις ενώσεις, η πιο χαρακτηριστική για το αιθέριο έλαιο *Salvia ringens* είναι το (E)-καρυοφυλλένιο.

Μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες

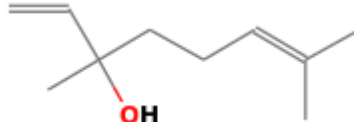


Λιμονένιο

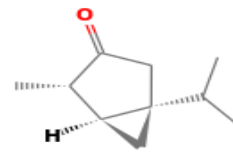
Οξυγονωμένα μονοτερπένια



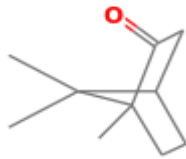
1,8-κινεόλη
(ευκαλυπτόλη)



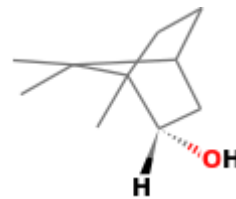
λιναλοόλη



cis-θουγιόνη

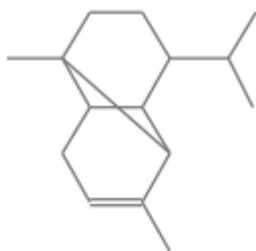


Καμφορά

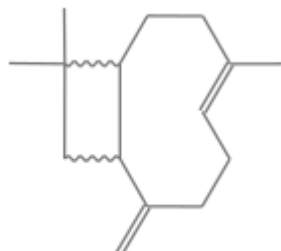


Βορνεόλη

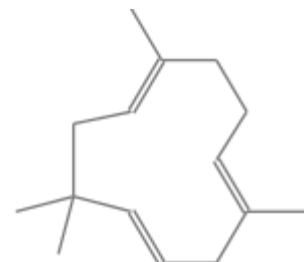
Σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες



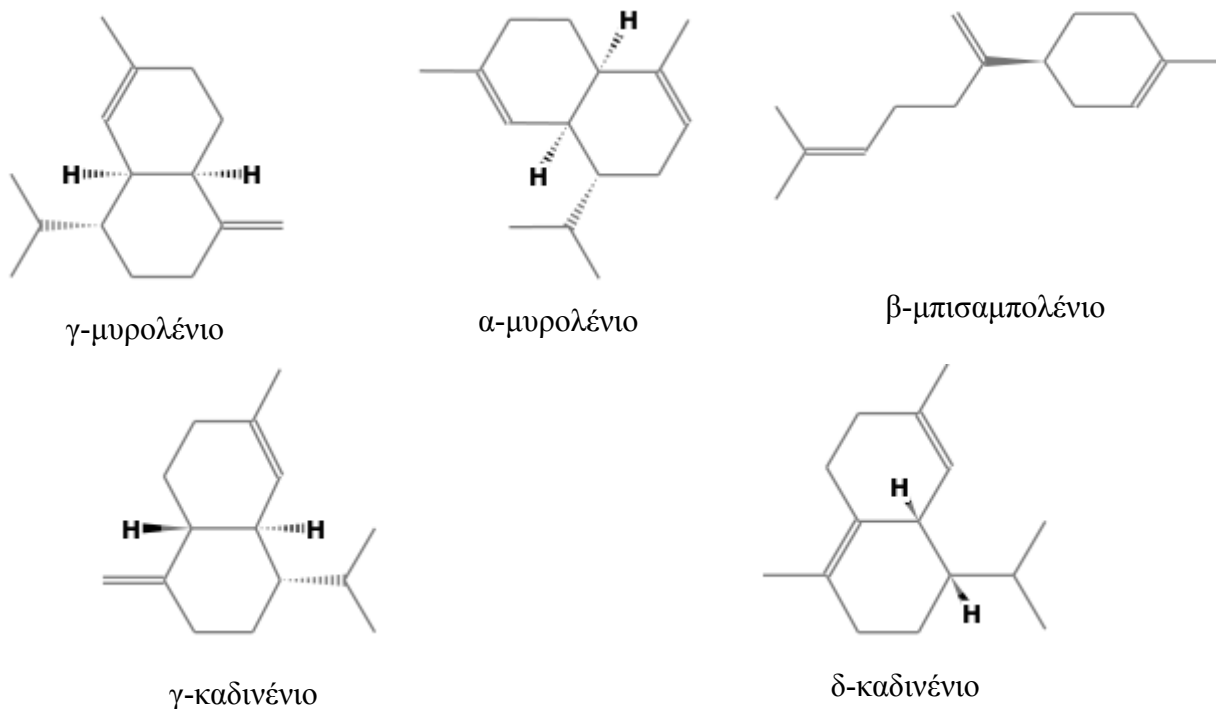
α-κοπαένιο



(E)-καρυοφυλλένιο



α-χουμουλένιο



Εικόνα 17. Δομές συστατικών αιθερίου ελαίου *Salvia ringens*

3.2.4 Αιθέριο έλαιο *Salvia officinalis*

Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia officinalis* ανιχνεύτηκαν 28 πτητικά συστατικά και αναγνωρίστηκαν τα 26. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 8 το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου είναι η καμφορά με ποσοστό 24,32% ακολουθεί η 1,8-κινεόλη (ευκαλυπτόλη) με ποσοστό 15,65%. Έπειτα, το καμφένιο με ποσοστό 4,94% και η *cis*-θουγιόνη (4,53%). Σημαντικά ποσοστά παρουσιάζουν επίσης η βορνεόλη (3,82%), το *α*-πινένιο (3,81%) και η *trans*-θουγιόνη (2,89%). Μικρότερα ποσοστά παρουσιάζουν επίσης το οξικό ισοβορνύλιο (1,93%), η βιριδιφλορόλη (1,36%), η καρβακρόλη (1,18%) και η θυμόλη (1,01%). Ωστόσο, στη βιβλιογραφία τα αποτελέσματα από την ανάλυση αιθερίου ελαίου *Salvia officinalis* διαφέρουν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, οι Santos-Gomes *et al.* (2001), στην μελέτη ανέλυσαν το αιθέριο έλαιο του *Salvia officinalis* ξεχωριστά για τα φύλλα, τους μίσχους και τα άνθη του φυτού. Στην περίπτωση του αιθερίου ελαίου μετά την υδρο-απόσταξη των φύλλων του φυτού ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου την *α*-θουγιόνη σε ποσοστό 25,50%, ακολούθως την καμφορά (19,51%), την βιριδιφλορόλη (6,29%), το καμφένιο (4,57%), την μανούλη (5,85%), το *α*-πινένιο (4,22%) και τη *β*-θουγιόνη (3,89%).

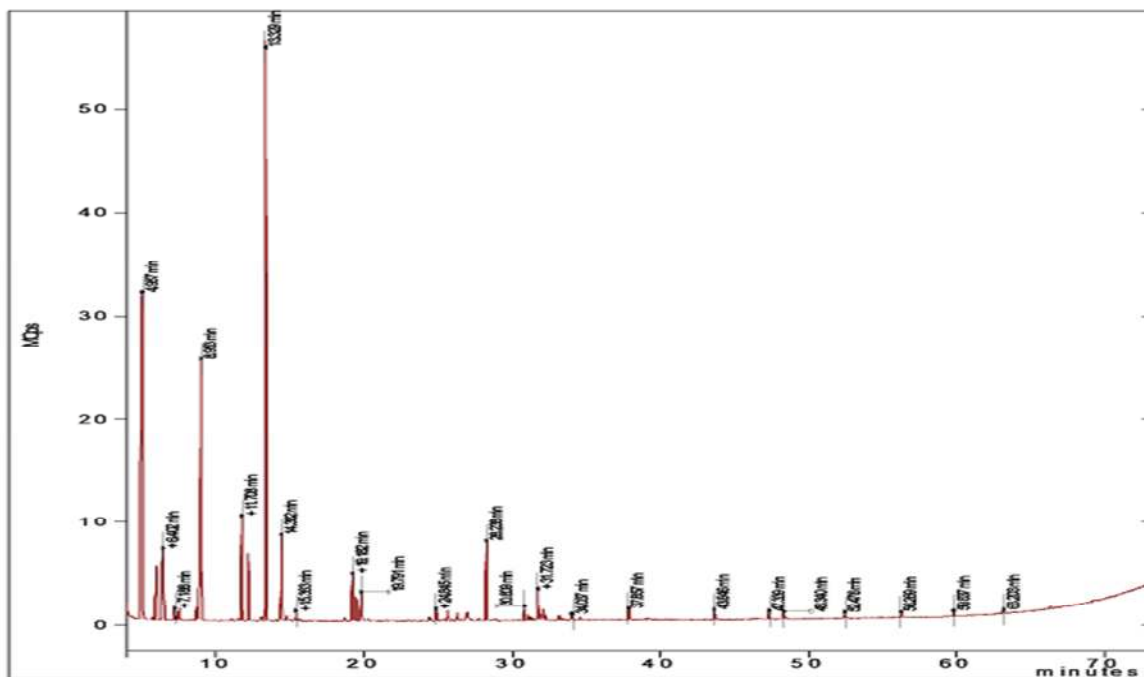
Στην περίπτωση των μίσχων το χημικό προφίλ είχε ελάχιστες διαφορές κυρίως ως προς το ποσοστό του κάθε συστατικού στο δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, κύριο συστατικό ήταν ξανά η α-θουγιόνη σε ποσοστό 55,08%, έπειτα η καμφορά (5,63%), το α-χουμουλένιο (5,23%), η μανούλη (4,69%) και η 1,8-κινεόλη (ευκαλυπτόλη) (1,98%). Ακόμα, στην περίπτωση των ανθών ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου την α-θουγιόνη σε ποσοστό 17,74%, ακολούθως την 1,8-κινεόλη (ευκαλυπτόλη) σε ποσοστό 17,32%, το β-πινένιο (17,01%), την βορνεόλη (8,76%), το β-καρνοφυλλένιο (4,78%) και την καμφορά (3,45%). Καθώς λοιπόν τα ποσοστά κάθε μιας από αυτές τις ενώσεις ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό στα άνθη, τα φύλλα και τους μίσχους, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η σύνθεση των αιθέριων ελαίων από το εναέριο μέρος των φυτών *S. officinalis*, που λαμβάνονται ως σύνολο, ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με την αναλογία φύλλων/ στελεχών/λουλουδιών της βιομάζας που χρησιμοποιείται ως πηγή αιθέριου ελαίου. Μια τέτοια μεταβλητότητα θα εξηγούσε τη δυσκολία στην απόδοση ενός δεδομένου χημικού τύπου. Επιπλέον δεδομένα άλλων ερευνών δείχνουν ότι η σύνθεση του αιθέριου ελαίου φασκόμηλου ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τη γονιμοποίηση του εδάφους με ανόργανα συστατικά, την ένταση του φωτός, την ηλικία των αναπαραγωγικών οργάνων των φυτών, τις κλιματολογικές συνθήκες, την εποχή και τον τόπο καλλιέργειας (Bettaieb *et al.*, 2009). Λόγω αυτής της παραλλαγής, η σύνθεση αιθέριου ελαίου φασκόμηλου μερικές φορές δεν ταιριάζει με το προφίλ που ορίζεται από το πρότυπο ISO 9909:1997, το οποίο, σύμφωνα με τον Bruneton (1999), είναι cis-θουγιόνη (18–43%), trans-θουγιόνη (3–8,5%), καμφορά (4,5–24,5%), 1,8-κινεόλη (5,5–13%), α-χουλουλένιο (0–12%), α-πινένιο (1–6,5%), καμφένιο (1,5–7%), λιμονένιο (0,5–3%), λιναλοόλη και οξικό βορνύλιο (2,5% κατ'ανώτατο όριο). Ακόμη, οι Tosun *et al.*, (2014) ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου των φύλλων του *Salvia officinalis* την καμφορά (43,8%) και ακολούθως την α-θουγιόνη (15,9%), το καμφένιο (8,5%) και την 1,8-κινεόλη (ευκαλυπτόλη) σε ποσοστό 8,4% (Santos-Gomes *et al.*, 2001, Bruneton 1999, Tosun *et al.*, 2014).

Πίνακας 8. Σύσταση αντιπροσωπευτική για το αιθέριο έλαιο Salvia officinalis με την τεχνική GC-MS.

Συστατικά	Χημικός Τύπος	M.B.	Retention time (min)	µg/mL αιθέριου	µg/100g ξηρού	% ποσοστό
-----------	---------------	------	----------------------	----------------	---------------	-----------

					ελαίου	φυτικού υλικού	
1.	<i>α</i> -πινένιο	C ₁₀ H ₁₆	136	5.955	1,40	1,86	3,81
2.	Καμφένιο	C ₁₀ H ₁₆	136	6.402	1,81	2,41	4,94
3.	<i>β</i> -πινένιο	C ₁₀ H ₁₆	136	7.188	0,30	0,40	0,82
4.	Μυρκένιο	C ₁₀ H ₁₆	136	7.480	0,29	0,38	0,78
5.	<i>p</i> -κυμένιο	C ₁₀ H ₁₄	134	8.661	0,26	0,34	0,70
6.	1,8-κινεόλη	C ₁₀ H ₁₈ O	154	8.953	5,73	7,65	15,65
7.	<i>cis</i> -θουγιόνη	C ₁₀ H ₁₆ O	152	11.708	1,66	2,21	4,53
8.	<i>trans</i> -θουγιόνη	C ₁₀ H ₁₆ O	152	12.158	1,06	1,41	2,89
9.	Καμφορά	C ₁₀ H ₁₆ O	152	13.329	8,91	11,88	24,32
10.	Βορνεόλη	C ₁₀ H ₁₈ O	154	14.382	1,40	1,87	3,82
11.	τερπινέν-4-όλη	C ₁₀ H ₁₈ O	154	14.761	0,07	0,10	0,20
12.	<i>α</i> -τερπινεόλη	C ₁₀ H ₁₈ O	154	15.363	0,15	0,19	0,40
13.	Οξικό ισοβορνόλιο	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	19.182	0,71	0,95	1,93
14.	Θυμόλη	C ₁₀ H ₁₄ O	150	19.452	0,37	0,49	1,01
15.	Καρβακρόλη	C ₁₀ H ₁₄ O	150	19.791	0,43	0,58	1,18
16.	(<i>E</i>)- καρνοφυλλένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	24.845	0,19	0,25	0,51
17.	Αρωμαδενρίνη	C ₁₅ H ₂₄	204	25.615	0,17	0,23	0,46
18.	<i>α</i> -χουμουλένιο	C ₁₅ H ₂₄	204	26.292	0,13	0,17	0,35
19.	Παλουστρόλη	C ₁₅ H ₂₆ O	222	30.809	0,25	0,33	0,67
20.	Σπαθουλενόλη	C ₁₅ H ₂₄ O	220	31.048	0,10	0,13	0,27
21.	Οξειδίο του καρνοφυλλενίου	C ₁₅ H ₂₄ O	220	31.242	0,06	0,08	0,17
22.	βιριδιφλορόλη	C ₁₅ H ₂₆ O	222	31.723	0,50	0,66	1,36
23.	N.I.	-	-	31.913	0,12	0,16	0,33
24.	Λιδόλη	C ₁₅ H ₂₆ O	222	32.116	0,18	0,24	0,50
25.	Εποξείδιο του χουμουλενίου II	C ₁₅ H ₂₄ O	220	32.293	0,07	0,09	0,18
26.	N.I.	-	-	33.167	0,07	0,10	0,20
27.	Εποξείδιο της αρωμαδενδρίνης	C ₁₅ H ₂₄ O	220	34.037	0,11	0,14	0,29
28.	Μανούλη	C ₂₀ H ₃₄ O	256	47.339	0,16	0,21	0,42

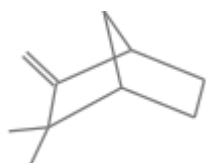
*N.I.: Not Identified



Σχήμα 4. Χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου *Salvia officinalis*.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι δομές των συστατικών (εικόνα 19) που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του *Salvia officinalis*, βάσει των οποίων διαχωρίζονται σε ομάδες, με επικρατέστερα τερπένια χαμηλού μοριακού βάρους. Από αυτές τις ενώσεις, η πιο χαρακτηριστική για το αιθέριο έλαιο *Salvia officinalis* είναι η καμφορά.

Μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες



Καμφένιο

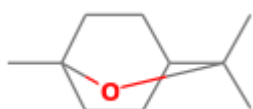


α-πινένιο

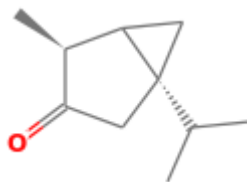
Οξυγονωμένα μονοτερπένια



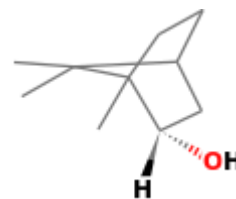
Καμφορά



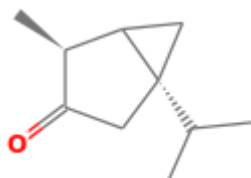
1,8-κινεόλη
(ευκαλυπτόλη)



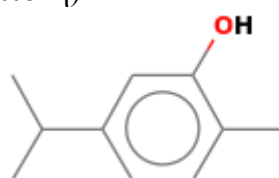
cis-θουγιόνη



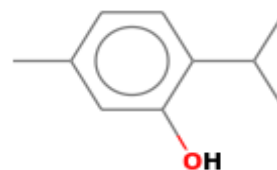
Βορνεόλη



Trans-θουγιόνη

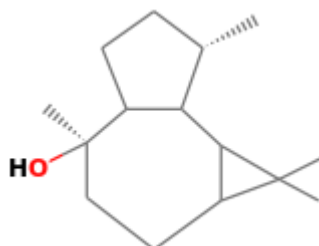


καρβακρόλη



Θυμόλη

Οξυγονωμένα σесκιτερπένια



Βιριδιφλορόλη

Εικόνα 18. Δομές συστατικών αιθερίου ελαίου *Salvia officinalis*

3.3 Παραλαβή δευτερογενών μεταβολιτών *Salvia spp*

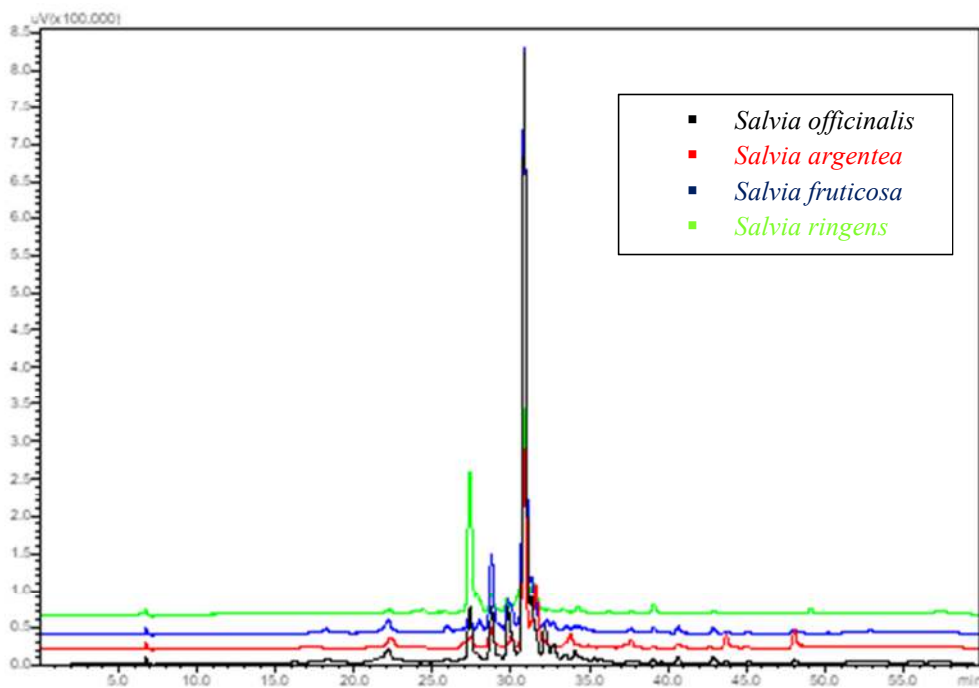
Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, προκειμένου να γίνει η παραλαβή των δευτερογενών μεταβολιτών των ειδών του γένους *Salvia*, χρησιμοποιήθηκαν 2g λειοτριβιμένου φυτικού υλικού, τα οποία εκχυλίστηκαν με διάλυμα μεθανόλης/νερού σε αναλογία 70:30 (v/v) (MeOH/H₂O, 70:30 (v/v)), όπως έχει ήδη περιγραφεί. Για κάθε φυτικό υλικό πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Τα δείγματα διηθήθηκαν με πολικά φίλτρα πριν την ανάλυση. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι αποδόσεις των τριών επαναλήψεων των δειγμάτων.

Πίνακας 9. Αποδόσεις σε mg των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων δειγμάτων *Salvia spp.*

Φυτικό υλικό	1 ^η επανάληψη (mg)	2 ^η επανάληψη (mg)	3 ^η επανάληψη (mg)	Μέσος όρος
<i>Salvia fruticosa</i>	223,9	219,2	231,8	225 ± 6,37
<i>Salvia argentea</i>	328,8	332,7	345,2	336 ± 8,57
<i>Salvia ringens</i>	317,5	329,4	349,9	332 ± 16,39
<i>Salvia officinalis</i>	336,5	351,2	341,7	343 ± 7,45

3.4 Ανάλυση εκχυλισμάτων του γένους *Salvia* με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών και φασματομετρία ορατού-υπεριώδους (LC-DAD-MS)

Τα τέσσερα δείγματα *Salvia* αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία σε ανιχνευτή φασματομετρίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (DAD) και ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (MS). Τα δείγματα αραιώθηκαν έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι 1 mg/mL. Οι συνθήκες του ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας ρυθμίστηκαν στη λειτουργία αρνητικού ιονισμού ώστε να σχηματιστεί αρνητικό ιόν [M-H]⁻. Το εύρος για το κλάσμα m/z ορίστηκε μεταξύ 50-1000 για τον αρνητικό ιονισμό. Στα 330 nm οι κορυφές όλων των δειγμάτων ήταν πιο ευδιάκριτες, γι' αυτό και η εκτίμηση του χημικού προφίλ των εκχυλισμάτων έγινε σε αυτό το μήκος κύματος. Ο ποιοτικός προσδιορισμός εκτιμήθηκε βάσει του χρόνου έκλουσης (Retention time, RT), των φασμάτων απορρόφησης των πρότυπων ουσιών, της βιβλιογραφίας, καθώς και των μοριακών ιόντων (m/z). Παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα UV-Vis των τεσσάρων δειγμάτων σε μήκος κύματος 330 nm. Τα χημικά τους προφίλ, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα 20 έχουν ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους.



Εικόνα 20. Χρωματογραφήματα UV-Vis στα 330 nm των τεσσάρων ειδών *Salvia* μετά την ανάλυση LC-DAD-MS

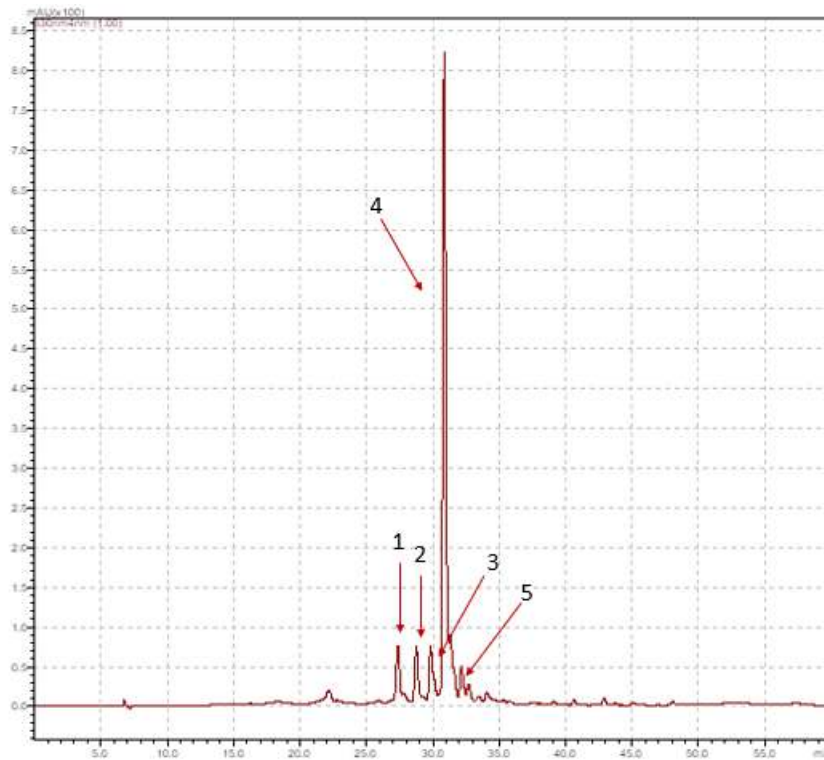
3.4.1 Χημικό προφίλ του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *Salvia officinalis*

Στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia officinalis* ανιχνεύθηκαν 71 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 19. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 10 το κύριο συστατικό του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος είναι το ροσμαρινικό οξύ, ακολουθεί το πικουμαρικό οξύ. Έπειτα, ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, το συστατικό 3-β δ-γλυκοζίτης της Κερκετίνης, το συστατικό 3-O-γλυκοζίτης της ισοραμνετίνης και η κερκιτρίνη. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία τα αποτελέσματα από την ανάλυση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του *Salvia officinalis* ποικίλουν αφού κάποιες μελέτες συμφωνούν ενώ άλλες διαφέρουν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, οι Li *et al.* (2015), στην μελέτη ανέλυσαν το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia officinalis* ξεχωριστά για τα φύλλα, τα εναέρια μέρη και τα άνθη του φυτού. Στην περίπτωση του υδρο-αλκοολικού εκχυλίσματος του εναέριου μέρους του φυτού ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του εκχυλίσματος το φερουλικό οξύ, ακολούθως το καφεϊκό οξύ και έπειτα το ροσμαρινικό οξύ. Τα άνθη από την άλλη μεριά ήταν πλούσια σε ροσμαρινικό οξύ σε ποσοστό 64,1%, ενώ τα φύλλα ήταν επίσης καλή πηγή ροσμαρινικού οξέος. Ακόμα, οι Kenjeric *et al.* (2008), στην μελέτη τους δεν ανίχνευσαν ροσμαρινικό οξύ στα εκχυλίσματα του φυτικού υλικού, αλλά κερκετίνη,

λουτεολίνη, καμπερόλη, απιγενίνη, χρυσίνη, καφεϊκό και π-κουμαρικό οξύ. Τέλος, οι Kamatou *et al.* (2010), στην μελέτη τους ανίχνευσαν σαν κύριο συστατικό του εκχυλίσματος το ροσμαρινικό οξύ και έπειτα το συστατικό betulafolientnol oxide (Li *et al.*, 2015, Kenjeric *et al.*, 2008, Kenjeric *et al.*, 2008, Kamatou *et al.*, 2010). Παρακάτω φαίνονται επίσης το χρωματογράφημα UV-Vis στα 330 nm του *Salvia officinalis* (εικόνα 21) καθώς και οι δομές των κύριων ουσιών (εικόνα 22).

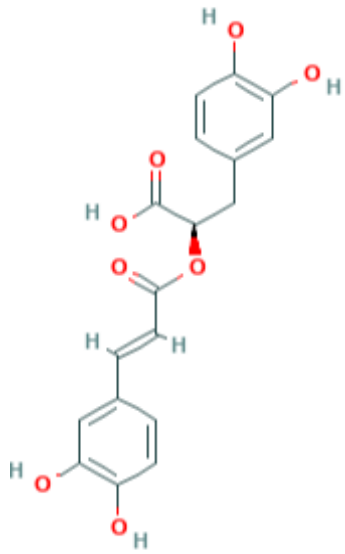
Πίνακας 10. Σύσταση αντιπροσωπευτική για το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του Salvia officinalis με την τεχνική LC-DAD-MS.

	Συστατικά	Χημικός τύπος	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Εμβαδόν %
1	Χλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	18.423	353	0.2011
2	Καφεϊκό οξύ	C ₉ H ₈ O ₄	21.375	179	0.1597
3	Συριγγικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₅	22.776	198	0.1169
4	Επιγαλλοκατεχίνη	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	23.007	441	0.1042
5	Κιχορικό οξύ	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	23.682	473	0.1256
6	π-κουμαρικό οξύ	C₉H₈O₃	27.385	163	6.0966
7	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	C₂₁H₂₀O₁₁	28.764	447	5.5695
8	Ρουτίνη	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	29.240	609	0.2821
9	3-β δ-γλυκοζίτης της Κερκετίνης	C₁₆H₁₂O₆	29.816	299	4.7907
10	Ροσμαρινικό οξύ	C₁₈H₁₆O₈	30.845	359	58.8105
11	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	C₂₁H₂₀O₁₀	31.303	431	5.8825
12	Κερκιτρίνη	C₂₁H₂₀O₁₁	31.562	447	1.4580
13	3-O-γλυκοζίτης της ισοχαρμεντίνης	C₂₂H₂₂O₁₂	32.704	477	1.4857
14	Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	37.631	301	0.0658
15	Ναριγκενίνη	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	38.282	301	0.0026
16	Εσπεριτίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	39.577	271	0.0398
17	Απιγενίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	40.010	269	0.0273
18	Ακασετίνη	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	45.749	283	0.0026
19	Γενκουανίνη	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	48.575	299	0.0179

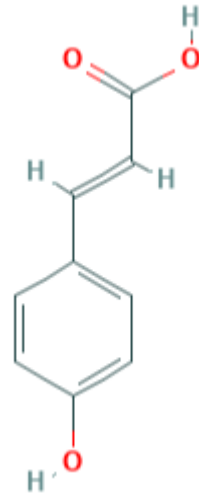


Εικόνα 21. Χρωματογράφημα UV-Vis στα 330 nm του *Salvia officinalis* μετά την ανάλυση του LC-DAD-MS. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) π-κουμαρικό οξύ (2) 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (3) 3-θ δ-γλυκοζίτης της Κερκετίνης (4) ροσμαρινικό οξύ (5) 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης.

