

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

VAIDA ŠULNIŪTĖ

**ĮVAIRIŲ *SALVIA GENTIES* AUGALŲ RŪŠIŲ EKSTRAKTŲ
FITOCHEMINĖ SUDĖTIS IR ANTIOKSIDACINĖS SAVYBĖS**

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, chemija (03P)

2017, Kaunas

Disertacija rengta 2013–2017 metais Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakultete Maisto mokslo ir technologijos katedroje. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Petras Rimantas VENSKUTONIS (Kauno technologijos universitetas, Fiziniai mokslai, chemija, 03P).

Redagavo: Aurelija Gražina Rukšaitė (Leidykla „Technologija“)

Chemijos krypties disertacijos gynimo taryba:

Prof. dr. Daiva LESKAUSKAITĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T) – **pirmininkė**;

Prof. dr. Vytas MARTYNAITIS (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija, 03P);

Prof. habil. dr. Audrius Sigitas MARUŠKA (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, chemija, 03P);

Prof. habil. dr. Vytautas MICKEVIČIUS (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija, 03P);

Dr. Thierry TALOU (Nacionalinis Tulūzos politechnikos institutas, fiziniai mokslai, chemija, 03P).

Disertacija bus ginama viešame chemijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2017 m. rugsėjo 14 d. 11:00 val. Kauno technologijos universiteto Centrinė rūmų Disertacijų gynimo salėje.

Adresas: K. Donelaičio g. 73-403, 44249 Kaunas, Lietuva.

Tel. (370) 37 300 042; faks. (370) 37 324 144; el. paštas doktorantura@ktu.lt.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2017 m. rugpjūčio 14 d.

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

SIMBOLIAI IR SANTRUMPOS

AA	Antioksidacinis aktyvumas
ABTS ⁺	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvasis radikalas
BFJK	Bendras fenolinių junginių kiekis
DC	Dujų chromatografija
DC-LJD	Dujų chromatografija su liepsnos jonizacijos detektoriumi
DC/MS	Dujų chromatografija / masių spektrometrija
DMD	Diodų matricos detektorius
DPPH [•]	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas
ESCh	Efektviosios skysčių chromatografijos metodas
ESCh-DPPH [•]	Efektviosios skysčių chromatografijos DPPH pokolonėlinės reakcijos / detekcijos metodas
ETPS	Ekstrakcija tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje
FD	Fluorescencinis detektorius
GRE	Galo rūgšties ekvivalentai
KI	<i>Kováts</i> sulaikymo indeksas
LOD	Aptikimo riba
LOQ	Kiekybinio įvertinimo riba
L-N	Likenso-Nickersono
SAm-C	<i>S. amplexicaulis</i> CO ₂ ekstraktas
SAm-E	<i>S. amplexicaulis</i> etanolinis ekstraktas
SAm-W	<i>S. amplexicaulis</i> vandeninis ekstraktas
SAu-C	<i>S. austriaca</i> CO ₂ ekstraktas
SAu-E	<i>S. austriaca</i> etanolinis ekstraktas
SAu-W	<i>S. austriaca</i> vandeninis ekstraktas
SF-C	<i>S. forsskaolii</i> CO ₂ ekstraktas
SF-E	<i>S. forsskaolii</i> etanolinis ekstraktas
SF-W	<i>S. forsskaolii</i> vandeninis ekstraktas
SG-C	<i>S. glutinosa</i> CO ₂ ekstraktas
SG-E	<i>S. glutinosa</i> etanolinis ekstraktas
SG-W	<i>S. glutinosa</i> vandeninis ekstraktas
SKE-CO ₂	Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu
SM	Sausa medžiaga
SN-C	<i>S. nemorosa</i> CO ₂ ekstraktas
SN-E	<i>S. nemorosa</i> etanolinis ekstraktas
SN-W	<i>S. nemorosa</i> vandeninis ekstraktas
SO-C	<i>S. officinalis</i> CO ₂ ekstraktas
SO-E	<i>S. officinalis</i> etanolinis ekstraktas
SO-W	<i>S. officinalis</i> vandeninis ekstraktas
SP-C	<i>S. pratensis</i> CO ₂ ekstraktas

SP-E	<i>S. pratensis</i> etanolinis ekstraktas
SP-W	<i>S. pratensis</i> vandeninis ekstraktas
SSc-C	<i>S. sclarea</i> CO ₂ ekstraktas
SSc-E	<i>S. sclarea</i> etanolinis ekstraktas
SSc-W	<i>S. sclarea</i> vandeninis ekstraktas
SSt-C	<i>S. stepposa</i> CO ₂ ekstraktas
SSt-E	<i>S. stepposa</i> etanolinis ekstraktas
SSt-W	<i>S. stepposa</i> vandeninis ekstraktas
StN	Standartinis nuokrypis
SV-C	<i>S. verticillata</i> CO ₂ ekstraktas
SV-E	<i>S. verticillata</i> etanolinis ekstraktas
SV-W	<i>S. verticillata</i> vandeninis ekstraktas
TE	Trolokso ekvivalentas
ORAC	Degūnės radikalų sujungimo geba
RSG	Radikalų sujungimo geba
QUENCHER	Antioksidacinio aktyvumo nustatymo sausoje medžiagoje metodika
UESCh-TQ-S	Ultraefektyvioji skysčių chromatografija su trijų kvadrupolių masių spektrometru
UESCh-Q/TOF	Ultraefektyvioji skysčių chromatografija su kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru

1. ĮVADAS

Augalų karalija yra vienas iš svarbiausių natūralių antioksidantų ir kitų vertingų biologiškai veiklių medžiagų, kurias galima pritaikyti kaip sveikatai naudingus ingredientus funkciniais maisto produktams ar papildams kurti, šaltinis. Šiuo metu daugiau nei 25 proc. išrašomų farmacinių vaistų visame pasaulyje yra augalinės kilmės. „Natūralumas“ tapo vienu iš svarbiausių veiksnių vertinant pagal tai, kam vartotojai teikia pirmenybę, rinkdamiesi įvairius žmonėms vartoti skirtus produktus. Todėl nuolat didėja susidomėjimas sistemingesniu ir visapusišku mažiau ištirtų augalų rūšių charakterizavimu. Tokie tyrimai yra labai reikalingi kuriant naujus natūralius preparatus, kurie galėtų suteikti maisto produktams įvairiapusę naudą, t. y. sustiprinti sveikatai teikiamą naudą ir suteikti antioksidacinę bei antimikrobinę apsaugą; pastaruoju metu juos galima laikyti perspektyviomis alternatyvomis šiuo metu plačiai vartojamiems sintetiniams maisto papildams, tokiems kaip butilintas hidroksitoluenas (BHT), butilintas hidroksianizolis (BHA), benzoatai ir kiti, kurių vartotojai vis dažniau atsisako, nerimaudami dėl jų saugos.

Daugybės atliktų tyrimų metu įrodyta, kad maisto produktuose esantys antioksidantai gali apsaugoti žmogaus organizmo ląsteles nuo neigiamo ir per didelio laisvųjų radikalų kiekio poveikio, kuris yra siejamas su daugelio lėtinių ligų išsivystymu; o, esant maisto produktuose tokioms sudedamosioms dalims, gali sulėtėti lipidų oksidacija. Lipidų oksidacija maisto produktuose sumažina jų jutimo kokybę ir maistinę vertę. Todėl natūralių antioksidantų vartojimas kuriant naujus maisto produktus yra laikomas perspektyvia priemone, kuri gali pailginti jų tinkamumo vartoti laiką, sumažinti atliekų kiekį ir nuostolius mitybos atžvilgiu. Visi minėtieji veiksniai skatina naujų, vertingų ir pritaikomų natūralių medžiagų, įskaitant maisto produktų sudėtyje esančius antioksidantus, ir šaltinių paiešką.

Lūpažiedžių (lot. *Lamiaceae*) šeimos žolelės yra vienos iš populiariausių aromatinių, vaistinių ir prieskoninių augalų, daugelis jų yra plačiai ištirtos, ir nurodoma, kad juose susikaupia didelis eterinių aliejų, stiprių fenolinių antioksidantų ir kitų vertingų sudedamųjų dalių kiekis. Todėl kai kurios šalavijo (lot. *Salvia*) rūšys plačiai naudojamos kosmetikos, parfumerijos ir maisto pramonėje. Vaistinis šalavijas (lot. *S. officinalis*) ir kvapusis šalavijas (lot. *S. sclarea*) yra nuodugniausiai ištirtos *Salvia* rūšys, o štai informacijos apie daugelį kitų *Salvia* rūšių yra gana mažai. Norint užpildyti šią spragą, pasirinkta 10 skirtingų šalavijo rūšių: *S. amplexicaulis*, *S. austriaca*, *S. forsskaolii*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, *S. officinalis*, *S. pratensis*, *S. sclarea*, *S. stepposa* ir *S. verticillata*.