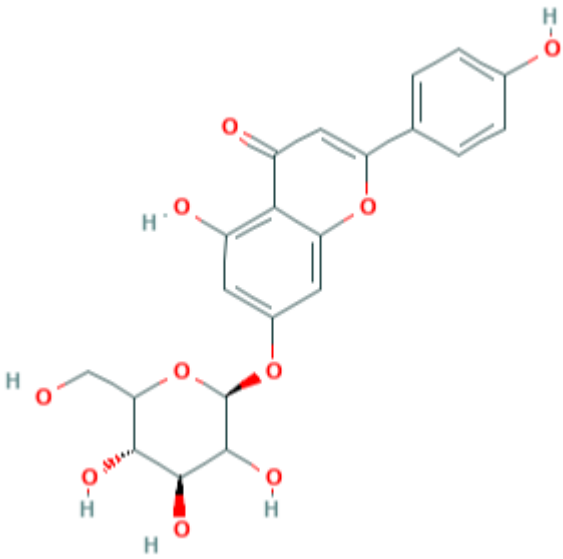
Δομές χημικών ουσιών



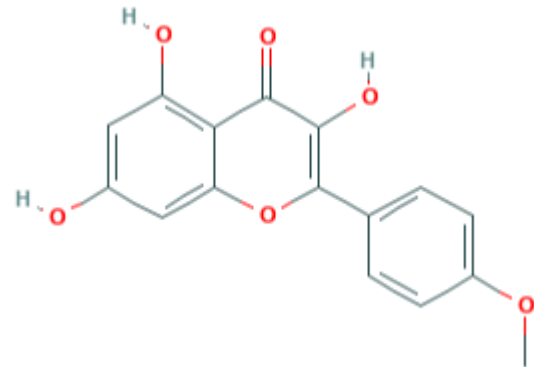
Ροσμαρινικό οξύ



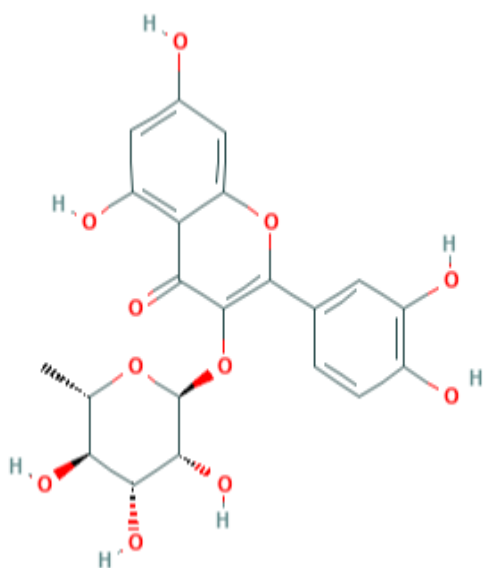
π-κουμαρικό οξύ



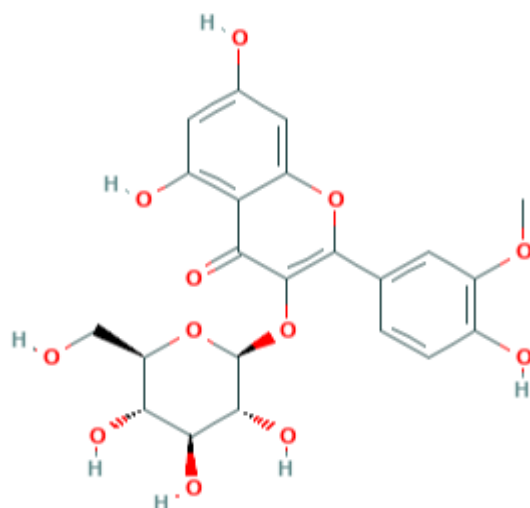
7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης



Kaempferide



Κερκιτρίνη



3-O-γλυκοζίτης της ισοραμεντίνης

Εικόνα 22. Δομές συστατικών υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *Salvia officinalis*

3.4.2 Χημικό προφίλ του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *Salvia argentea*

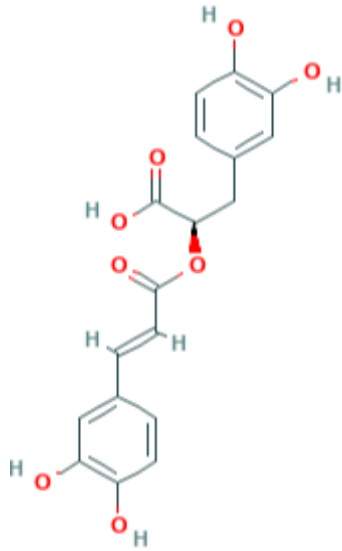
Στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia argentea* ανιχνεύτηκαν 61 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 6. Κύριο συστατικό του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος είναι και σε αυτήν την περίπτωση το ροσμαρινικό οξύ και ακολουθεί η κερκιτρίνη (πίνακας 11). Έπειτα, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, το π-κουμαρικό οξύ και η κερκετίνη. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία τα αποτελέσματα από την ανάλυση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του *Salvia argentea* ποικίλουν αφού κάποιες μελέτες συμφωνούν ενώ άλλες διαφέρουν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, οι Farhat *et al.* (2013), στην μελέτη τους ανέλυσαν το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia argentea* το οποίο είχε συλλεχθεί από δύο ειδών εδάφη. Στην πρώτη περίπτωση το έδαφος ήταν ημι-άνυδρο και στην δεύτερη άνυδρο σε μεγαλύτερο ποσοστό. Στην πρώτη περίπτωση ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του εκχυλίσματος το ροσμαρινικό οξύ και ακολούθως το καρνοσικό μεθύλιο και τη ναριγενίνη και έπειτα το φερουλικό οξύ, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, τον 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης, την ναριγενίνη και τον 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης. Στην δεύτερη περίπτωση το χημικό προφίλ δεν αλλάζει πολύ αφού κύριο συστατικό παραμένει το ροσμαρινικό οξύ, ωστόσο διαφέρουν τα mg/g της κάθε ουσίας. Ακόμα, οι Janicsak *et al.* (2010), στην

μελέτη τους ανίχνευσαν το ροσμαρινικό οξύ ως κύριο συστατικό στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα του φυτικού υλικού και ακολούθως καφεϊκό οξύ. Τέλος, οι Nikolova *et al.* (2006) στην μελέτη τους ανίχνευσαν σαν κύριο συστατικό του εκχυλίσματος τη λουτεολίνη και ακολούθως την απιγενίνη (Farhat *et al.*,2013, Janicsak *et al.*,2010, Nikolova *et al.*,2006). Παρακάτω φαίνονται επίσης το χρωματογράφημα UV-Vis στα 330 nm του *Salvia argentea* (εικόνα 23) καθώς και οι δομές των κύριων ουσιών (εικόνα 22).

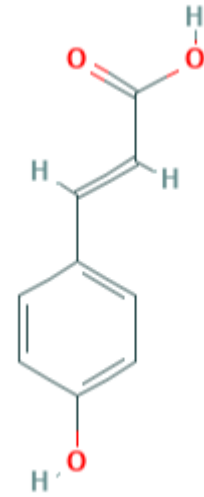
Πίνακας 11. Σύσταση αντιπροσωπευτική για το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του Salvia argentea με την τεχνική LC-DAD-MS.

	Συστατικά	Χημικός τύπος	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Εμβαδόν %
1	Καφεϊκό οξύ	C ₉ H ₈ O ₄	21.521	179	0.8432
2	π-κουμαρικό οξύ	C₉H₈O₃	27.394	163	3.4126
3	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	C₂₁H₂₀O₁₁	28.692	447	5.2478
4	Ροσμαρινικό οξύ	C₁₈H₁₆O₈	30.826	359	40.8226
5	Κερκιτρίνη	C₂₁H₂₀O₁₁	31.598	447	19.4428
6	Κερκετίνη	C₁₅H₁₀O₇	37.665	301	1.9072

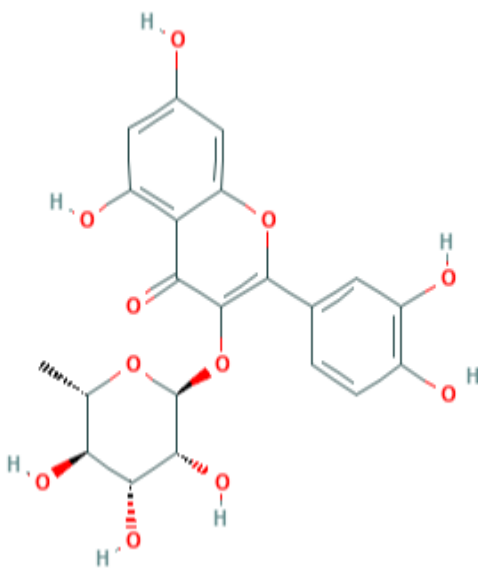
Δομές γημικών ουσιών



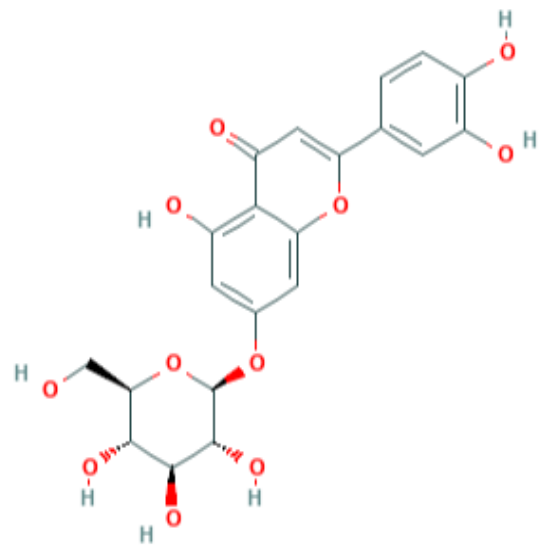
Ροσμαρινικό οξύ



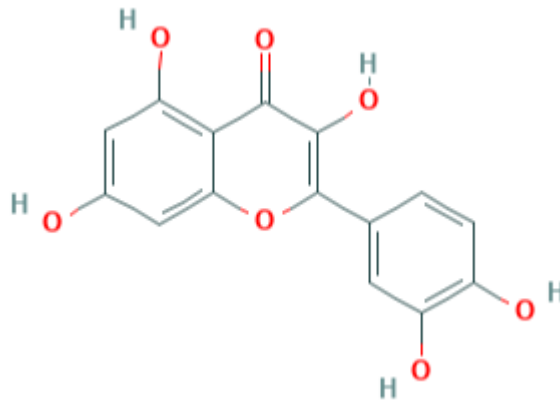
π-κουμαρικό οξύ



Κερκιτρίνη

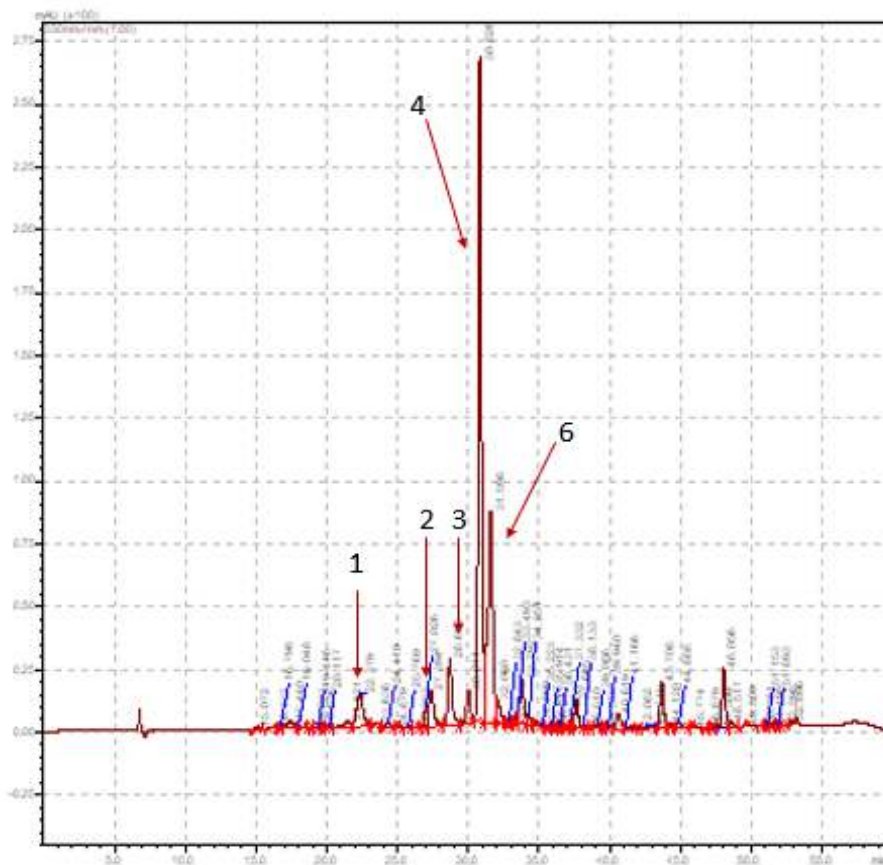


7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης



Κερκετίνη

Εικόνα 22. Δομές συστατικών υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *Salvia argentea*



Εικόνα 23. Χρωματογράφημα UV-Vis στα 330 nm του *Salvia argentea* μετά την ανάλυση του LC-DAD-MS. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) καφεϊκό οξύ (2) π-κουμαρικό οξύ (3) 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (4) ροσμαρινικό οξύ (5) Κερκετρίνη

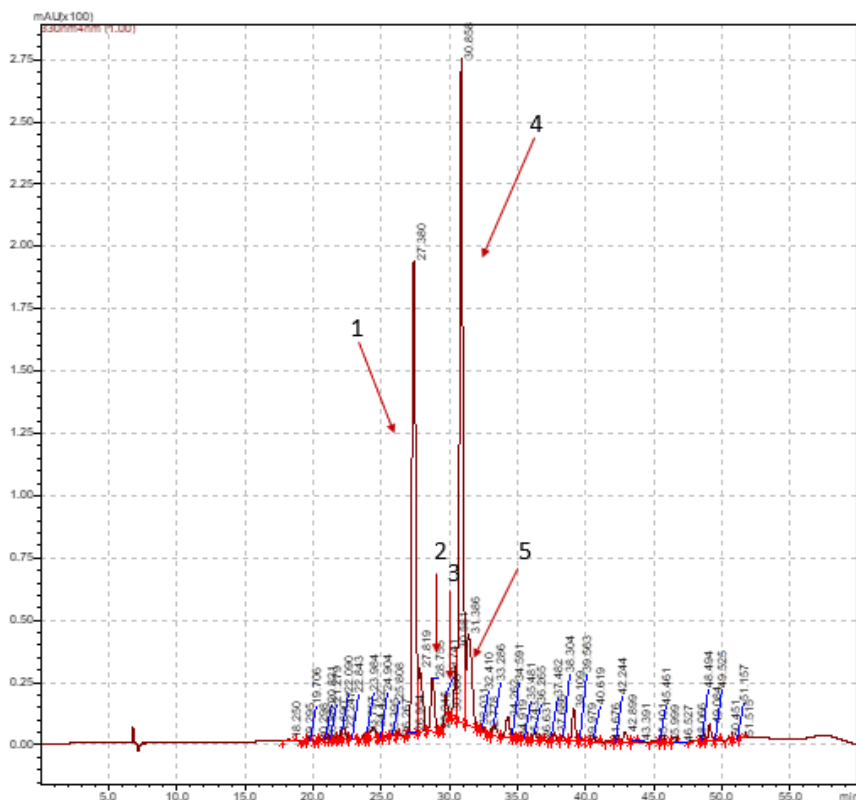
3.4.3 Χημικό προφίλ του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *Salvia ringens*

Στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia ringens* ανιχνεύτηκαν 61 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 5. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 12 το κύριο συστατικό του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος είναι το ροσμαρινικό οξύ, ακολουθεί το π-κουμαρικό οξύ. Έπειτα, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και η 3-β δ-γλυκοζίτης της Κερκετίνης. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία τα αποτελέσματα από την ανάλυση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του *Salvia ringens* ποικίλουν αφού κάποιες μελέτες συμφωνούν ενώ άλλες διαφέρουν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, οι Arimpric *et al.* (2015), στην μελέτη τους ανέλυσαν εκχυλίσματα του *Salvia ringens* των οποίων η παραλαβή είχε γίνει με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας. Πιο συγκεκριμένα, οι διαλύτες που χρησιμοποίησαν για την ανάλυση ήταν το διχλωρομεθάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, η μεθανόλη, η αιθανόλη και τέλος το νερό. Στην περίπτωση του διχλωρομεθανίου ανίχνευσαν ως κύριο και μοναδικό συστατικό του εκχυλίσματος την 3-Ο-γαλακτοσίδη της κερκετίνης. Κύριο συστατικό των εκχυλισμάτων με τους υπόλοιπους διαλύτες ήταν η 3-Ο-γλυκοζίτης(6''-Ο-ακετυλ)-7-Ο-ραμνοσίδη, καμπερόλη και ακολούθως η ρουτίνη, η λουτεολίνη, η απιγενίνη, η κερκετίνη, η κουμαρίνη και το καφεϊκό οξύ. Πιο αποτελεσματικός διαλύτης φάνηκε να είναι η μεθανόλη, διότι κατάφερε να εκχυλίσει τις περισσότερες ουσίες, μία εκ των οποίων το ροσμαρινικό οξύ. Ακόμα, οι Coisin *et al.* (2012), στην μελέτη τους σε δείγματα από την Ρουμανία ανίχνευσαν σαν κύριο συστατικό του εκχυλίσματος το ροσμαρινικό οξύ και ακολούθως την απιγενόλη, τον 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης, την λουτεολίνη, το καφεϊκό οξύ και το π-κουμαρικό οξύ. Τέλος, οι Nikolova *et al.* (2017), στην μελέτη τους ανίχνευσαν σαν κύριο συστατικό του εκχυλίσματος τη λουτεολίνη και έπειτα την απιγενίνη και το συστατικό γενγουανίνη (Arimpric *et al.*, 2015, Coisin *et al.*, 2012, Nikolova *et al.*, 2017) .

Πίνακας 12. Σύσταση αντιπροσωπευτική για το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του Salvia ringens με την τεχνική LC-DAD-MS.

	Συστατικά	Χημικός τύπος	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Εμβαδόν %
1	π-κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	27.380	163	29.7526
2	7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	28.755	447	3.5692

3	3-β δ-γλυκοζίτης της Κερκετίνης	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	29.741	299	1.3615
4	Ροσμαρινικό οξύ	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	30.858	359	37.4349
5	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	31.386	431	8.1636



Εικόνα 22. Χρωματογράφημα UV-Vis στα 330 nm του *Salvia ringens* μετά την ανάλυση του LC-DAD-MS. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) π-κουμαρικό οξύ (2) 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (3) καμπερίδη (4) ροσμαρινικό οξύ (5) 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης

3.4.5. Χημικό προφίλ του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *Salvia fruticosa*

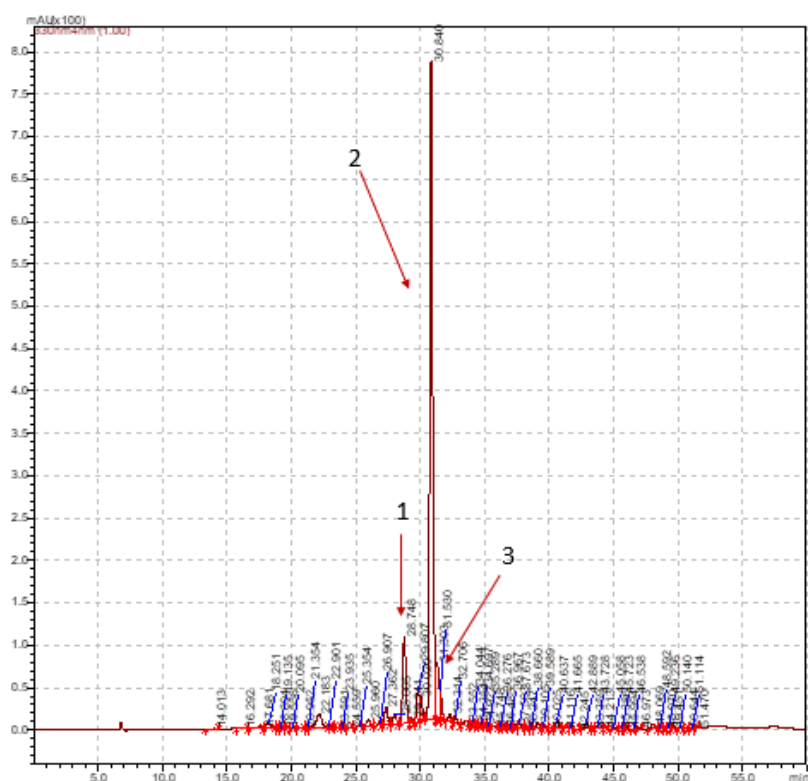
Στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia fruticosa* ανιχνεύτηκαν 69 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 13. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 13 το κύριο συστατικό του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος είναι το ροσμαρινικό οξύ. Ακολούθως, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, η 3-β δ-γλυκοζίτης της Κερκετίνης, το π-κουμαρικό οξύ και η κερκετίνη. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία τα αποτελέσματα σε αντίστοιχες μελέτες ποικίλουν αφού κάποιες από αυτές συμφωνούν

ενώ άλλες διαφέρουν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, οι Parageorgiou *et al.* (2008), στην μελέτη τους ανέλυσαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα του *Salvia fruticosa*, τα οποία είχαν συλλεχθεί διαφορετικούς μήνες και πιο συγκεκριμένα τον Φεβρουάριο, τον Μάιο και τον Αύγουστο. Αναλυτικότερα, ως κύριο συστατικό του εκχυλίσματος ανίχνευσαν σε όλες τις περιπτώσεις την κερκετρίνη, ωστόσο έκαναν μια σημαντική παρατήρηση στο γεγονός ότι η υψηλότερη περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ για τα εκχυλίσματα παρατηρήθηκε τον Φεβρουάριο (πριν από την ανθοφορία) και επιπλέον η απώλεια ροσμαρινικού οξέος στα δείγματά μπορεί να αποδοθεί σε βιολογικές διαδικασίες αποδόμησης. Ακόμα, οι Sarrou *et al.* (2016), στην μελέτη τους ανίχνευσαν ως κύριο συστατικό του εκχυλίσματος το ροσμαρινικό οξύ και επιπλέον αναφέρουν ότι τα δείγματα παρουσίασαν την υψηλότερη περιεκτικότητα ροσμαρινικού οξέος κατά την άνοιξη (Απρίλιος-Μάιος), ακολουθούμενη από θερινή συγκομιδή (Ιούλιος-Αύγουστος), ενώ παρατηρήθηκε μείωση το φθινόπωρο (Σεπτέμβριος-Οκτώβριος). Τέλος, οι Pizzale *et al.* (2002), καθώς και οι Skoula *et al.* (2000), ανίχνευσαν επίσης ως κύριο συστατικό του εκχυλίσματος το ροσμαρινικό οξύ, ενώ επισήμαναν ότι υπάρχουν αρκετοί παράγοντες αβιοτικού στρες στα άγρια φυτά όπως η ξηρασία, η υψηλή αλατότητα, το κρύο κ.λπ. που επηρεάζουν τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά (Parageorgiou *et al.*, 2008, Sarrou *et al.*, 2016, Pizzale *et al.*, 2002, Skoula *et al.*, 2000).

Πίνακας 13. Σύσταση αντιπροσωπευτική για το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του Salvia fruticosa με την τεχνική LC-DAD-MS.

	Συστατικά	Χημικός τύπος	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Εμβαδόν %
1	π-κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	27.362	163	1.9799
2	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	28.748	447	9.1252
3	3-β δ-γλυκοζίτης της Κερκετίνης	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	29.807	299	2.7673
4	Ροσμαρινικό οξύ	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	30.840	359	62.3192
5	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	31.303	431	5.1768

6	Κερκιτρίνη	$C_{21}H_{20}O_{11}$	31.530	447	1.7049
7	3-O-γλυκοζίτης της ισοραμνετίνης	$C_{22}H_{22}O_{12}$	32.706	477	0.7428
8	Κερκετίνη	$C_{15}H_{10}O_7$	37.673	301	0.5084
9	Ναριγενίνη	$C_{16}H_{14}O_6$	38.247	301	0.0278
10	Εσπεριτίνη	$C_{15}H_{12}O_5$	39.589	271	0.2328
11	Απιγενίνη	$C_{15}H_{10}O_5$	40.025	269	0.0699
12	Ακακετίνη	$C_{16}H_{12}O_5$	45.723	283	0.0077
13	Γενκουανίνη	$C_{16}H_{12}O_5$	48.592	299	0.0642

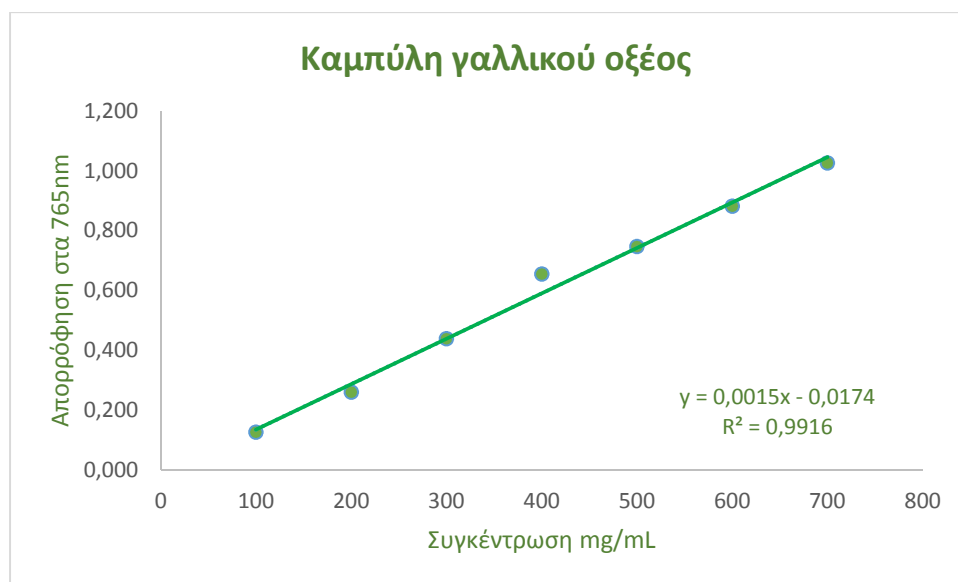


Εικόνα 24. Χρωματογράφημα UV-Vis στα 330 nm του *Salvia fruticosa* μετά την ανάλυση του LC-DAD-MS. Οι αριθμημένες κορυφές αντιστοιχούν στις χημικές ενώσεις με ονόματα (1) 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (2) ροσμαρινικό οξύ (3) 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης

3.5 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Ο προσδιορισμός του αριθμού των ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων φασκόμηλου έγινε με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu και εκφράστηκε ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος/g ξηρού φυτικού υλικού. Χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός διαλυτών

μεθανόλης/νερού σε αναλογία 70:30 (v/v). Η σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους αλλά και με τη βιβλιογραφία έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος καθώς και της εξίσωσης της καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.



Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

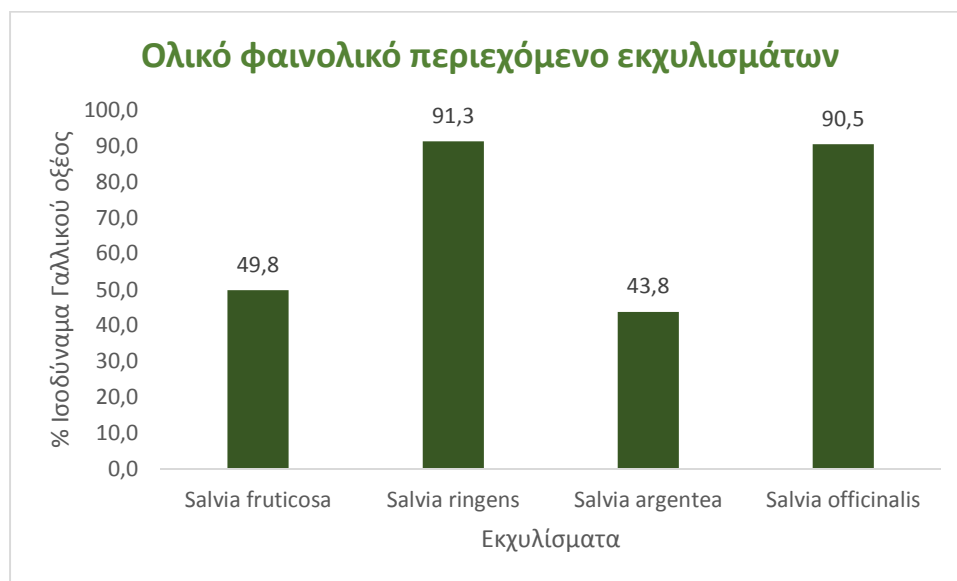
Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας με τα αποτελέσματα από την ανάλυση.

Πίνακας 14. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων φασκόμηλου

Εκχύλισμα	Διαλύτης	Μ.Ο. Απορρόφησης (765 nm)	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg/g)	% Ισοδύναμα γαλλικού οξέος
<i>Salvia fruticose</i>	Μεθανόλη/νερό 70:30 (v/v)	0,647 ± 0,028	49837,5	49,8
<i>Salvia ringens</i>	Μεθανόλη/νερό 70:30 (v/v)	0,824 ± 0,011	91321,5	91,3
<i>Salvia argentea</i>	Μεθανόλη/νερό 70:30 (v/v)	0,379 ± 0,011	43800,6	43,8
<i>Salvia</i>	Μεθανόλη/νερό	0,764 ± 0,016	90542,1	90,5

officinalis 70:30 (v/v)

Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκε το παρακάτω ραβδόγραμμα σύμφωνα με τα επί τις εκατό ποσοστά των ισοδύναμων γαλλικού οξέος.



Ραβδόγραμμα 1. Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων εκφρασμένο σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος

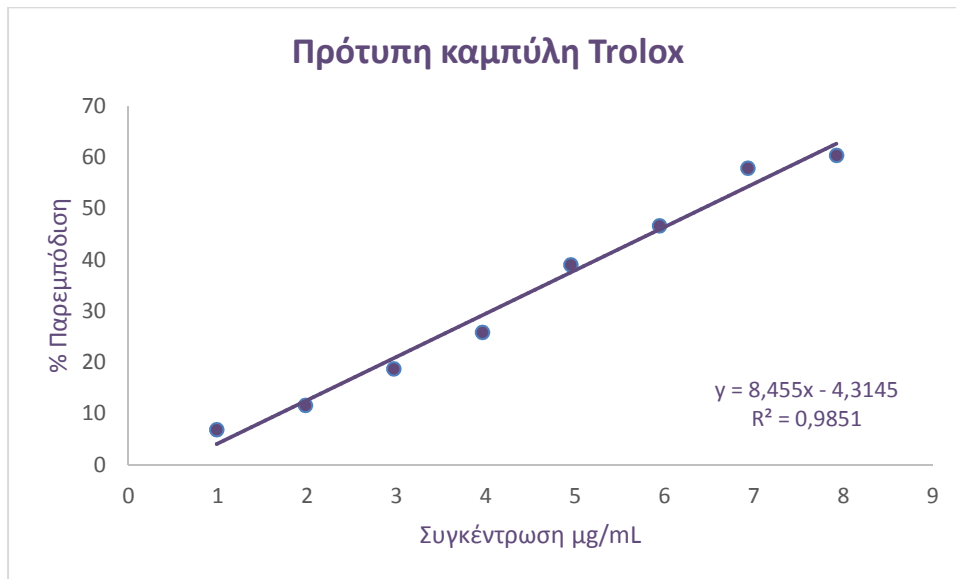
Από το ραβδόγραμμα 1 διαπιστώνουμε ότι τα είδη *Salvia ringens* και *Salvia officinalis* έχουν την μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φαινολικών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Το *Salvia ringens* υπερिशύχει με ποσοστό 91,3% και αμέσως μετά το *Salvia officinalis* με ποσοστό 90,5%. Ακολουθεί το *Salvia fruticosa* με ποσοστό 49,8% και τέλος το *Salvia argentea* με ποσοστό 43,8%. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με την βιβλιογραφία, καθώς τα συγκεκριμένα δύο δείγματα παρουσιάζουν μεγάλη ποσότητα ολικών φαινολικών και σε άλλες μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, οι Alimpric *et al.* (2015) μεταξύ τεσσάρων διαλυτών διαπίστωσαν ότι μεγαλύτερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο για το δείγμα *Salvia ringens* έχουμε με τον αιθανικό αιθυλεστέρα και την αιθανόλη. Επιπλέον, οι Farhat *et al.* (2013) επισημαίνουν την σπουδαιότητα των συνθηκών, όπως ο τόπος καλλιέργειας, η

περίοδος συλλογής και η αποθήκευση του φυτικού υλικού, στην ποσότητα των ολικών φαινολικών (Alimpic *et al.*, 2015, Farhat *et al.*, 2013.)

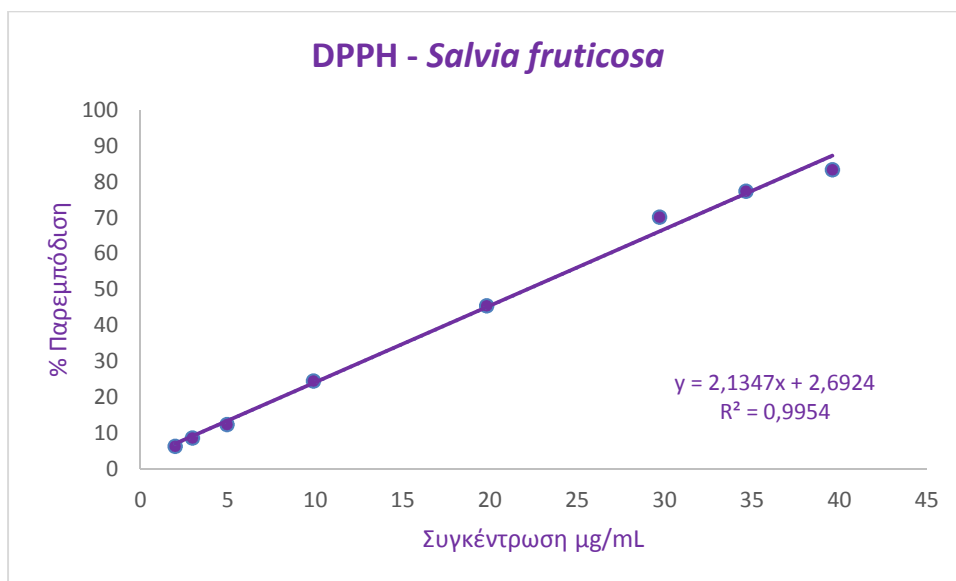
3.6 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων του γένους *Salvia*

3.6.1 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δοκιμασίας DPPH

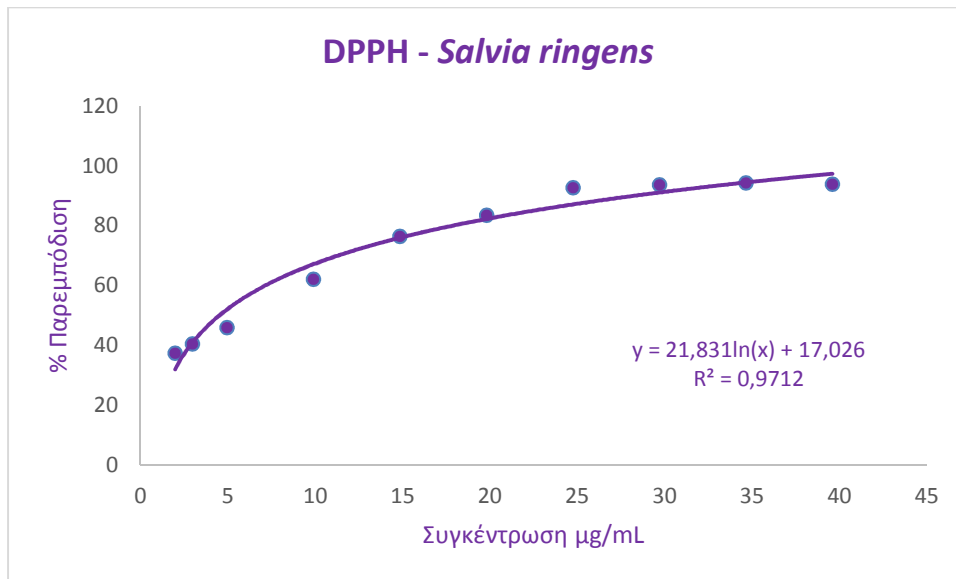
Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων έγινε με τη δοκιμασία του DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτήθηκε για να προκαλέσει παρεμπόδιση στην οξείδωση του υποστρώματος κατά 50% (IC₅₀). Για την αποτελεσματική σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους αλλά και με τη βιβλιογραφία, παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox και για κάθε εκχύλισμα δημιουργήθηκε γραφική παράσταση της % παρεμπόδισης σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του εκάστοτε εξεταζόμενου δείγματος. Από την εξίσωση της κάθε γραφικής παράστασης των δειγμάτων προσδιορίστηκαν οι τιμές IC₅₀ της πρότυπης ουσίας Trolox καθώς και των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων. Παρακάτω παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις της πρότυπης ουσίας και των εκχυλισμάτων.



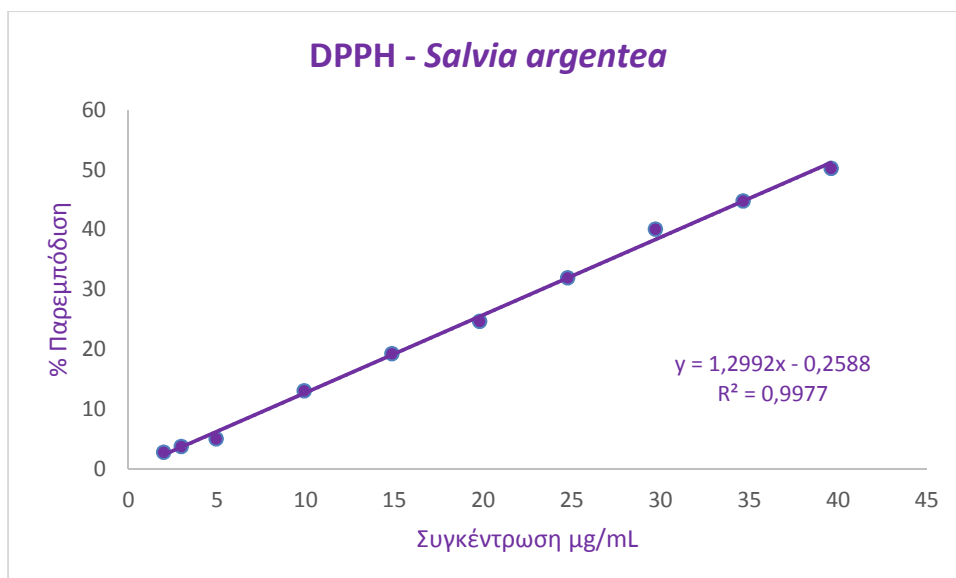
Διάγραμμα 2. Πρότυπη καμπύλη trolox



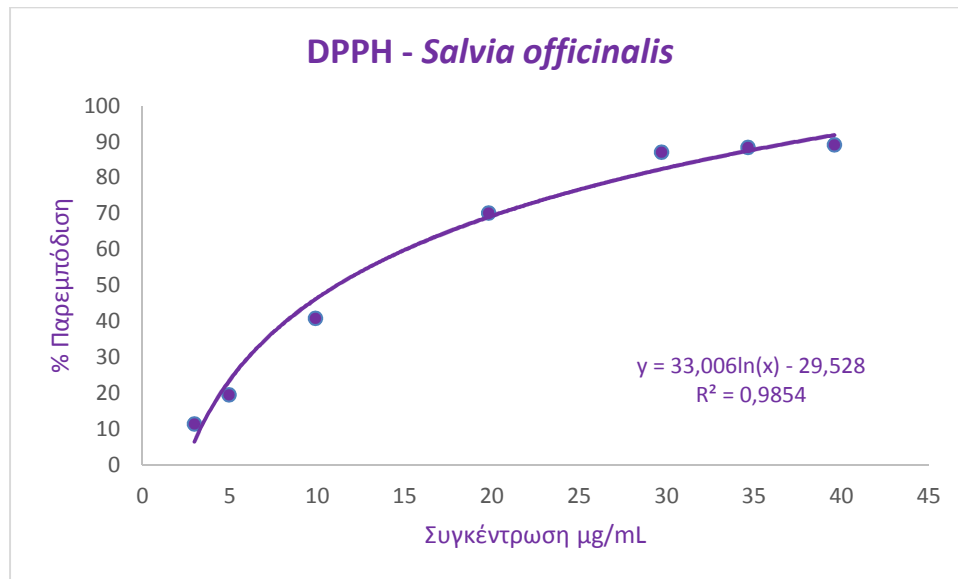
Διάγραμμα 3. Υδρομεθανολικό εκχύλισμα Salvia fruticosa



Διάγραμμα 4. Υδρομεθανολικό εκχύλισμα *Salvia ringens*



Διάγραμμα 5. Υδρομεθανολικό εκχύλισμα *Salvia argentea*

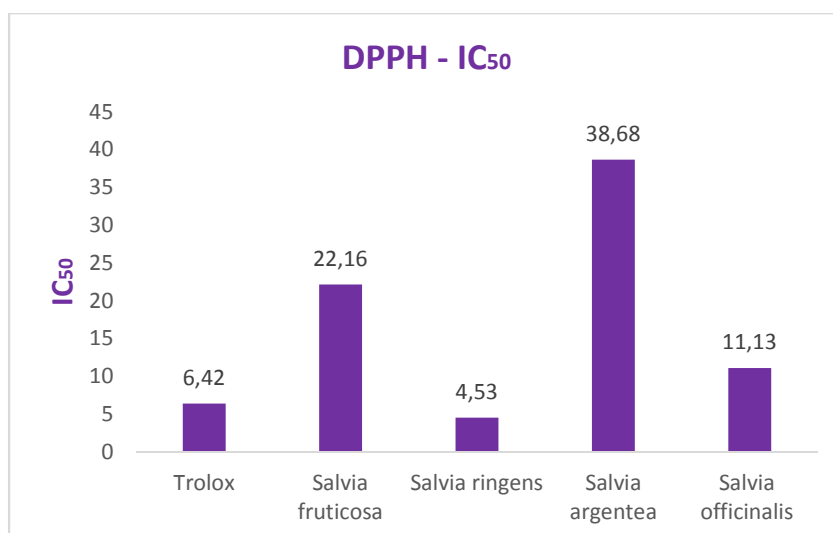


Διάγραμμα 6. Υδρομεθανολικό εκχύλισμα *Salvia officinalis*

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} της πρότυπης ουσίας και των εκχυλισμάτων, με φθίνουσα σειρά, δηλαδή αύξουσα σειρά αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητας, ενώ στο ραβδόγραμμα γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων IC_{50} .

Πίνακας 15. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων με βάση τη δοκιμή DPPH.