Siekiant išgauti vertingų junginių iš 10 skirtingų šalavijo rūšių, buvo naudojami įvairūs ekstrakcijos metodai ir skirtingo poliškumo tirpikliai. Nuosekliai naudojant skirtingus metodus, galima pasiekti geriausių rezultatų. Šio tyrimo metu taip pat įvertintos antioksidacinės savybės, fenolinių ir lakiųjų

junginių sudėtis, siekiant panaudoti šalavijo rūšis kaip papildomas žaliavas, išgaunant ingredientus funkcionaliajam maistui kurti.

Darbo tikslas

Pagrindinis šio darbo tikslas – išsamiai ištirti *Salvia* genties augalų rūšių fenolinių ir lakiųjų junginių sudėtį ir antioksidacines savybes, jiems išskirti naudojant skirtingus metodus ir skirtingo poliškumo tirpiklius bei pagal gautus rezultatus teoriškai įvertinti šalavijo panaudojimo galimybes kuriant funkcionaliuosius sveikatai naudingus ingredientus.

Darbo tikslui pasiekti buvo sprendžiami šie uždaviniai:

1. Nustatyti skirtingų ekstrakcijos metodų ir tirpiklių įtaką tirpių frakcijų išskyrimui iš 10 pasirinktų *Salvia* rūšių, įvertinant gautų ekstraktų išeigas.
2. Įvertinti tirpių frakcijų, gautų skirtingais metodais iš 10 *Salvia* rūšių, antioksidacinį potencialą, taikant įvairius *in vitro* antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodus.
3. Nustatyti fenolinių junginių sudėtį tirpiose frakcijose, gautose iš 10 *Salvia* rūšių, naudojant chromatografijos ir masių spektrometrijos metodus.
4. Nustatyti *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktuose esančių fenolinių junginių kiekį, priklausomai nuo ekstrakcijos metu naudoto tirpiklio, ir įvertinti šalavijo rūšių panaudojimo galimybes išgaunant vertingus natūralius junginius.
5. Nustatyti *Salvia* lipofiliniuose superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginio (SKE-CO₂) metodu pagamintuose ekstraktuose esančių tokoferolių sudėtį ir koncentracijas.
6. Nustatyti lakiųjų junginių sudėtį skirtingose *Salvia* rūšyse, lakiesiems junginiams išskirti taikant distiliacijos / ekstrakcijos ir SKE-CO₂ metodus.
7. Remiantis gautais eksperimentiniais rezultatais, teoriškai įvertinti *Salvia* ekstraktų potencialą kuriant funkcionaliuosius sveikatai naudingus ingredientus.

Mokslinio darbo naujumas

1. Sistemingi *Salvia* genties augalų rūšių antioksidacinių savybių tyrimai ir bendras fenolinių junginių kiekio (BFJK) įvertinimas, priklausomai nuo ekstrakcijos metodo, buvo atlikti pirmą kartą.
2. Daugumos pasirinktų *Salvia* rūšių augalų fitocheminė sudėtis anksčiau nebuvo nustatyta. Tikrai *S. officinalis* ir *S. sclarea* buvo tirti plačiai, jie į mokslinius tyrimus taip pat įtraukti palyginimo tikslais.
3. Darbe taip pat taikytas visapusiškas ir kompleksinis *Salvia* genties augalų rūšių frakcionavimo metodas (išskyrimas į skirtingo poliškumo frakcijas, naudojant aplinkai draugiškus tirpiklius, nustatant fenolinių junginių kiekį tiek ekstraktuose, tiek pradinėje augalinėje žaliavoje): toks metodas nebuvo taikomas nė vienai šalavijo rūšiai, įskaitant ir nuodugniausiai ištyrinėtas *Salvia* rūšis: *S.*

officinalis ir *S. sclarea*. Be to, ši koncepcija yra gana menkai taikoma tiriant ir kitus augalus.

4. Kai kurie junginiai (etil galatas, 3',4',5,7-tetraksidroksi-3-metoksiflavonas, hiperozidas ir isoramnetin-gliukozidas) *Salvia* genties augalų rūšyse nustatyti pirmą kartą.

5. Daugumos pasirinktų *Salvia* rūšių augalų lapiųjų junginių sudėtis anksčiau nebuvo nustatyta. Tik tai *S. officinalis* buvo tirtas plačiai. Ši šalavijo rūšis į mūsų tyrimus taip pat įtraukta palyginimo tikslais.

Praktinė darbo vertė

Nustatyta, kad etanoliniuose *S. officinalis*, *S. sclarea*, *S. amplexicaulis*, *S. verticillata*, *S. nemorosa*, *S. forsskaolii* ir *S. pratensis* ekstraktuose yra gausu biologiškai veiklių junginių; šie rezultatai yra praktiškai svarbūs toliau naudojant augalų ekstraktus, kaip natūralių antioksidantų šaltinį, maisto pramonėje, siekiant papildyti maisto produktus biologiškai veikliais junginiais. Skirtingais ekstrakcijos metodais išgautų *S. amplexicaulis*, *S. austriaca*, *S. forsskaolii*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, *S. officinalis*, *S. pratensis*, *S. sclarea*, *S. stepposa* ir *S. verticillata* ekstraktų chromatografinių tyrimų duomenys suteikia svarbios informacijos apie jų fitocheminės sudėties įvairovę. Ši informacija galėtų būti naudinga pramonei atrenkant perspektyviausias šalavijo rūšis ir tirpiklį didžiausiai biologiškai veiklių junginių išėigai gauti.

Disertacijos struktūra

Disertacija yra parašyta anglų kalba. Ją sudaro santrumpų sąrašas, įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų objektai ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, naudotos literatūros sąrašas (231 šaltiniai), disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas. Pagrindinė disertacijos medžiaga išdėstyta 98 puslapiuose, kur pateikta 9 lentelės ir 18 paveikslų.

Darbo rezultatų publikavimas

Disertacijos tema paskelbti 3 straipsniai Clarivate Analytics (buv. Thomson Reuters) WOS pagrindinio sąrašo leidiniuose. Darbo rezultatai pristatyti 5 tarptautinėse konferencijose.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

1. Pakopinė *Salvia* rūšių augalinės žaliavos ekstrakcija superkritiniu CO₂ ir skirtingo poliškumo tirpikliais padidintame slėgyje sudaro sąlygas išskirti vertingas biologiškai veiklių junginių frakcijas, pasižyminčias stipriomis antioksidacinėmis savybėmis.

2. Nepakankamai ištirtos *Salvia* genties augalų rūšys, tokios kaip *S. amplexicaulis*, *S. verticillata*, *S. nemorosa*, *S. forsskaolii* ir *S. pratensis*, yra perspektyvi žaliava išgaunant vertingus natūralius junginius.

3. *Salvia* augalų rūšių lakiųjų junginių sudėtis, jiems išskirti taikant distiliacijos / ekstrakcijos bei SKE-CO₂ metodus, smarkiai skiriasi.

2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

2.1. Tyrimų objektai

Tyrimams atlikti pasirinktas daugiamejis žolinis notrelinių (lot. *Lamiaceae*) šeimos augalas – šalavijas (lot. *Salvia*). Moksliniams tyrimams atlikti naudojama 10 šios genties augalų rūšių: *S. amplexicaulis*, *S. austriaca*, *S. forsskaolii*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, *S. officinalis*, *S. pratensis*, *S. sclarea*, *S. stepposa* ir *S. verticillata* (**1 pav.**). Tyrimams skirti augalai išauginti Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodo vaistinių ir prieskoninių augalų kolekcijose 2013 metais. Žydėjimo pradžioje surinkta antžeminio augalo dalis atskirta nuo pašalinių priemaišų ir išdžiovinta.



S. officinalis

S. pratensis

S. sclarea

1 pav. Tyrimo objektų pavyzdžiai*

Prieš atliekant tyrimus augalai buvo susmulkinti rotoriniu smulkintuvu (8 000 aps./min), naudojant 0,5 mm akučių dydžio sietelį. Paruošti augalai laikomi sandariai uždarytuose stikliniuose induose, tamsiame, vėsiam ir sausame kambaryje.

2.2. Tyrimų metodai

Iškeltiems tikslams pasiekti buvo pritaikyti aplinkai draugiški veikliųjų medžiagų išskyrimo metodai: superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu (SKE-CO₂) ir pagreitinotos ekstrakcijos, naudojant didėjančio poliškumo tirpiklius, deriniai. Pirmiausia ekstrahavimas atliktas anglies dvideginiu, tada etanoliumi (96 proc.) ir galiausiai vandeniu. Ekstrahavimas anglies dvideginiu atliktas siekiant pašalinti lipofilinius junginius.