Εκχύλισμα μεθανόλη/νερό (70:30 v/v)	IC_{50} (µg/mL)
<i>Salvia fruticosa</i>	22.16
<i>Salvia ringens</i>	4.53
<i>Salvia argentea</i>	38.68
<i>Salvia officinalis</i>	11.13
Trolox	6.42



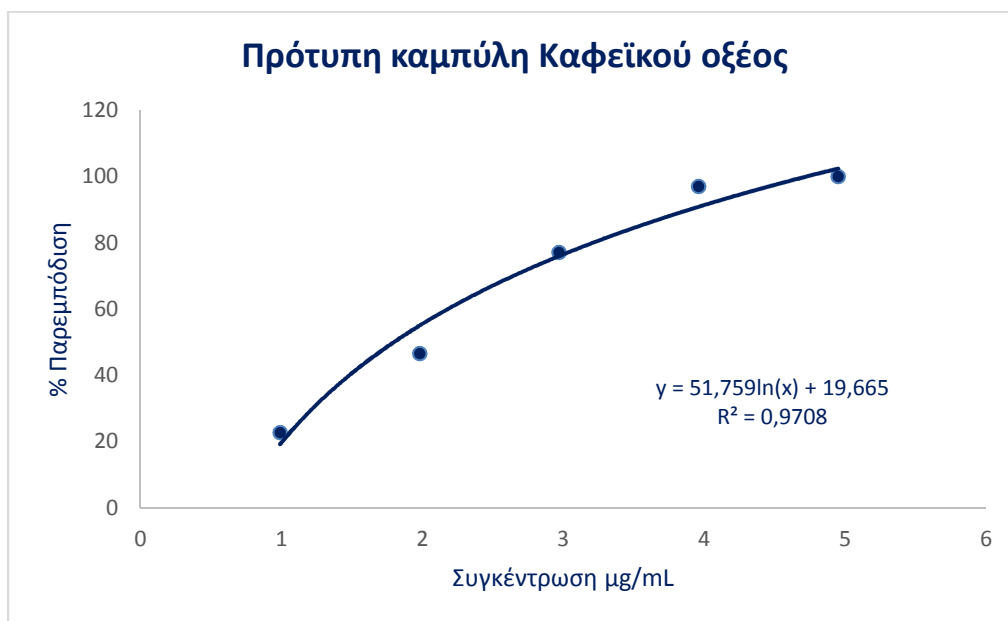
Ραβδόγραμμα 2. Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το υδρομεθανολικό εκχύλισμα που παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το *Salvia ringens*, καθώς κατέχει το μικρότερο IC₅₀ (4.53 μg/mL) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Ακολουθεί το *Salvia officinalis* (11.13 μg/mL), το *Salvia fruticosa* (22,16 μg/mL), ενώ το λιγότερο δραστικό υδρομεθανολικό εκχύλισμα είναι το *Salvia argentea* (38,68 μg/mL).

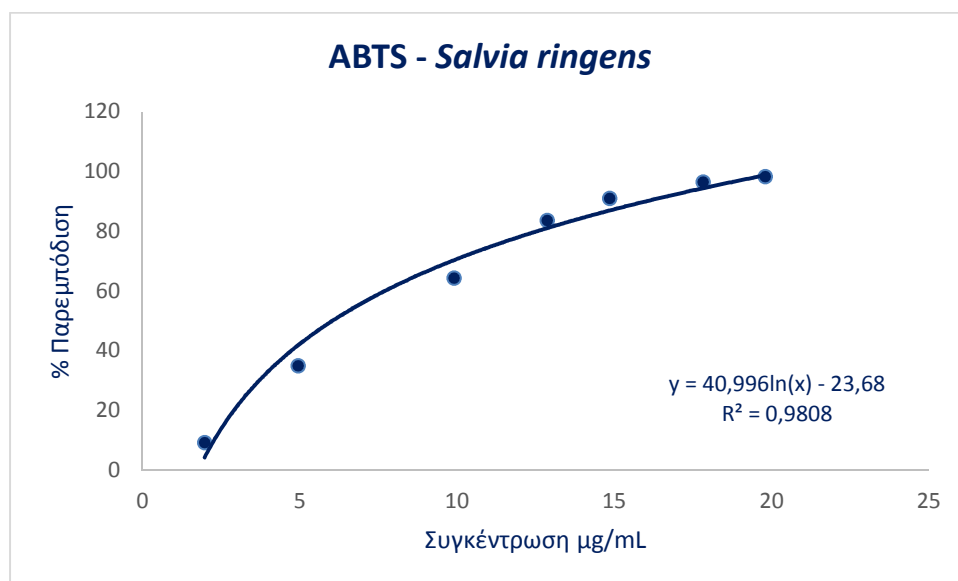
3.6.2 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δοκιμής ABTS

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων έγινε με τη δοκιμασία του ABTS και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτήθηκε για να προκαλέσει παρεμπόδιση στην οξείδωση του υποστρώματος κατά 50% (IC₅₀). Για την αποτελεσματική σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους αλλά και με τη βιβλιογραφία, παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος και για κάθε εκχύλισμα δημιουργήθηκε γραφική παράσταση της % παρεμπόδισης σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του εκάστοτε εξεταζόμενου δείγματος. Από την εξίσωση της

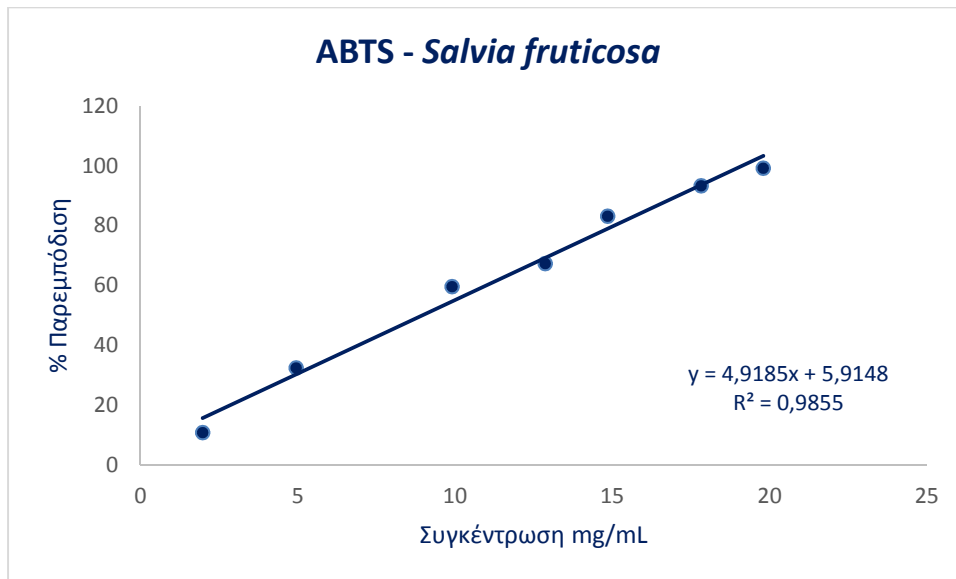
κάθε γραφικής παράστασης των δειγμάτων προσδιορίστηκαν οι τιμές IC₅₀ της πρότυπης ουσίας καφεϊκού οξέος καθώς και των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων. Παρακάτω παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις της πρότυπης ουσίας και των εκχυλισμάτων.



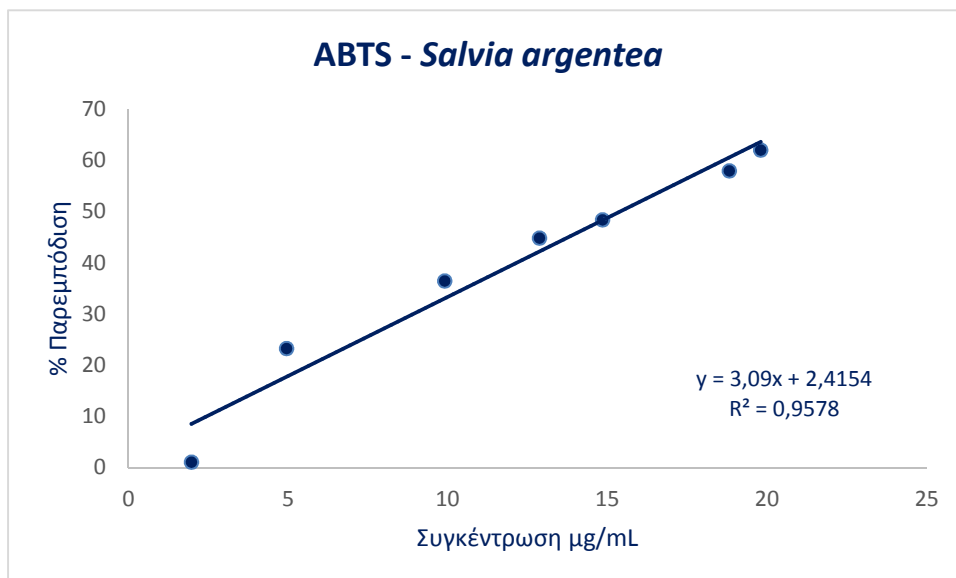
Διάγραμμα 7. Πρότυπη καμπύλη Καφεϊκού οξέος



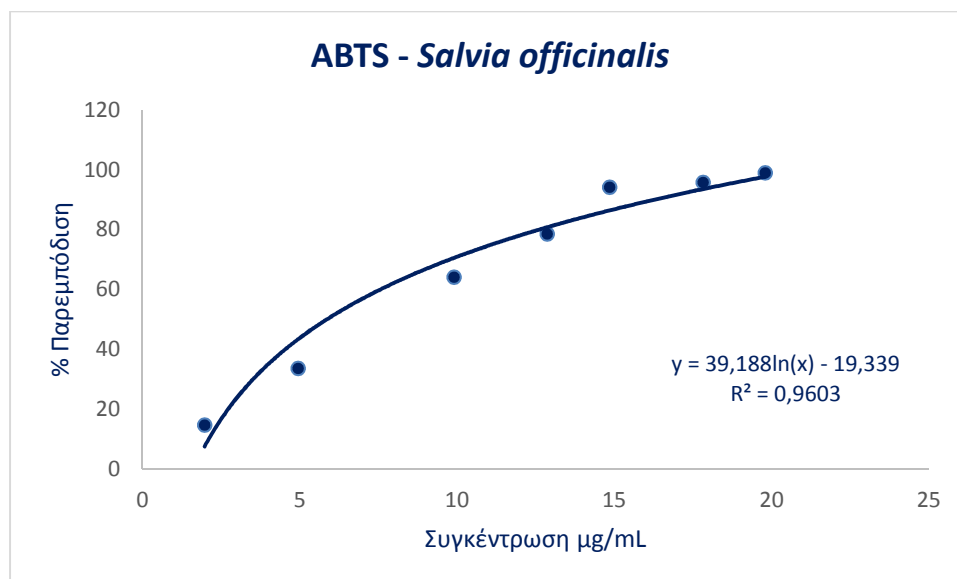
Διάγραμμα 8. Υδρομεθανολικό εκχύλισμα *Salvia ringens*



Διάγραμμα 9. Υδρομεθανολικό εκχύλισμα *Salvia fruticosa*



Διάγραμμα 10. Υδρομεθανολικό εκχύλισμα *Salvia argentea*

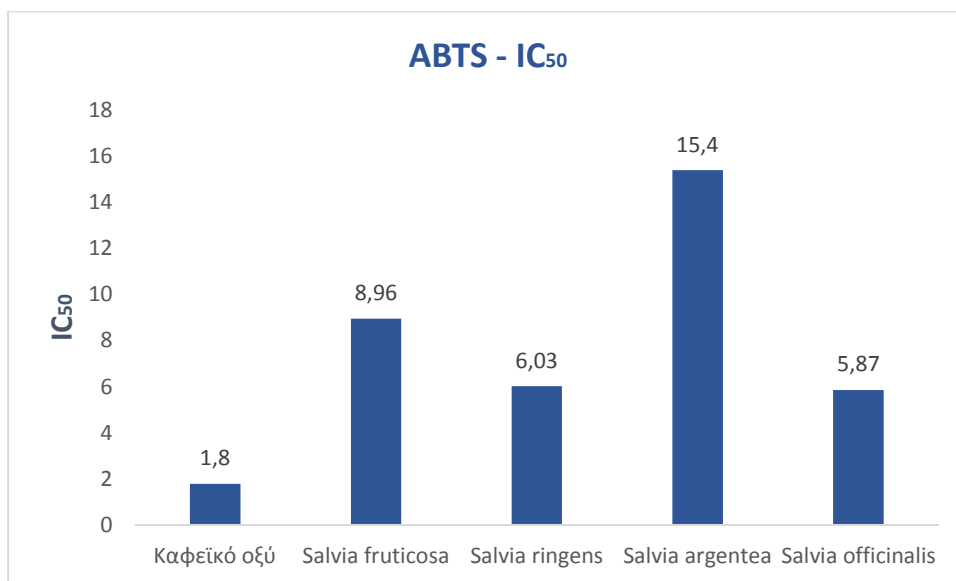


Διάγραμμα 11. Υδρομεθανολικό εκχύλισμα *Salvia officinalis*

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} της πρότυπης ουσίας (καφεϊκού οξέος) και των εκχυλισμάτων, με φθίνουσα σειρά, δηλαδή αύξουσα σειρά αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητας, ενώ στο ραβδόγραμμα γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων IC_{50} .

Πίνακας 16. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων με βάση τη δοκιμή ABTS.

Εκχύλισμα μεθανόλη/νερό (70:30 v/v)	IC_{50} (µg/mL)
<i>Salvia fruticosa</i>	8.96
<i>Salvia ringens</i>	6.03
<i>Salvia argentea</i>	15.40
<i>Salvia officinalis</i>	5.87
Καφεϊκό οξύ	1.80



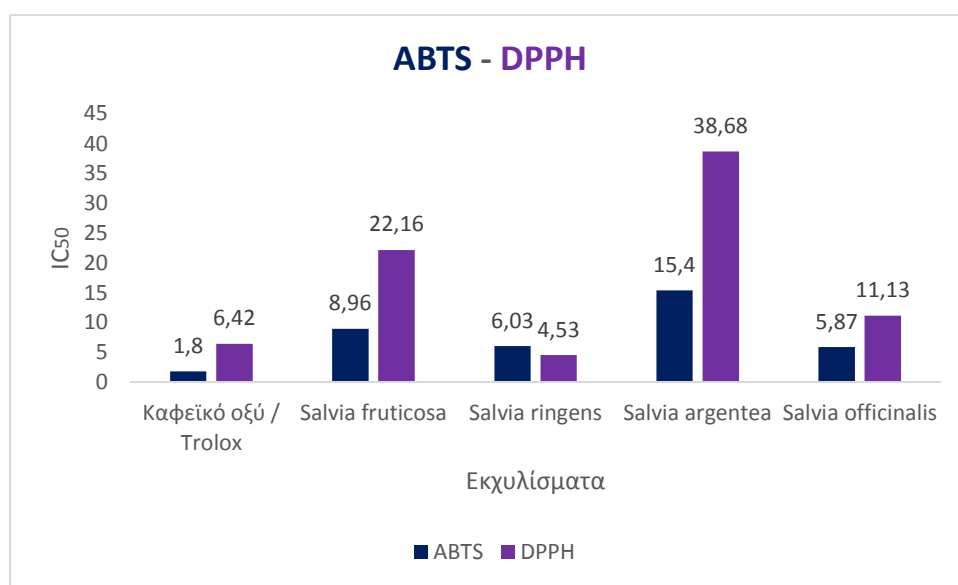
Ραβδόγραμμα 3. Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το υδρομεθανολικό εκχύλισμα που παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το *Salvia officinalis*, καθώς κατέχει το μικρότερο IC₅₀ (5.87 μg/mL) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Ακολουθεί το *Salvia ringens* (6.03 μg/mL), το *Salvia fruticosa* (8.96 μg/mL), ενώ το λιγότερο δραστικό υδρομεθανολικό εκχύλισμα είναι το *Salvia argentea* (15.4 μg/mL).

3.6.3 Σύγκριση των δοκιμών DPPH και ABTS στα δείγματα φασκόμηλου

Στο παρακάτω ραβδόγραμμα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των τεσσάρων δειγμάτων φασκόμηλου με τις αντιοξειδωτικές δοκιμασίες DPPH και ABTS. Πιο συγκεκριμένα μετά την σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο δοκιμασιών παρατηρήθηκε ότι όλα τα δείγματα παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στην περίπτωση της δοκιμασίας του ABTS εκτός από την περίπτωση του *Salvia ringens*, όπου στην περίπτωση της δοκιμασίας του DPPH έδειξε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Όλες οι τιμές οι τιμές IC₅₀ στην δοκιμασία του DPPH παρουσιάζουν μεγαλύτερη διακύμανση σε σύγκριση με τις

τιμές IC₅₀ της δοκιμασίας του ABTS, καθώς οι τιμές των αποτελεσμάτων ποικίλουν. Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτό είναι το γεγονός ότι η ταχύτητα της αντίδρασης του αντιοξειδωτικού ABTS είναι πιο γρήγορη σε σύγκριση με αυτήν του DPPH. Επιπλέον, η δοκιμασία ABTS μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε λιπόφιλα όσο και υδρόφιλα αντιοξειδωτικά συστήματα, σε αντίθεση με τη δοκιμασία DPPH που εφαρμόζεται μόνο σε υδρόφιλα αντιοξειδωτικά συστήματα. Ωστόσο και οι δύο δοκιμασίες επαρκούν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, αλλά η δοκιμασία ABTS είναι πιο ευαίσθητη. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση της δοκιμασίας του ABTS όλα τα εκχυλίσματα ήταν κοντά στις τιμές IC₅₀ της πρότυπης ουσίας (καφεϊκό οξύ).



Ραβδόγραμμα 4. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων φασκόμηλου με βάση τις δοκιμές ABTS και DPPH.

Όπως, προαναφέρθηκε λοιπόν και πιο πάνω από την σύγκριση των δοκιμασιών ABTS και DPPH παρατηρούμε ότι τα δείγματα με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στην περίπτωση του DPPH ήταν το *Salvia ringens*, ενώ στην περίπτωση του ABTS το *Salvia officinalis*. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με την βιβλιογραφία καθώς και σε άλλες μελέτες φαίνεται ότι τα δείγματα αυτά παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Αναλυτικότερα, στην μελέτη των Alimpric *et al.*, (2015) το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia ringens* φαίνεται να έχει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και με τη δοκιμή του ABTS αλλά και του DPPH, μεταξύ 4 διαφορετικών ειδών φασκόμηλου. Επιπλέον, στην μελέτη των Wang *et al.*

(1998) σε αιθανολικό διάλυμα το *Salvia officinalis* φαίνεται να έχει υψηλή αντιοξειδωτική δράση, λόγω της υψηλής ποσότητας ροσμαρινικού οξέος. Ωστόσο, οι Farhat *et al.* (2014) στην μελέτη σύγκριναν δείγματα *Salvia officinalis*, τα οποία είχαν συλλεχθεί διαφορετικές χρονικές περιόδους και παρατήρησαν ότι την εποχή μετά την άνθιση τα μεθανολικά εκχυλίσματα των δειγμάτων παρουσίασαν την μέγιστη αντιοξειδωτική δράση και με τις δύο δοκιμασίες. Οι Duletić-Laušević *et al.* (2018) στην μελέτη τους σύγκριναν εκχυλίσματα του είδους *Salvia fruticosa* με διαφορετικούς διαλύτες και πιο συγκεκριμένα αιθανόλη, νερό, διχλωρομεθάνιο, αιθανικός αιθυλεστέρας και μεθανόλη. Για την δοκιμασία DPPH υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα είχε το αιθανολικό εκχύλισμα, ενώ για την δοκιμασία ABTS μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση είχε το εκχύλισμα με τον αιθανικό αιθυλεστέρα. Τέλος, το *Salvia argentea* και με τις δύο δοκιμές είχε την χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, οι Farhat *et al.* (2013) καθώς και οι Salah *et al.* (2006) σε σύγκριση με άλλα δείγματα φασκόμηλου αναφέρουν ότι το *Salvia argentea* κατέχει την μικρότερη αντιοξειδωτική δράση και με τις δύο δοκιμασίες (Alimpic *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 1998, Farhat *et al.*, 2013, Duletić-Laušević *et al.*, 2018, Salah *et al.*, 2006).

4. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων και των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων τεσσάρων ειδών φασκόμηλου της οικογένειας *Lamiaceae* και της βιοδραστητικότητάς τους. Πιο συγκεκριμένα, το αιθέριο έλαιο των *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa*, *Salvia argentea* και *Salvia ringens* μετά την συλλογή και την ξήρανσή τους και κατόπιν υδρο-απόσταξης με συσκευή Clevenger, μελετήθηκε ως προς τη χημική του σύσταση με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS) προκειμένου να προσδιοριστούν τα πτητικά συστατικά που αυτό περιέχει. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών που ανιχνεύτηκαν στα αιθέρια έλαια. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών

(LC-DAD-MS). Τέλος, τα δείγματα ελέγχθηκαν ως προς τη βιοδραστικότητά τους με τις δοκιμές DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu, δηλαδή εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με τις δοκιμασίες DPPH και ABTS, καθώς επίσης το ολικό φαινολικό περιεχόμενό τους με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu.

Αρχικά, την υψηλότερη ποσότητα αιθερίου ελαίου σε mL ανά 100g ξηρού φυτικού υλικού την έδωσε το *Salvia fruticosa* με 2,16 mL/100g ξηρού φυτικού υλικού και έπειτα το *Salvia officinalis* με 1,3 mL/100g ξηρού φυτικού υλικού. Την μικρότερη ποσότητα αιθερίου ελαίου την έδωσε το *Salvia argentea*. Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia fruticosa* ανιχνεύτηκαν 26 πτητικά συστατικά. Το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου είναι η 1,8-κινεόλη με ποσοστό 48,50% (w/v). Ακολουθούν η καμφορά με ποσοστό 7,64% (w/v), το α -πινένιο (6,22%) (w/v), το *E*-καρνοφυλλένιο (5,92%) (w/v), το β -πινένιο (4,74%) (w/v), το μυρκένιο (3,06%) (w/v), ο εξανοϊκό οξύ,2-ηυδροξυλ-1-(υδροξυλμεθυλ)εθυλ εστέρας (3,06%) (w/v), η βιριδιβλορόλη (3,02%), η α -τερπινεόλη (2,71%) (w/v), το καμφένιο (2,67%) (w/v) και η αρωμαδενδρίνη (2,08%) (w/v). Ακολουθούν μικρότερα ποσοστά όπως αυτό της βορνεόλης (1,97%) (w/v) και του *p*-κυμενίου (1,45%) (w/v). Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia argentea* ανιχνεύτηκαν 30 πτητικά συστατικά από τα οποία αναγνωρίστηκαν τα 20. Το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου είναι το *D*-γερμακρένιο με ποσοστό 37,41% (w/v). Ακολουθούν το *E*-καρνοφυλλένιο (6,75%) (w/v) και το οξειδίο του καρνοφυλλενίου (6,12%) (w/v). Σημαντικά ποσοστά παρουσιάζουν και το δ -καδινένιο (2,50%) (w/v), το α -φαρνεσένιο (1,93%) (w/v), το Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol (1,74%) (w/v), η αμπιενόλη (1,72%) (w/v) και το α -χουμουλένιο (1,48%) (w/v). Παρατηρείται λοιπόν από την ανάλυση του συγκεκριμένου δείγματος αιθερίου ελαίου η παρουσία σεσκιτερπενίων και οξυγονομένων σεσκιτερπενίων, ενώ δεν έχουν ανιχνευθεί μονοτερπένια. Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia ringens* ανιχνεύτηκαν 35 πτητικά συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 33. Το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου είναι το *E*-καρνοφυλλένιο με ποσοστό 8,89% (w/v) ακολουθεί η 1,8-κινεόλη με ποσοστό 6,17% (w/v). Έπειτα, η καμφορά με ποσοστό 5,72% (w/v), η α -κουρκουμίνη (5,28%) (w/v), το α -χουμουλένιο (4,97%) (w/v), το οξικό ισοβορνύλιο (4,54%) (w/v), το γ -μυρολένιο (4,44%) (w/v), η βορνεόλη (3,85%) (w/v), το δ -καδινένιο (3,58%) (w/v), το α -κοπαένιο (3,24%) (w/v) και η λιναλοόλη (3,07%) (w/v). Έπειτα, ακολουθούν μικρότερα ποσοστά όπως το γ -καδινένιο (2,31%) (w/v), το οξειδίο καρνοφυλλενίου (2,12%) (w/v), η *cis*-θουγιόνη (1,73%) (w/v), α -καδινόλη

(1,42%) (w/v), το εποξειδίο χουμουλενίου II (1,40%) (w/v), το β-μπουρμπονένιο (1,28%) (w/v) και το λιμονένιο (1,27%) (w/v). Στο αιθέριο έλαιο του *Salvia officinalis* ανιχνεύτηκαν 28 πτητικά συστατικά και αναγνωρίστηκαν τα 26. Το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου είναι η καμφορά με ποσοστό 24,32% (w/v) ακολουθεί η 1,8-κινεόλη (ευκαλυπτόλη) με ποσοστό 15,65% (w/v). Έπειτα, το καμφένιο με ποσοστό 4,94% (w/v) και η *cis*-θουγιόνη (4,53%) (w/v). Σημαντικά ποσοστά παρουσιάζουν επίσης η βορνεόλη (3,82%) (w/v), το α-πινένιο (3,81%) (w/v) και η *trans*-θουγιόνη (2,89%) (w/v). Μικρότερα ποσοστά παρουσιάζουν επίσης το οξικό ισοβορνύλιο (1,93%)(w/v), η βιριδιφλορόλη (1,36%) (w/v), η καρβακρόλη (1,18%)(w/v) και η θυμόλη (1,01%)(w/v). Από όλα τα παραπάνω, καθώς και από την βιβλιογραφία μπορούμε να εξάγουμε πολλά συμπεράσματα. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση των αιθέριων ελαίων από το εναέριο μέρος των φυτών του γένους *Salvia*, που λαμβάνονται ως σύνολο, ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με την αναλογία φύλλων/στελεχών/λουλουδιών της βιομάζας που χρησιμοποιείται ως πηγή αιθέριου ελαίου. Μια τέτοια μεταβλητότητα θα εξηγούσε τη δυσκολία στην απόδοση ενός δεδομένου χημικού τύπου. Επιπλέον δεδομένα άλλων ερευνών δείχνουν ότι η σύνθεση του αιθέριου ελαίου φασκόμηλου ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τη γονιμοποίηση του εδάφους με ανόργανα συστατικά, την ένταση του φωτός, την ηλικία των αναπαραγωγικών οργάνων των φυτών, τις κλιματολογικές συνθήκες, την εποχή και τον τόπο καλλιέργειας. Συνεπώς γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι το χημικό προφίλ του αιθερίου ελαίου ενός φυτικού είδους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το μέρος του φυτού που επιλέγεται κάθε φορά για ανάλυση, την περίοδο συλλογής του φυτικού είδους καθώς και τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ο ποιοτικός προσδιορισμός των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των τεσσάρων ειδών φασκόμηλου με LC-DAD-MS. Στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia officinalis* ανιχνεύτηκαν 71 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 22. Το κύριο συστατικό του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος είναι το ροσμαρινικό οξύ ακολουθεί το π-κουμαρικό οξύ. Έπειτα, ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 3-β δ-γλυκοζίτης της Κερκετίνης, ο 3-O-γλυκοζίτης της ισοραμεντίνης και η κερκιτρίνη. Στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia ringens* ανιχνεύτηκαν 61 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 5. Το ροσμαρινικό οξύ ήταν και σε αυτήν την περίπτωση η κύρια ουσία. Ακολουθεί το π-κουμαρικό οξύ. Έπειτα, ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, ο 7-O-γλυκοζίτης της

λουτεολίνης και ο 3-β δ-γλυκοζίτης της Κερκετίνης. Στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia fruticosa* ανιχνεύτηκαν 69 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 13. Το κύριο συστατικό του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος είναι το ροσμαρινικό οξύ. Ακολούθως, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και ο 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης. Στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia argentea* ανιχνεύτηκαν 61 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 6. Κύριο συστατικό του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος είναι και σε αυτήν την περίπτωση το ροσμαρινικό οξύ και ακολουθεί η κερκιτρίνη. Έπειτα, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, το π-κουμαρικό οξύ και η κερκετίνη. Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι το κύριο συστατικό σε όλα τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα είναι το ροσμαρινικό οξύ. Από άλλες μελέτες φαίνεται ότι η απώλεια ροσμαρινικού οξέος στα δείγματα μπορεί να αποδοθεί σε βιολογικές διαδικασίες αποδόμησης. Επιπλέον τα δείγματα παρουσίασαν την υψηλότερη περιεκτικότητα ροσμαρινικού οξέος κατά την άνοιξη (Απρίλιος-Μάιος), ακολουθούμενη από θερινή συγκομιδή (Ιούλιος-Αύγουστος), ενώ παρατηρήθηκε μείωση το φθινόπωρο (Σεπτέμβριος-Οκτώβριος). Παράλληλα, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες αβιοτικού στρες στα άγρια φυτά όπως η ξηρασία, η υψηλή αλατότητα, το κρύο κ.λπ. που επηρεάζουν τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά και αλλάζουν το χημικό τους προφίλ.