Kiekvieno gauto ekstrakto savybės įvertintos taikant įvairius *in vitro* antioksidacinio aktyvumo (AA) tyrimų metodus. Norint atlikti išsamų medžiagos antioksidacinių savybių įvertinimą, būtina remtis keliais metodais. Antioksidantų

* Fotografijų autorinės teisės priklauso Vilniaus universiteto Botanikos sodui.

veikimas gali pasireikšti šiais mechanizmais: vandenilio atomo atidavimu (radikalų sujungimo mechanizmas) arba elektrono perkėlimu (radikalo redukcija). Kelių AA metodų taikymas padeda geriau įvertinti šiuos mechanizmus, ir taip galime tiksliai nustatyti, kokiomis specifinėmis savybėmis pasižymi tiriamasis mėginys. Atliekant tyrimą buvo taikyti trys metodai: deguonies radikalų sujungimo gebos nustatymas (ORAC arba L-ORAC (lipofiliniams junginiams)), bendro fenolinių junginių kiekio (BFJK) nustatymas ir vienas radikalų sujungimo gebos nustatymo metodas (ABTS^{•+}). AA įvertinti tai pat taikyta nauja QUENCHER procedūra, kai antioksidacinės savybės matuojamos ne ekstrakto, o pradinėje žaliavoje bei ekstrakcijų liekanose – tokiu pat būdu įvertinti ir nesiekstrahuojantys junginiai. Visų šių metodų panaudojimas leidžia labai išsamiai įvertinti *Salvia* genties augalų rūšių antioksidacines savybes.

Pasirinktų augalų fitocheminės sudėties analizei atlikti bei pagrindiniams jų junginiams identifikuoti naudojami šiuolaikiški chromatografijos ir masių spektrometrijos metodai. Tokoferoliai identifikuoti efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) metodu, atitinkamai su diodų matricos (DMD) ir fluorescencijos (FD) detektoriais. Fenoliniai junginiai *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktuose nustatyti taikant ultraefektyviąją skysčių chromatografiją su kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (UESCh-Q/TOF). Taikant ultraefektyviąją skysčių chromatografiją su trijų kvadrupolių masių spektrometru (UESCh-TQ-S) pagal standartines kalibracines kreives nustatyta fenolinių junginių sudėtis. Apskaičiuota minimali kiekybinio įvertinimo riba (LOQ) ir minimali aptikimo riba (LOD). Gauti koreliacijos koeficientai įrodo, kad šis metodas yra tikslus ir tinkamas kiekybiniam įvertinimui atlikti. Atskirų fenolinių junginių antiradikalinės savybės įvertintos taikant kombinuotąjį ESCh-DPPH[•] metodą.

Salvia genties augalų rūšių lakieji junginiai išskirti Likenso-Nickersono distiliacijos / ekstrakcijos metodu. Jų sudėtis tirta dujų chromatografijos (DC) metodu, liepsnos jonizacijos (LJD) ir masių spektrometrijos (MS) detektoriais. Junginiai identifikuoti apskaičiuojant jų *Kováts* (KI) sulaikymo indeksus (pagal C₇–C₃₀ alkanų standartinių mišinių), gautus su nepoline Elite-5 kolonėle ir palyginus su publikuotais literatūroje (Adams, 2009), taip pat palyginus gautus masių spektrus su spektrais, esančiais NIST, MAINLIB, REPLIB ir ADAMS masių spektrų bibliotekose. Junginiai identifikuoti tik esant KI ir MS suderinamumui.

Visi eksperimentiniai matavimai atlikti bent tris kartus ir prie rezultatų pateikiamas šių matavimų vidurkis kartu su standartiniu nuokrypiu (StN). Vidurkiai ir reikšmingi skirtumai tarp jų įvertinti statistine programa *Statgraphics*. Koreliacijos koeficientai nustatyti ir kiti papildomi skaičiavimai atlikti *MS Excel* programa.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Lipofilinių ir hidrofilinių frakcijų išskyrimas iš 10 skirtingų *Salvia* genties augalų rūšių, taikant aukšto slėgio ekstrakcijos metodus, ir išsamus jų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas *in vitro* modelinėse sistemose

3.1.1. *Salvia* genties augalų rūšių ekstrakcija

Salvia genties augalų ekstraktai išskirti žaliavą nuosekliai ekstrahuojant didėjančio poliškumo aplinkai nekenksmingais tirpikliais. Pirmiausia ekstrahavimas atliktas SKE-CO₂, tada etanoliumi (96 proc.) ir galiausiai vandeniu. Nustatyta, kad visų tirtų augalo rūšių ekstraktų išeiga priklauso nuo ekstrakcijai atlikti pasirinkto tirpiklio. Didžiausios išeigos buvo gautos ekstrahuojant vandeniu – vidutiniškai 30,2–43,7 proc. (**1 lent.**). Etanolinių ir SKE-CO₂ išgautų ekstraktų išeigos buvo mažesnės, atitinkamai: etanolinių – 18,1–36,2 proc., SKE-CO₂ – 1,8–5,2 proc. Ekstrahavimas SKE-CO₂ atliktas siekiant pašalinti lipofilinius junginius.

Ekstraktai, gauti naudojant CO₂, etanolio ir vandens tirpiklius, atitinkamai žymimi prie šalavijo rūšies pirmųjų raidžių pridėdant naudotino tirpiklio pirmą raidę: *S. amplexicaulis* Lam. (SAm-C, E, W), *S. austriaca* L. (SAu-C, E, W), *S. forskaolii* L. (SF-C, E, W), *S. glutinosa* L. (SG-C, E, W), *S. nemorosa* L. (SN-C, E, W), *S. officinalis* L. (SO-C, E, W), *S. pratensis* L. (SP-C, E, W), *S. sclarea* L. (SSc-C, E, W), *S. stepposa* Des-Shost. (SSt-C, E, W), *S. verticillata* L. (SV-C, E, W).

3.1.2. Įvairių *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas skirtingose *in vitro* modelinėse sistemose

Visapusiškam tirtų augalų antioksidacinio aktyvumui įvertinti taikyti skirtingi antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodai. Antioksidacinis aktyvumas išreikštas tiek sauso ekstrakto masei, tiek sausos žaliavos medžiagos masei. Abu šie parametrai suteikia vertingos informacijos interpretuojant gautus duomenis. Vieni ekstraktai gali pasižymėti stipriomis antioksidacinio aktyvumo (AA) savybėmis, o jų išgaunamas kiekis gali būti nedidelis. Gali būti priešingai – kai ekstrakto aktyvumas yra mažas, o ekstrakto išeiga – didelė. AA matavimų rezultatai pateikti **1 lent.**

Tiriamųjų ekstraktų antioksidacinė galia priklauso nuo fitocheminės jų sudėties – kiekio ir struktūros, ypač polifenolinių junginių, iš kurių svarbiausi flavonoidai ir fenolinės rūgštys. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) tiriamuosiuose ekstraktuose svyravo plačiu intervalu – nuo 0,48±0,03 iki 43,65±0,67 mg GRE/g SM. Didesniu BFJK pasižymėjo etanoliniai ekstraktai (19,26±0,10–43,65±0,67 mg GRE/g SM), palyginti su vandeniniais (0,48±0,03–7,17±0,07 mg GRE/g SM). Etanoliumi išskirti ekstraktai galėtų būti geri natūralių antioksidantų šaltiniai.

AA pasiskirstymas ekstraktuose išliko panašus toliau tiriant skirtingas šalavijo rūšis ABTS^{•+} ir ORAC metodais. ABTS^{•+} modelinėje sistemoje etanolinių ekstraktų AA svyravo nuo 684±5 iki 1742±2 μmol TE/g ekstrakto ir atitinkamai nuo 201±2 iki 515±1 μmol TE/g SM. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo etanoliniai *S. verticillata* ir *S. sclarea* ekstraktai, kurių vertės atitinkamai buvo 1742±2 ir 1634±22 μmol TE/g ekstrakto. Matuojant ORAC vertes tarp ekstraktų, išgautų skirtingais tirpikliais, didesniu deguonies radikalų sujungimo aktyvumu pasižymėjo etanoliniai šalavijo ekstraktai (iki 4735±114 μmol TE/g ekstrakto ir atitinkamai 1208±29 μmol TE/g SM), palyginti su vandeniniais (iki 1339±83 μmol TE/g ekstrakto ir atitinkamai 485±30 μmol TE/g SM). Nustatyta L-ORAC lipofiliniams ekstraktams, kurių vertės svyravo nuo 570±23 iki 6015±11 μmol TE/g ekstrakto ir atitinkamai nuo 29,75±1,18 iki 224±1 μmol TE/g SM. Didžiausiomis L-ORAC vertėmis atitinkamai pasižymėjo *S. officinalis*, mažiausiomis – *S. sclarea*.

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

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

Bandiniai	Išėiga, proc.	ABTS ⁺ , μmol TE/g		ORAC, μmol TE/g		BFJK, mg GRE/g	
		Sauso ekstrakto	Sausos medžiagos	Sauso ekstrakto	Sausos medžiagos	Sauso ekstrakto	Sausos medžiagos
SAm-E	25,5±0,1 ^d	1177±7 ^f	300±2 ^e	4735±114 ^e	1208±29 ^e	97,41±0,79 ^c	24,85±0,20 ^d
SAm-W	32,4±0,1 ^c	79,52±0,52 ^d	25,77±0,18 ^b	676±2 ^{cd}	219±9 ^c	5,92±0,14 ^e	1,92±0,05 ^c
SAu-E	29,4±0,1 ^f	684±5 ^a	201±2 ^a	2009±196 ^a	591±58 ^b	72,57±0,97 ^a	21,35±0,02 ^c
SAu-W	40,7±0,1 ^f	85,04±1,43 ^c	34,62±0,58 ^d	482±33 ^b	196±13,4 ^c	4,23±0,40 ^d	1,72±0,16 ^d
SF-E	30,4±0,1 ^g	1135±9 ^e	345±3 ^g	4508±126 ^c	1370±38 ^f	116±1 ^g	35,19±0,17 ^h
SF-W	36,2±0,1 ^d	328±3 ⁱ	119±1 ⁱ	1339±83 ^g	485±30 ^g	19,80±0,19 ^j	7,17±0,07 ^j
SG-E	26,1±0,1 ^e	1072±10 ^d	279±3 ^d	1758±118 ^a	457±31 ^a	106±1 ^e	27,72±0,27 ^e
SG-W	31,0±0,1 ^b	246±2 ^h	76,26±0,64 ^g	897±33 ^e	278±10 ^d	16,86±0,16 ^h	5,23±0,05 ⁱ
SN-E	30,7±0,2 ^g	1005±2 ^c	308±1 ^f	2392±151 ^b	733±46 ^c	109±1 ^f	33,33±0,17 ^g
SN-W	43,7±0,1 ^h	150±0 ^f	65,57±0,13 ^f	718±14 ^d	313±6 ^c	7,60±0,25 ^f	3,32±0,11 ^g
SO-E	36,2±0,1 ^h	1080±10 ^d	391±4 ^h	2535±180 ^b	917±66 ^d	121±2 ^h	43,65±0,67 ⁱ
SO-W	37,7±0,1 ^e	225±1 ^g	84,98±0,29 ^h	1143±69 ^f	431±26 ^f	13,15±0,19 ^g	4,96±0,07 ^h
SP-E	25,0±0,1 ^c	973±11 ^b	243±3 ^b	1783±85 ^a	446±21 ^a	85,84±0,63 ^b	21,46±0,16 ^c
SP-W	42,5±0,2 ^g	38,85±1,71 ^a	16,52±0,73 ^a	279±23 ^a	118±10 ^b	1,12±0,07 ^a	0,48±0,03 ^a
SSc-E	18,1±0,1 ^a	1634±22 ^h	296±4 ^e	3820±193 ^c	692±35 ^c	106±1 ^e	19,26±0,10 ^a
SSc-W	30,2±0,2 ^a	153±1 ^f	46,15±0,42 ^c	867±16 ^c	262±5 ^d	7,59±0,13 ^f	2,29±0,04 ^f
SSt-E	19,6±0,2 ^b	1392±14 ^g	273±3 ^c	2480±145 ^b	487±28 ^a	103±2 ^d	20,28±0,40 ^b
SSt-W	30,2±0,2 ^a	51,82±1,38 ^b	15,63±0,42 ^a	279±30 ^a	84,13±9,03 ^a	2,13±0,09 ^b	0,64±0,03 ^b
SV-E	29,6±0,2 ^f	1742±2 ⁱ	515±1 ⁱ	4121±301 ^d	1218±89 ^c	106±1 ^e	31,35±0,44 ^f
SV-W	40,4±0,1 ^f	69,64±1,38 ^c	28,16±0,56 ^c	626±34 ^c	253±14 ^d	2,85±0,16 ^c	1,15±0,06 ^c

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± StN; a–j raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp ekstraktų, ekstrahuotų viename tirpiklyje, ir skirtingų šalavijo rūšių (ANOVA, $p < 0,05$).

3.1.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas QUENCHER procedūra

Kai kurie AA pasižymintys junginiai gali būti sujungti stipriais ryšiais su kitais augalo matricoje esančiais junginiais ar yra netirpūs. Paprastai tokie junginiai, naudojant tradicinę AA matavimų procedūrą, nesiekstrahuoja su organiniais tirpikliais ar vandeniu. Todėl prieš ekstrakciją ir po skirtingų ekstrakcijų etapų gautų liekanų AA buvo įvertintas įvairiais AA tyrimo metodais (BFJK, ABTS^{•+} ir ORAC), pritaikius QUENCHER procedūrą, kuri pagrįsta oksidacijos-redukcijos reakcija kietos ir skystos fazių paviršiuje. Kietosios frakcijos prieš ekstrakciją ir po skirtingų ekstrakcijų etapų AA pateiktas **2 lent.** Iš gautų rezultatų galime sužinoti, kurie ekstrakcijos procesai yra efektyviausi ekstrahuojant antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčius junginius ir kaip skiriasi šių junginių kiekis po kiekvieno taikyto ekstrakcijos etapo.

BFJK prieš ekstrakciją bandiniuose svyravo nuo 20,21±1,34 iki 72,84±1,73 mg GRE/g SM, priklausomai nuo šalavijo rūšies. Po SKE-CO₂, pašalinus lipofilinę frakciją, BFJK išliko panašus, kaip ir prieš ekstrakciją, ar net didesnis (26,22±0,75–67,77±0,88 mg GRE/g SM). Tokį pokytį galėjo lemti lipofiliškos frakcijos išgavimas, t. y. liekanose padidėjęs hidrofilios frakcijos kiekis. Toliau tęsiant ekstrakcijas etanolio ir vandeniu padidinto slėgio aplinkoje (ETPS) aukštoje temperatūroje (140 °C) ir išekstrahavus šiuose tirpikliuose tirpius junginius, BFJK liekanose svyravo nuo 1,14±0,02 iki 5,10±0,13 mg GRE/g SM, priklausomai nuo šalavijo rūšies. AA liekanose išliko panašus toliau tiriant skirtingas šalavijo rūšis ABTS^{•+} ir ORAC metodais. ABTS^{•+} modelinėje sistemoje šalavijo kietos fazės AA prieš ekstrakciją svyravo nuo 331±2 iki 879±7 μM TE/g SM, po SKE-CO₂ – 326±1–556±5 μM TE/g SM, o po ETPS – 32,61±0,39–51,56±1,16 μM TE/g SM. ORAC metodu tiriant skirtingas šalavijo rūšis, jo vertės prieš ekstrakciją, po SKE-CO₂ ir ETPS atitinkamai buvo: 418±28–1552±3; 324±17–1559±16 ir 33,12±2,42–52,14±0,30.

Taigi iš pateiktų duomenų matyti, kad didžiausiu AA pasižymėjo pradinė žaliava ir ekstrakcijų liekanos po SKE-CO₂ ekstrakcijos, kurios metu buvo pašalinta lipofilinė frakcija. Daugiapakopės pagreitintos ekstrakcijos taikymas po SKE-CO₂ likusiai kietajai frakcijai smarkiai sumažino AA pasižyminčių junginių kiekį ekstrakcijų liekanose. Tačiau ir po šio ETPS ekstrakcijos etapo liekanose liko nemažai AA pasižyminčių junginių. Tikriausiai todėl, kad dalis antioksidantų yra stipriai sujungti augalinėje matricoje ar yra netirpūs.

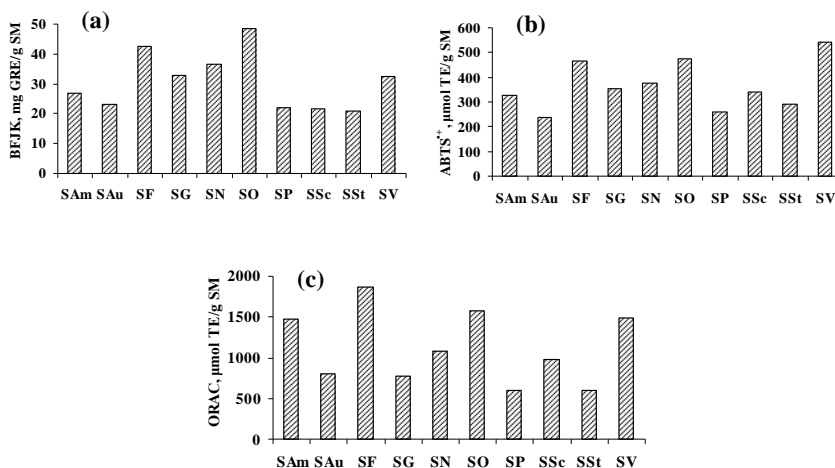
2 lentelė. BFJK ir antioksidacinis aktyvumas *Salvia* genties augalų rūšių kietojoje frakcijoje