Ο προσδιορισμός του αριθμού των ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων φασκόμηλου έγινε με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu και εκφράστηκε ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος/g ξηρού φυτικού υλικού. Χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός διαλυτών μεθανόλης/νερού σε αναλογία 70:30 (v/v) όπως έχει προαναφερθεί. Τα δύο είδη *Salvia ringens* και *Salvia officinalis* παρουσίασαν την μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φαινολικών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Το *Salvia ringens* υπερισχύει με ποσοστό 91,3% ισοδύναμα γαλλικού οξέος και αμέσως μετά το *Salvia officinalis* με ποσοστό 90,5% ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Ακολουθεί το *Salvia fruticosa* με ποσοστό 49,8% ισοδύναμα γαλλικού οξέος και τέλος το *Salvia argentea* με ποσοστό 43,8% ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Σε αυτό το σημείο πρέπει να επισημανθεί η σπουδαιότητα των συνθηκών, όπως ο τόπος καλλιέργειας, η περίοδος συλλογής και η αποθήκευση του φυτικού υλικού, στην ποσότητα και την ποιότητα των ολικών φαινολικών.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων έγινε με τη δοκιμασία του DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) καθώς και με τη

δοκιμασία του ABTS και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η απαραίτητη ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτήθηκε για να προκαλέσει παρεμπόδιση στην οξείδωση του υποστρώματος κατά 50% (IC₅₀). Για τη δοκιμασία του DPPH, το υδρομεθανολικό εκχύλισμα που παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το *Salvia ringens*, καθώς κατέχει το μικρότερο IC₅₀ (4.53 µg/mL) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Ακολουθεί το *Salvia officinalis* (11.13 µg/mL), το *Salvia fruticosa* (22,16 µg/mL), ενώ το λιγότερο δραστικό υδρομεθανολικό εκχύλισμα είναι το *Salvia argentea* (38,68 µg/mL). Για την περίπτωση του ABTS, το υδρομεθανολικό εκχύλισμα που παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι το *Salvia officinalis*, καθώς κατέχει το μικρότερο IC₅₀ (5.87 µg/mL) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Ακολουθεί το *Salvia ringens* (6.03 µg/mL), το *Salvia fruticosa* (8.96 µg/mL), ενώ το λιγότερο δραστικό υδρομεθανολικό εκχύλισμα είναι το *Salvia argentea* (15.4 µg/mL). Μετά την σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο δοκιμασιών παρατηρήθηκε ότι όλα τα δείγματα παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στην περίπτωση της δοκιμασίας του ABTS εκτός από την περίπτωση του *Salvia ringens*, όπου στην περίπτωση της δοκιμασίας του DPPH έδειξε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Όλες οι τιμές οι τιμές IC₅₀ στην δοκιμασία του DPPH παρουσιάζουν μεγαλύτερη διακύμανση σε σύγκριση με τις τιμές IC₅₀ της δοκιμασίας του ABTS, καθώς οι τιμές των αποτελεσμάτων ποικίλουν. Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτό είναι το γεγονός ότι η ταχύτητα της αντίδρασης του αντιοξειδωτικού ABTS είναι πιο γρήγορη σε σύγκριση με αυτήν του DPPH. Επιπλέον, η δοκιμασία ABTS μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε λιπόφιλα όσο και υδρόφιλα αντιοξειδωτικά συστήματα, σε αντίθεση με τη δοκιμασία DPPH που εφαρμόζεται μόνο σε υδρόφιλα αντιοξειδωτικά συστήματα. Ωστόσο και οι δύο δοκιμασίες επαρκούν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, αλλά η δοκιμασία ABTS είναι πιο ευαίσθητη. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση της δοκιμασίας του ABTS όλα τα εκχυλίσματα ήταν κοντά στις τιμές IC₅₀ της πρότυπης ουσίας (καφεϊκό οξύ).

Βιβλιογραφία

Ελληνική Βιβλιογραφία

Ανδρικόπουλος Ν. 2015. Ανάλυση Τροφίμων, Εκδόσεις Ανδρικόπουλος Νικόλαος.

Βογιατζή- Καμβούκου Ε., 2004, Επιλογή αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία.

Γρηγοράτος Ι. 2002. Αρωματική και Φαρμακευτική Χλωρίδα της Ελλάδας: ένας εθνικός αναξιοποίητος πλούτος/ Προοπτικές-Κίνητρα. ΑΓΡΟbusiness 3/2002: 52-57.

Δόρδας, Χ., (2012) Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά, Τόμος ΙΙ, Γεωπονική Σχολή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.

Κατσιώτης Σ. & Χατζοπούλου π., 2015, Αρωματικά φαρμακευτικά φυτά και αιθέρια έλαια, εκδόσεις Κυριακίδη.

Κουτελιδάκης Α., (2014) Λειτουργικά τρόφιμα, Ο ρόλος τους στην προαγωγή της υγείας, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

Σκρουμπής Β. 1998. Αρωματικά, φαρμακευτικά και μελισσοτροφικά φυτά της Ελλάδας. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα.

Διεθνής Βιβλιογραφία

Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875–877.

Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A. H., & Khani, M. (2003). *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer’s disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 28(1), 53–59.

Alimpić, A., Pljevljakušić, D., Šavikin, K., Knežević, A., Čurčić, M., Veličković, D., Duletić-Laušević, S. (2015). Composition and biological effects of *Salvia ringens* (Lamiaceae) essential oil and extracts. *Industrial Crops and Products*, 76, 702–709

- Arikat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S., & Shibli, R. A. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 100(1-4), 193–202.
- Benabdesslem, Y., Hachem, K., Kahloula, K., & Slimani, M. (2017). Ethnobotanical Survey, Preliminary Physico-Chemical and Phytochemical Screening of *Salvia argentea* (L.) Used by Herbalists of the Saïda Province in Algeria. *Plants*, 6(4), 59
- Bettaieb, I., Zakhama, N., Wannes, W. A., Kchouk, M. E., & Marzouk, B. (2009). Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia Horticulturae*, 120(2), 271–275.
- Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J, eds. (2000) *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Austin, TX: American Botanical Council; Newton, MA: Integrative Medicine Communications.
- Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants*. Lavoisier Intercept, London, UK.
- Coisin M., Necula R., Grigoras V., Gille E., Rosenhech E., Zamfirache M. (2012) Phytochemical evaluation of some *Salvia* species from Romanian flora *Analele Științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași*. II a. *Biologie vegetală*., 58(1): 35-44.
- Couladis M., Tzakou O., Stojanovic D., Mimica-Dukik N., Jancic R. (2001). The essential oil composition of *Salvia argentea* L. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL* Flavour Fragr. J. 16: 227–229.
- Culpeper N. (1992) *Culpeper’s Complete Herbal*. London; Bloomsbury Books.
- Cuvelier, M. E., Berset, C., & Richard, H. (1994). Antioxidant Constituents in Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3), 665–669.
- DerMarderosian A, Beutler JA. (2002) *The Review of Natural Products: The Most Complete Source of Natural Product Information*. 3rd ed. St. Louis, MO: Facts and Comparisons.
- Duletić-Laušević, S., Alimpić Aradski, A., Šavikin, K., Knežević, A., Milutinović, M., Stević, T., ... Marin, P. D. (2018). Composition and biological activities of

Libyan *Salvia fruticosa* Mill. and *S. lanigera* Poir. extracts. *South African Journal of Botany*, 117, 101–109.

European Pharmacopoeia Commission. (2010) Sage Leaf; Sage Tincture. In: *European Pharmacopoeia, Seventh Edition (PhEur 7.0)*. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines.12301232.

European Herb Growers Association (EUROPAM) Production of Medicinal and Aromatic Plants in Europe. EUROPAM. European Herb Growers Association.

Available at:

www.europam.net/index.php?option=com_content&view=article&id=6&Itemid=11. Accessed November 24, 2020.

Farhat M.B., Landousli A., Chaouch-Hamada R., Sotomayor J.A., Jordan M. (2013). Profiling of essential oils and polyphenolics of *Salvia argentea* and evaluation of its by-products antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 47,106-112.

Georgiev, V., Marchev, A., Nikolova, M., Ivanov, I., Gochev, V., Stoyanova, A., & Pavlov, A. (2013). Chemical Compositions of Essential Oils from Leaves and Flowers of *Salvia ringens* Sibth. et Sm. Growing Wild in Bulgaria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(5), 624–629.

Gerhard W., 2003, *Θεραπευτικά βότανα & Υγεία*, εκδόσεις Ντουντούμη.

Ghorbani, A., & Esmailizadeh, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(4), 433–440.

Grigoriadou, K., Krigas, N., Lazari, D., Maloupa, E., (2020) Sustainable use of mediterranean medicinal-aromatic plants, *Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health*.

Gunnar S., 1996, *Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προελεύσεως*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, σελ. 2

Hao, C., Zhao, X., & Yang, P. (2007). GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(6), 569–580.

- Jakovljević M., Jokić S., Molnar M., Jašić M., Babić J., Jukić H., Banjari I., (2019) Bioactive Profile of Various *Salvia officinalis* L. Preparations, *Plants*, 8, 55.
- Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., & Steenkamp, P. (2010). Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*, 119(2), 684–688.
- Karik, U., Cinar, O., Tuncturk, M., Sekeroglu, N., Gezici, S., (2018) Essential Oil Composition of Some Sage (*Salvia* spp.) Species Cultivated in İzmir (Turkey) Ecological Conditions. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 52 (4), 102-107.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.
- Kenjeric, D., Mandić, M. L., Primorac, L., & Čačić, F. (2008). Flavonoid pattern of sage (*Salvia officinalis* L.) unifloral honey. *Food Chemistry*, 110(1), 187–192.
- Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., ... 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(1), 120–129.
- Leontaritou, P., Lamari, F. N., Papatirooulos, V., & Iatrou, G. (2020). Morphological, genetic and essential oil variation of Greek sage (*Salvia fruticosa* Mill.) populations from Greece. *Industrial Crops and Products*, 150, 112346.
- Li, B., Zhang, C., Peng, L., Liang, Z., Yan, X., Zhu, Y., & Liu, Y. (2015). Comparison of essential oil composition and phenolic acid content of selected *Salvia* species measured by GC–MS and HPLC methods. *Industrial Crops and Products*, 69, 329–334.
- Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669–4674.

Nickavar B., Kamalinejad M., Izadpanah H., (2007), In vitro free radical scavenging activity of five Salvia species, Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 20(4), 291-294.

Nikolova, M., & Aneva, I. (2017). European Species of Genus Salvia: Distribution, Chemodiversity and Biological Activity. Salvia Biotechnology, 1–30.

Nikolova, M. T., Grayer, R. J., Genova, E., & Porter, E. A. (2006). Exudate flavonoids from Bulgarian species of Salvia. Biochemical Systematics and Ecology, 34(4), 360–364.

Mocan, A., Babota, M., Pop, A., Fizeşan, I., Diuzheva, A., Locatelli, M., ... Crişan, G. (2020). Chemical Constituents and Biologic Activities of Sage Species: A Comparison between Salvia officinalis L., S. glutinosa L. and S. transsylvanica (Schur ex Griseb. & Schenk) Schur. Antioxidants, 9(6), 480.

Moss L, Rouse M, Wesnes KA, Moss M. (2010) Differential effects of the aromas of Salvia species on memory and mood. Hum Psychopharmacol. 25(5):388-396.

Nikolova, M. T., Grayer, R. J., Genova, E., & Porter, E. A. (2006). Exudate flavonoids from Bulgarian species of Salvia. Biochemical Systematics and Ecology, 34(4), 360–364.

Papageorgiou, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou, M., & Komaitis, M. (2008). Variation of the Chemical Profile and Antioxidant Behavior of Rosmarinus officinalis L. and Salvia fruticosa Miller Grown in Greece. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(16), 7254–7264.

Petrovska, B. (2012). *Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy Reviews, 6(11), 1.*

Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Überegger, E., & Conte, L. S. (2002). Antioxidant activity of sage (Salvia officinalis and S. fruticosa) and oregano (Origanum onites and O. onites) extracts related to their phenolic compound content. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82(14), 1645–1651.

- Porte A, Godoy RLO, Maia-Porte LH. (2013) Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *The Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 15(3):438-441.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.
- Reuter J, Jocher A, Hornstein S, Mönting JS, Schempp CM. (2007) Sage extract rich in phenolic diterpenes inhibits ultraviolet-induced erythema in vivo. *Planta Med*. 73(11):1190-1191.
- Riccobono, L., Maggio, A., Rosselli, S., Ilardi, V., Senatore, F., & Bruno, M. (2015). Chemical composition of volatile and fixed oils from of *Salvia argentea* L. (Lamiaceae) growing wild in Sicily. *Natural Product Research*, 30(1), 25–34.
- Rivera, D., Obon, C., & Cano, F. (1994). The Botany, History and Traditional Uses of Three-Lobed Sage (*Salvia fruticosa* Miller) (Labiatae). *Economic Botany*, 48(2)
- Sakihama Y., Cohen M., Grace S.C., Yamasaki H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, 67-80.
- Salah, K. B. H., Mahjoub, M. A., Ammar, S., Michel, L., Millet-Clerc, J., Chaumont, J. P., Aouni, M. (2006). Antimicrobial and antioxidant activities of the methanolic extracts of three *Salvia* species from Tunisia. *Natural Product Research*, 20(12), 1110–1120.
- Santos-Gomes, P. C., & Fernandes-Ferreira, M. (2001). Organ- and Season-Dependent Variation in the Essential Oil Composition of *Salvia officinalis* L. Cultivated at Two Different Sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2908–2916.
- Sarrou, E., Martens, S., & Chatzopoulou, P. (2016). Metabolite profiling and antioxidative activity of Sage (*Salvia fruticosa* Mill.) under the influence of genotype and harvesting period. *Industrial Crops and Products*, 94, 240–250.

- Šavikin, K. P., Ristić, M. S., Zdunić, G. M., Stević, T., & Menković, N. R. (2008). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Salvia ringens* Sibth. et Sm. var. *baldacciana* Briq. *Journal of Essential Oil Research*, 20(4), 363–365.
- Schapowal A, Berger D, Klein P, Suter A. (2009), Echinacea/sage or chlorhexidine/lidocaine for treating acute sore throats: a randomized double-blind trial. *Eur J Med Res*.14(9):406-412.
- Schoenmakers, P. (1990). Practical HPLC method development. *Journal of Chromatography A*, 509(2), 406–407.
- Skoula, M., Abbas, J. E., & Johnson, C. B. (2000). Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia fruticosa* mill growing in Crete. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(6), 551–561.
- Solomou, A. D., Martinos, K., Skoufogianni, E., & Danalatos, N. G. (2016), Medicinal and aromatic plants diversity in Greece and their future prospects: A review, *Agricultural Science*, 4(1), 9-21.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3), 333–340.
- Topçu, G. (2006). *Bioactive Triterpenoids from Salvia Species*. *Journal of Natural Products*, 69(3), 482–487.
- Tosun, A., Khan, S., Kim, Y., Calín-Sánchez, A., Hysenaj, X., & Carbonell-Barrachina, A. (2014). Essential Oil Composition and Anti-Inflammatory Activity of *Salvia officinalis* L (Lamiaceae) in Murin Macrophages. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(6), 937.
- Tzakou, O., Pitarokili, D., Chinou, I. B., & Harvala, C. (2001). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Salvia ringens*. *Planta Medica*, 67(1), 81–83.
- United States Food and Drug Administration (FDA). (2010) 21 CFR Part 582.10. Substances Generally Recognized as Safe. Washington, DC: National Archives and Records Administration.

Velickovic D., Ristic M., Milosavljevic N.P., Davidovic D.N., Bogdanovic S.Z. (2014). Chemical Composition of the Essential Oil of *Salvia argentea* L. *Agro FOOD Industry Hi Tech.* 25(6):70-72.

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(12), 4869–4873.

Wichtl M, ed. Brinckmann JA, Lindenmaier MP. (2004) *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. 3rd ed. Stuttgart: Medpharm GmbH Scientific Publishers.

Woodward M, (1994) *Gerard's Herbal: The History of Plants*. London: Senate.

Zgheib, R., Yassine, C., Azzi-Achkhouty, S., & Beyrouthy, M. E. (2019). Investigation of Essential Oil Chemical Polymorphism of *Salvia fruticosa* naturally Growing in Lebanon. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(2), 408–430.