Bandiniai	ABTS ⁺ , μmol TE/g SM			ORAC, μmol TE/g SM			BFJK, mg GRE/g SM		
	Pradinė žaliava	Liekana po SKE-CO ₂	Liekana po ETPS	Pradinė žaliava	Liekana po SKE-CO ₂	Liekana po ETPS	Pradinė žaliava	Liekana po SKE-CO ₂	Liekana po ETPS
SAm	444±12 ^{d,z}	326±1 ^{a,y}	32,99±0,23 ^{a,x}	1020±5 ^{e,z}	324±17 ^{a,y}	48,47±0,33 ^{e,x}	55,31±2,32 ^{e,z}	36,94±0,83 ^{bc,y}	2,40±0,16 ^{d,x}
SAu	334±3 ^{a,y}	370±10 ^{b,z}	36,77±0,66 ^{b,x}	605±11 ^{c,y}	965±14 ^{c,z}	47,77±3,30 ^{de,x}	20,21±1,34 ^{a,y}	52,51±1,57 ^{f,z}	2,73±0,15 ^{e,x}
SF	414±24 ^{c,y}	556±5 ^{g,z}	32,68±0,17 ^{a,x}	1173±7 ^{g,z}	1559±16 ^{g,y}	42,80±3,34 ^{c,x}	66,68±2,47 ^{g,y}	67,77±0,88 ^{h,y}	2,75±0,09 ^{e,x}
SG	333±1 ^{a,y}	440±10 ^{e,z}	37,15±0,77 ^{bc,x}	517±3 ^{b,y}	840±22 ^{b,z}	52,14±0,30 ^{e,x}	25,48±0,40 ^{b,y}	46,11±0,55 ^{d,z}	4,41±0,23 ^{g,x}
SN	374±18 ^{b,y}	480±7 ^{f,z}	32,82±0,06 ^{a,x}	854±16 ^{d,y}	1443±34 ^{d,z}	33,12±2,42 ^{a,x}	45,26±2,16 ^{d,z}	36,16±0,48 ^{b,y}	1,96±0,10 ^{c,x}
SO	335±25 ^{a,y}	331±9 ^{a,y}	51,56±1,16 ^{d,x}	817±40 ^{d,y}	1565±5 ^{g,z}	41,22±1,39 ^{bc,x}	53,87±1,93 ^{e,z}	49,44±0,84 ^{e,y}	5,10±0,13 ^{h,x}
SP	510±8 ^{e,z}	326±1 ^{a,y}	33,75±2,27 ^{a,x}	418±28 ^{a,y}	851±13 ^{b,z}	33,97±1,06 ^{a,x}	33,48±1,24 ^{c,y}	47,25±0,78 ^{d,z}	1,60±0,14 ^{b,x}
SSc	575±3 ^{f,z}	402±8 ^{c,y}	32,73±0,17 ^{a,x}	1050±38 ^{e,y}	1486±37 ^{ef,z}	36,90±0,26 ^{ab,x}	42,80±2,19 ^{d,z}	37,95±0,64 ^{c,y}	1,14±0,02 ^{a,x}
SSt	331±2 ^{a,y}	483±15 ^{f,z}	32,61±0,39 ^{a,x}	1535±47 ^{f,y}	1529±32 ^{fg,y}	37,42±0,19 ^{ab,x}	63,15±1,10 ^{f,z}	26,22±0,75 ^{a,y}	1,74±0,06 ^{b,x}
SV	879±7 ^{g,z}	419±12 ^{d,y}	38,47±0,13 ^{c,x}	1552±3 ^{f,y}	1535±13 ^{fg,y}	43,74±2,00 ^{cd,x}	72,84±1,73 ^{h,z}	62,94±0,95 ^{g,y}	3,46±0,09 ^{f,x}

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± StN; a–h raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų šalavijo rūšių (ANOVA, $p < 0,05$); x, y, z raidės prie skaičių stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų ekstrakcijos etapų (ANOVA, $p < 0,05$).

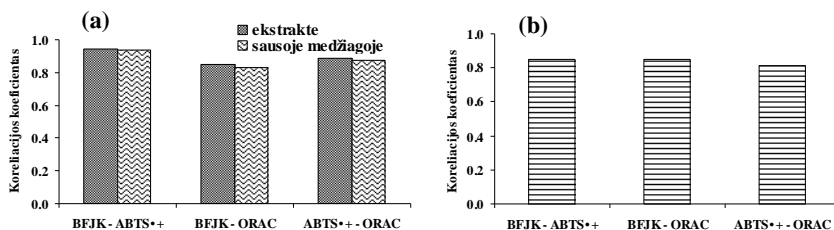
3.1.4. Bendras antioksidacinis aktyvumas ir gautų rezultatų koreliacija

Bendras visų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas yra pateiktas **2 pav.** Šios reikšmės buvo gautos sudėjus visų ekstraktų (gautų skirtingais tirpikliais) AA, nustatytą atitinkamu metodu. Akivaizdu, kad didžiausiu BFJK kiekiu pasižymėjo *S. forsskaolii* (42,36 mg GRE/g SM) ir *S. officinalis* (48,61 mg GRE/g SM) (**2 pav., a**). Kitų šalavijo rūšių BFJK svyravo nuo 20,93 to 36,65 mg GRE/g SM. *S. forsskaolii* ir *S. officinalis* taip pat pasižymėjo didele bendra RSG matuojant ABTS^{•+} metodu (**2 pav., b**). Jų vertės atitinkamai buvo 464 ir 476 μmol TE/g SM. Tačiau didžiausia bendra RSG pasižymėjo *S. verticillata* (543 μmol TE/g SM). RSG, matuojant ORAC metodu, svyravo nuo 597 iki 1872 μmol TE/g SM (**2 pav., c**). Didžiausia deguonies radikalų sujungimo geba pasižymėjo *S. forsskaolii* (1872 μmol TE/g SM), *S. officinalis* (1573 μmol TE/g SM) ir *S. verticillata* (1493 μmol TE/g SM) šalavijo rūšys. Visi šie gauti rezultatai puikiai parodo, kokios skirtingos yra įvairių šalavijo rūšių antioksidacinės savybės, kurios labiausiai priklauso nuo specifinių junginių ir nuo jų kiekio tiriamojoje mėginio matricijoje.



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

Šio eksperimento metu buvo taikomos trys pagrindinės AA nustatymo metodikos ir naudojami trys skirtingo poliškumo tirpikliai. Gautas didelis kiekis duomenų, todėl, norint maksimaliai išnaudoti AA tyrimų rezultatus, skirtingomis metodikomis gauti duomenys buvo palyginti tarpusavyje ir nustatyti jų koreliacijos koeficientai (**3 pav.**).



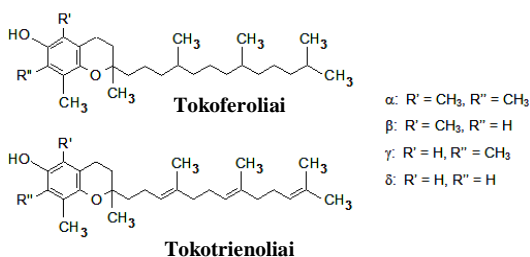
3 pav. Koreliacijos koeficientai tarp skirtingų antioksidacinio aktyvumo matavimo metodų, taikytų skirtingoms šalavijo rūšių frakcijų savybėms įvertinti: (a) – taikant tradicinę analizės procedūrą, (b) – taikant QUENCHER procedūrą

Pastebėtas stiprus koreliacinis ryšys tarp BFJK ir ekstraktų AA verčių: BFJK ir ABTS⁺, $R^2=0,942$; BFJK ir ORAC, $R^2=0,847$ bei ABTS⁺ ir ORAC, $R^2=0,884$. Kai antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas sausoje augalo masėje, koreliacinis ryšys išlieka taip pat stiprus (0,830–0,938). Galima teigti, kad BFJK gerai apibūdina skirtingų šalavijo rūšių ekstraktų *in vitro* antioksidacinį aktyvumą. Taikant QUENCHER procedūrą koreliacija yra šiek tiek silpnesnė, atitinkamai: BFJK ir ABTS⁺, $R^2=0,847$; BFJK ir ORAC, $R^2=0,852$, bei ABTS⁺ ir ORAC, $R^2=0,812$.

3.2. Skirtingų *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktų fitocheminės sudėties tyrimai, ekstraktų gamybos metu taikant aukšto slėgio ekstrakcijos metodus

3.2.1. Tokoferolių analizė ESCh metodu

Vitaminas E – riebaluose tirpių vitaminų grupė, susidedanti iš 8 narių: α , β , γ ir δ tokoferolių ir tokių pat tokotrienolių (**4 pav.**).



4 pav. Tokoferolių ir tokotrienolių cheminė struktūra

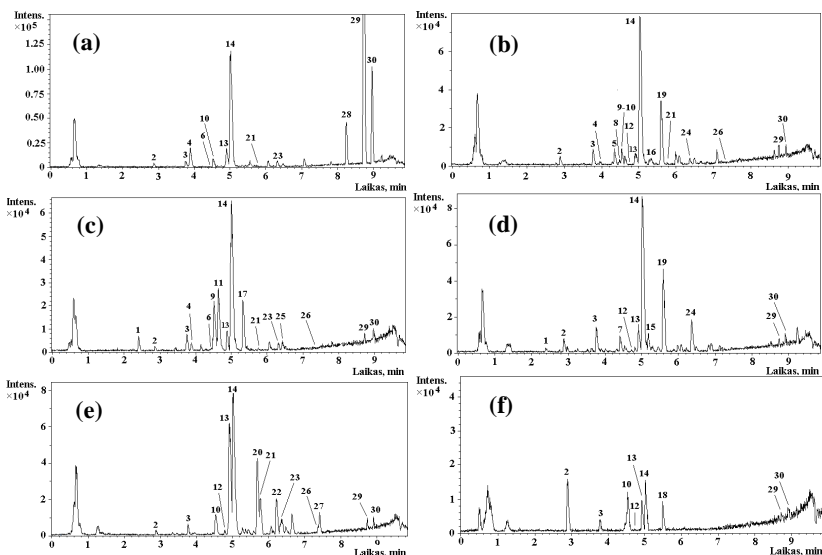
Atlikus tokoferolių analizę SKE-CO₂ ekstraktuose nustatyta, kad jų bendrasis kiekis tirtose įvairiose šalavijo rūšyse svyravo nuo 2360 iki 10071 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto ir nuo 52,64 iki 221 $\mu\text{g/g}$ SM. Didžiausias kiekis nustatytas α -tokoferolio. Jo koncentracija bandiniuose atitinkamai svyravo nuo 2242 iki 8473 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto ir nuo 50,01 iki 179 $\mu\text{g/g}$ SM. γ ir δ -tokoferolių koncentracija tirtuose

ekstraktuose buvo daug mažesnė, o β -tokoferolio tirtuose ekstraktuose visiškai nerasta.

Ivertinus gautus rezultatus galima teigti, kad tirtuose ekstraktuose yra gana nemažas vitamino E kiekis, o šis vitaminas gali veiksmingai apsaugoti ląstelių membranas nuo žalojančio laisvųjų radikalų, kurie susidaro lipidų peroksidacijos reakcijų metu, poveikio.

3.2.2. *Salvia genties* augalų rūšių ekstraktų sudėties tyrimai ir biologiškai veiklių junginių identifikavimas UESCh-Q/TOF metodu

Šalavijo ekstraktai buvo tirti efektyviosios skysčių chromatografijos sistemomis, naudojant UV ir MS detektorius bei pokolonėlinį DPPH radikalų sujungimo registravimo modulį. Tirtuose šalavijo ekstraktuose esantys fenoliniai junginiai buvo nustatyti UESCh-MS metodu, palyginus gautų junginių molekulinės mases, jų formules bei sulaikymo laikus su standartinių junginių spektriniais duomenimis. Kai junginių nepavyko identifikuoti pagal tyrimo metu naudotus standartus, papildomai buvo atliktas MS/MS fragmentavimas. Šie junginiai buvo identifikuoti preliminariai, lyginant gautus MS/MS fragmentus su literatūroje aprašytomis spektrinėmis charakteristikomis (**3 lent.**). Šalavijo ekstraktų UESCh-Q/TOF chromatogramos pateiktos **5 pav.**



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

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

Nr.	Junginys	Molekulinė formulė	ST, min	Molekulinė masė	MS fragmentai
				m/z, [M-H] ⁻	
1.	Nežinomas junginys	C ₉ H ₁₈ O ₈	2.4	253,0925	133, 135, 161, 181
2.	Hidroksifenilpropiono rūgštis ^b	C ₉ H ₁₀ O ₅	2.9	197,0454	109, 123, 135, 151, 179
3.	Kavos rūgštis ^a	C ₉ H ₈ O ₄	3.8	179,0349	nd
4.	Nežinomas junginys	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	3.9	387,1658	135, 163, 179, 207, 311
5.	Rutinas ^a	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	4.3	609,1462	301
6.	Etilgalatas ^a	C ₉ H ₁₀ O ₅	4.4	197,0456	124, 125, 167
7.	Kaempferol- <i>O</i> -rutinozidas ^b	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	4.4	593,1513	285
8.	Hiperozidas ^a	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	4.5	463,0876	301
9.	Nežinomas junginys	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	4.5	447,0926	285
10.	Luteolin-7- <i>O</i> -β-D-gliukuronidas ^a	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	4.5	461,0727	285
11.	Isoramnetin-gliukozidas ^b	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	4.6	477,1036	299, 300, 315
12.	Kvercetin-3-gliukuronidas ^a	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	4.7	477,0674	161,301, 315, 359
13.	Apigenin-7- <i>O</i> -β-D-gliukuronidas ^a	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	4.9	445,0778	269
14.	Rozmarinų rūgštis ^a	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	5.0	359,0775	161, 179, 197
15.	Nežinomas junginys	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₃	5.2	537,1615	133, 135, 161, 179, 295, 359
16.	Hidroksibenzoinė rūgštis ^b	C ₇ H ₆ O ₃	5.3	137,0242	93, 108
17.	Nežinomas junginys	C ₁₈ H ₂₆ O ₉	5.3	385,1500	137, 179
18.	Salvianolinė rūgštis A ^b	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	5.5	493,1136	135, 185, 295, 313, 461
19.	Metilrozmarinatas ^b	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	5.6	373,0926	135, 175, 179, 197
20.	Luteolinas ^a	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	5.7	285,0406	133,151, 197, 213
21.	3',4',5,7-Tetrahidroksi-3-metoksiflavonas ^a	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	5.8	315,0503	297
22.	Apigeninas ^a	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	6.2	269,0453	117, 151
23.	Diosmetinas ^a	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	6.4	299,0560	285
24.	Nežinomas junginys	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₂	6.4	565,1346	133, 135, 161, 359
25.	5, 7, 2'-Trihidroksi-5',6'-dimetoksiizoflavonas ^b	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	6.4	331,0822	135, 165, 180, 195, 316
26.	Ramnetinas ^a	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	7.3	315,0503	83, 145, 187
27.	Genkvaninas ^b	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	7.4	283,0611	151, 211, 239, 268
28.	Karnozolis ^a	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	8.3	329,1759	285
29.	Karnozo rūgštis ^a	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	8.7	331,1919	244, 287
30.	Metilkarnozatas ^b	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	9.0	345,2075	283, 286, 301

ST: sulaikymo trukmė.

^a Identifikuota naudojant standartą.

^b Identifikuota naudojantis literatūros duomenimis bei ChemSpider duomenų baze.

Junginio (2) molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 197,0454 atitiko $C_9H_{10}O_5$ molekulinę formulę, fragmentacijos metu gauti jonai m/z 135 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$, 123 $[M-H-C_3H_6O_2]^-$ ir 179 $[M-H-H_2O]^-$. Junginys identifiкуotas kaip hidroksifenilpropiono rūgštis. Junginio (6) molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 197,0456 atitiko $C_9H_{10}O_5$ molekulinę formulę, jo identifikavimas patvirtintas atlikus palyginimą su etaloniniu etilgalato standartu. Junginys (16), turintis $[M-H]^-$ m/z 137,0242 molekulinį joną, atitiko $C_7H_6O_3$ molekulinę formulę; remiantis literatūros duomenimis bei ChemSpider duomenų baze, šis junginys identifiкуotas kaip hidroksibenzoinė rūgštis. Hidrodinaminės rūgštys, tokios kaip kavos (3) ir rozmarinų (14), šalavijo ekstraktuose buvo identifiкуotos pagal jų standartų sulaikymo trukmes ir MS spektrų duomenis. Junginys (19), turintis $[M-H]^-$ m/z 373,0926 molekulinį joną, atitiko $C_{19}H_{18}O_8$ molekulinę formulę. Šis junginys buvo preliminariai identifiкуotas kaip metilrozmarinatas.

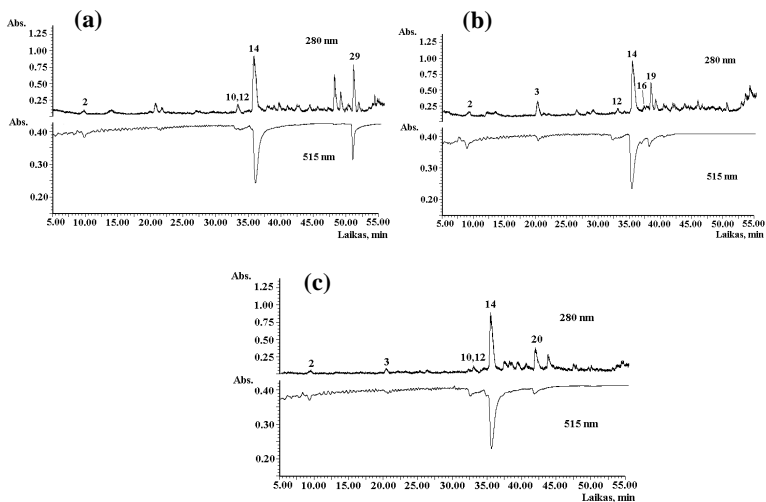
Junginio (10) molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 461,0727 atitiko $C_{21}H_{18}O_{12}$ molekulinę formulę, fragmentacijos metu gautas jonas m/z 285, kuris atitiko luteolino formulę $C_{15}H_{10}O_6$. Gauti duomenys atitiko luteolingliukuronido duomenis, o šio junginio identifikavimas papildomai buvo patvirtintas standartu. Junginys (13), turintis $[M-H]^-$ m/z 445,0778 molekulinį joną, atitiko $C_{21}H_{18}O_{11}$ molekulinę formulę, o fragmentacijos metu gautas jonas, kurio molekulinė masė $[M-H]^-$ m/z 269, atitiko apigenino molekulinę formulę $C_{15}H_{10}O_5$. Šio junginio identifikavimas patvirtintas atlikus palyginimą su etaloniniu apigenin-7-*O*-β-D-gliukuronido standartu. Junginiai (20), (21) ir (22), atitinkamai turintys $[M-H]^-$ m/z 285,0406, 315,0503 ir 315,0503 molekulinis jonus, atitiko $C_{15}H_{10}O_6$, $C_{16}H_{12}O_7$ ir $C_{15}H_{10}O_5$ molekulinis formules. Gauti duomenys atitinkamai atitiko luteolino, 3',4',5,7-tetrahidroksi-3-metoksiflavono ir apigenino duomenis, o šių junginių identifikavimas papildomai buvo patvirtintas etaloniniais standartais. Junginio (23) molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 299,0560 atitiko $C_{16}H_{12}O_6$ molekulinę formulę, fragmentacijos metu gautas jonas m/z 285, kuris atitiko luteolino formulę $C_{15}H_{10}O_6$. Junginys identifiкуotas kaip luteolino darinys – diosmetinas, tai patvirtinta atlikus palyginimą su etaloniniu diosmetino standartu. Junginys (27), turintis $[M-H]^-$ m/z 283,0611 molekulinį joną, atitiko $C_{16}H_{12}O_5$ molekulinę formulę. Remiantis literatūros duomenimis bei ChemSpider duomenų baze, šis junginys identifiкуotas kaip genkvaninas.

Junginys (5), kurio molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 609,1462, atitiko $C_{27}H_{30}O_{16}$ molekulinę formulę. Junginys identifiкуotas kaip rutinas, jo identifikavimas patvirtintas atlikus palyginimą su etaloniniu rutino standartu. Junginio (7) molekulinio jono $[M-H]^-$ m/z 593,1513, kuris atitiko $C_{27}H_{30}O_{15}$ molekulinę formulę, MS/MS režimu buvo gautas m/z 285 fragmentas, kuris atitiko $C_{15}H_9O_6$ molekulinę formulę. Šis junginys preliminariai buvo identifiкуotas kaip kaempferol-*O*-rutinozidas. Junginio (8) molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 463,0876 atitiko $C_{21}H_{20}O_{12}$ molekulinę formulę. Junginys identifiкуotas kaip hiperozidas, o jo identifikavimas patvirtintas atlikus

palyginimą su etaloniniu hiperozido standartu. Junginys (**11**), kurio molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 477,1036, atitiko $C_{22}H_{22}O_{12}$ molekulinę formulę, MS/MS fragmentavimo metu gautas m/z 315 molekulinis jonas, junginys preliminariai identifiкуotas kaip isoramnetin-gliukozidas. Junginio (**12**) molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 477,0674 atitiko $C_{21}H_{18}O_{13}$ molekulinę formulę, fragmentacijos metu gautas jonas m/z 301, kuris atitiko kvercetiną formulę $C_{15}H_{10}O_7$. Junginys identifiкуotas kaip kvercetingliukuronidas, tai patvirtinta atlikus palyginimą su etaloniniu kvercetin 3-gliukuronido standartu. Junginiai (**25**) ir (**26**), atitinkamai turintys $[M-H]^-$ m/z 331,0822 ir 315,0503 molekulinis jonus, atitiko $C_{17}H_{16}O_7$ ir $C_{16}H_{12}O_7$ molekulinis formules. Gauti duomenys atitinkamai atitiko 5, 7, 2'-trihidroksi-5',6'-dimetoksiizoflavono ir ramnetino duomenis, o šių junginių identifiкуavimas papildomai buvo patvirtintas etaloniniais standartais. Junginiai (**28**) ir (**29**) identifiкуoti kaip karnozolis ir karnozo rūgštis, atlikus palyginamąją analizę su etaloniniais šių junginių standartais. Svarbu paminėti, kad, remiantis kitų autorių rezultatais etilgalatas, 3',4',5,7-tetrahidroksi-3-metoksiflavonas, hiperozidas ir isoramnetin-gliukozidas iki šiol nebuvo identifiкуoti.

Junginiai (**30**) ir (**18**), kurių molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 345,2075 ir 4893,1136, atitiko $C_{21}H_{30}O_4$ ir $C_{26}H_{22}O_{10}$ molekulinis formules. Junginiai preliminariai identifiкуoti kaip metilkarnozatas ir salvianolinė A rūgštis.

Chromatografiškai išskirstytų junginių geba sujungti laisvuosius radikalus šalavijo ekstraktuose buvo vertinama pritaikius ESCh-DPPH[•] metodą. Neigiamos smailės apatinėje chromatogramos dalyje atitinka smailės viršutinėje chromatogramos dalyje, kurios parodo, kad junginys sujungia DPPH[•], taigi pasižymi ir antioksidacinėmis savybėmis (**6 pav.**).

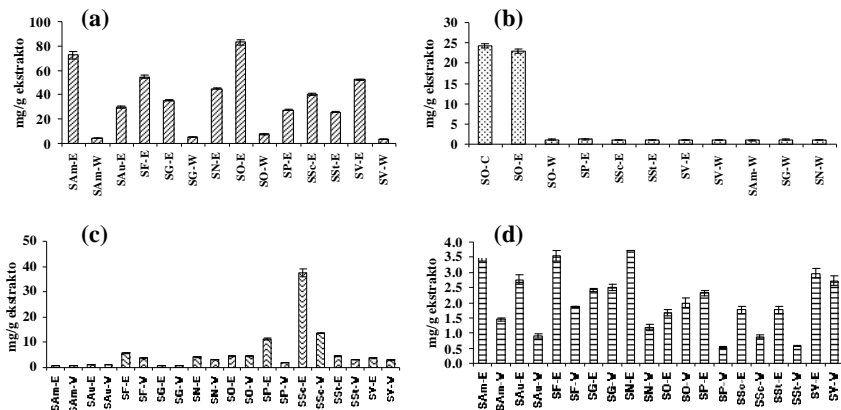


6 pav. Šalavijo ekstraktų ESCh-DPPH[•] chromatogramos (*neigiamos smailės parodo, kad junginys sujungia DPPH[•]*): (a) SO-E; (b) SAM-E; (c) SSc-E

Iš gautų rezultatų matyti, kad šalavijo ekstraktuose yra nemažai radikalų sujungimo geba pasižyminčių junginių. Nustatyta, kad didžiausia radikalų sujungimo geba pasižymėjo hidroksifenilpropiono rūgštis (**2**), kavos rūgštis (**3**), luteolin-7-*O*- β -D-gliukuronidas (**10**), kvercetin3-gliukuronidas (**12**), rozmarinų rūgštis (**14**), hidroksibenzoinė rūgštis (**16**), metilrozmarinatas (**19**), luteolinas (**20**) ir karnozo rūgštis (**29**).

3.2.3. Identifikuotų fenolinių junginių kiekybinis įvertinimas skirtinguose *Salvia genties* augalų rūšyse UESCh-TQ-S metodu

Taikant ultraefektyviąją skysčių chromatografiją su trijų kvadrupolių masių spektrometru (UESCh-TQ-S), kiekybiškai įvertinti 12 junginių skirtinguose šalavijo ekstraktuose pagal jų etaloninius standartus. Nustatyta, kad rozmarinų, karnozo ir kavos rūgštys bei apigenin-7-*O*- β -D-gliukuronidas yra dominuojantys įvairių šalavijo rūšių junginiai (**7 pav.**).



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

Dominuojantis junginys visuose šalavijo ekstraktuose buvo rozmarinų rūgštis, išskyrus ekstraktuose po SKE-CO₂. Rozmarinų rūgštis ekstraktuose svyravo nuo 3,42 iki 82,99 mg/g ekstrakto ir nuo 5024 iki 30017 μg/g SM. Didžiausias kiekis rozmarinų rūgštis nustatytas *S. officinalis*, *S. amplexicaulis*, *S. forsskaolii*, *S. verticillata* ir *S. nemorosa* šalavijo rūšių ekstraktuose. Kavos rūgštis koncentracija įvairiose šalavijo rūšyse buvo nustatyta taip pat didelė: nuo 0,51 iki 3,72 mg/g ekstrakto ir nuo 171 iki 1142 μg/g SM. Didžiausias kavos rūgštis kiekis nustatytas etanoluose *S. nemorosa*, *S. forsskaolii*, *S. amplexicaulis*, *S. verticillata* ir *S. austriaca* šalavijo rūšių ekstraktuose. Apigenin-7-O-β-D-gliukuronido koncentracija skirtingose šalavijo rūšių ekstraktuose taip pat didelė. Jo kiekis šalavijo ekstraktuose svyravo nuo 0,80 iki 37,43 mg/g ekstrakto ir nuo 217 iki 6789 μg/g SM. Didžiausiu jo kiekiu pasižymėjo etanolinis ir vandeninis *S. sclarea* ekstraktas, etanoliniai *S. pratensis* ir *S. forsskaolii* ekstraktai. Lyginant šių junginių kiekybinę analizę su literatūroje pateikta, rezultatai skyrėsi. Tokius kiekybinius skirtumus gali nulemti skirtingi fenolinių junginių išgavimo būdai, ekstrakcijos sąlygos, taip pat įtakos gali turėti ir augalo auginimo vieta. Karnozo rūgštis skirtinguose šalavijo rūšių ekstraktuose svyravo nuo 0,97 iki 24,24 mg/g ekstrakto ir nuo 193 iki 8294 μg/g SM. Didžiausias kiekis karnozo rūgštis rastas SKE-CO₂, etanoliniame ir vandeniniame *S. officinalis* ekstrakto bei vandeniniuose *S. nemorosa* ir *S. verticillata* ekstraktuose. Karnozolis buvo rastas tik SKE-CO₂ ir etanoliniame *S. officinalis* ekstrakto, atitinkamai 53,04 μg/g SM ir 1155 μg/g SM. Metilkarnozato kiekis buvo apskaičiuotas pagal karnozo rūgštis

etaloninį standartą ir nustatyta, kad didžiausia jo koncentracija yra SKE-CO₂ (371 µg/g SM) ir etanoliniame *S. officinalis* ekstrakte (987 µg/g SM).

Kitų identifiukuotų junginių kiekiai skirtinguose šalavijo rūšių ekstraktuose buvo nustatyti mažesniais kiekiais arba aptikti tik jų pėdsakai. Didžiausias luteolin-7-*O*-β-D-gliukuronido kiekis (µg/g SM) buvo nustatytas etanoliniame ir vandeniniame *S. officinalis* ekstrakte, atitinkamai: etanolinio ekstrakto 1479, o vandeninio – 4364. Luteolin-7-*O*-β-D-gliukuronidas taip pat nustatytas *S. forsskaolii*, *S. sclarea*, *S. nemorosa* ir *S. verticillata* etanoliniuose ir vandeniniuose ekstraktuose. Didžiausiu kvercetin-3-gliukuronido kiekiu pasižymėjo vandeniniai *S. officinalis* ekstraktai (1270 µg/g SM), palyginti su vandeniniais *S. forsskaolii* (649 µg/g SM) ir etanoliniais *S. sclarea* (297 µg/g SM) ekstraktais. 3',4',5,7-Tetrahidroksi-3-metoksiflavono, etilgalato, diosmetino ir ramnetino įvairiose šalavijo rūšyse buvo aptikta tik pėdsakų.

3.3. Skirtingais metodais gautų *Salvia genties* augalų rūšių lakiųjų junginių sudėties palyginimas

Lakieji junginiai iš skirtingų šalavijo rūšių išskirti taikant superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu (SKE-CO₂) ir Likenso-Nickersono distiliacijos / ekstrakcijos metodus. Lakiųjų junginių sudėtis tirta DC-LJD ir DC/MS metodais.

Taikant SKE-CO₂ skirtinguose šalavijo rūšių ekstraktuose identifiukuota 116 skirtingų lakiųjų junginių, o, taikant L-N metodą, – 142 junginiai. **4 ir 5 lent.** pateikiami dominuojantys lakieji junginiai, jiems išskirti taikant skirtingus metodus. Identifiukuoti lakieji junginiai suskirstyti į 8 klases: monoterpenus, oksidintus monoterpenus, seksviterpenus, oksidintus seksviterpenus, diterpenus, triterpenus, alkanus ir kitus. Rezultatai išreikšti mg/kg SM.

Tyrimo metu nustatyta, kad daug didesnis bendras lakiųjų junginių kiekis gautas taikant L-N (347–21508 mg/kg) metodą nei SKE-CO₂ (112–3992 mg/kg). Bendras lakiųjų junginių kiekis skyrėsi priklausomai nuo šalavijo rūšies. Pavyzdžiui, lakiųjų junginių kiekis, išskirtas iš *S. amplexicaulis* ir *S. officinalis* taikant L-N metodą, atitinkamai buvo 1,44 ir 5,66 karto didesni nei jų lakiuosius junginius išskiriant SKE-CO₂.

Pastebėta, kad L-N metodas buvo efektyvesnis išskiriant mono- ir seksviterpenus, kurie yra dominuojantys lakieji junginiai daugumoje aromatinių augalų. Bendras alifatinių ir oksidintų monoterpenų kiekis taikant L-N metodą buvo nuo 8 (*S. glutinosa*) iki 195 (*S. sclarea*) karto didesnis, palyginti su monoterpenų kiekiu, išgautu taikant SKE-CO₂. Tiek alifatinių, tiek oksidintų monoterpenų buvo rasta visuose L-N ekstraktuose, išskyrus *S. pratensis* ir *S. forsskaolii*, SKE-CO₂ išgautuose ekstraktuose alifatinių monoterpenų buvo aptikta tik keturiose šalavijo rūšyse, o oksidintų – penkiose. Bendras alifatinių ir oksidintų seksviterpenų kiekis taikant L-N metodą buvo nuo 3,4 (*S. nemorosa*) iki 29,8 (*S. amplexicaulis*) karto didesnis, palyginti su seksviterpenų kiekiu, išgautu taikant SKE-CO₂. Seksviterpenų buvo rasta visuose tiek L-N, tiek CO₂

ekstraktuose. Junginiai, priklausantys diterpenų klasei, tiek L-N, tiek CO₂ ekstraktuose buvo nustatyti mažesniais kiekiais, išskyrus diterpenus manolį ir sklareolį, kurie atitinkamai dominavo *S. officinalis* ir *S. sclarea* ekstraktuose. Pastebėta, kad, taikant L-N metodą, sklareolio ir manolio buvo atitinkamai išskirta 1,76 ir 4 kartų daugiau nei taikant SKE-CO₂. Taip pat didesni jokiai grupei nepriskirtų junginių („kitų“) kiekiai buvo išskirti taikant L-N metodą nei SKE-CO₂.

Alkanai – vienintelė junginių grupė, kuri geriau išskiriama taikant SKE-CO₂ nei L-N metodą. Alkanų kiekis taikant SKE-CO₂ buvo nuo 3,5 (*S. sclarea*) iki 40,8 (*S. officinalis*) kartų didesnis, palyginti su alkanų kiekiu, išgautu taikant L-N metodą. Didžioji dalis tyrimo metu identifikuotų alkanų turi ilgesnę nei 16 anglies atomų grandinę (heptakozanas, oktakozanas ir kt.).

Distiliacijos / ekstrakcijos Likenso-Nickersono aparatu bei superkritinio skystčio ekstrakcijos su anglies dioksidu (SKE-CO₂) metodų taikymo lakiesiems junginiams išgauti palyginimas atskleidė, kad, lakiesiems junginiams išgauti taikant SKE-CO₂, jų kiekis buvo daug mažesnis. Labiausiai tikėtina priežastis, nulėmusi šiuos skirtumus, yra lakiųjų junginių pašalinimas iš surinktuvo su dujiniu CO₂ srautu.

Nustatyta, kad *S. officinalis* pasižymėjo didžiausiu kiekiu lakiųjų junginių, kurie buvo išskirti taikant tiek SKE-CO₂ ekstrakciją, tiek L-N. *S. officinalis* pagrindinių lakiųjų junginių sudėties kokybinė ir kiekybinė analizė labai skyrėsi nuo kitų šalavijo rūšių lakiųjų junginių sudėties. Pavyzdžiui, α -tujonas (3391 mg/kg) ir 1,8-cineolis (1393 mg/kg) buvo dominuojantys lakieji junginiai *S. officinalis* L-N ekstraktuose, o daugumoje kitų šalavijo rūšių šių junginių aptikta visiškai nebuvo. β -tujono (2041 mg/kg), kamparo (2690 mg/kg) ir manolio (2751 mg/kg) taip pat buvo nustatyti dideli kiekiai *S. officinalis* L-N ekstraktuose, kitose šalavijo rūšyse šių junginių visiškai nebuvo aptikta arba aptikta pėdsakų. Lyginant pagrindinių L-N metodu gautų lakiųjų junginių kiekius su literatūros duomenimis, galima pastebėti, kad mūsų tirtu *S. officinalis* lakiųjų junginių sudėtis panaši į kitų autorių publikuotus rezultatus.

Taikant SKE-CO₂ ekstrakciją *S. officinalis* lakiesiems junginiams išskirti nustatyta, kad dominuojantys lakieji junginiai *S. officinalis* SKE-CO₂ gautuose ekstraktuose buvo šie: manolis (689 mg/kg), α -humulenai (395 mg/kg), viridiflorolis (357 mg/kg) ir α -tujonas (351 mg/kg). Palyginus gautus rezultatus su Lima ir jo bendraautorių 2004 m. atliktais tyrimų rezultatais, aiškiai matyti skirtumai. Lima su bendraautoriais nustatė, kad Portugalijoje surinktų augalų lakiųjų junginių pagrindinės sudedamosios dalys buvo: α -tujonas (17,4 proc.), α -humulenai (13,3 proc.), 1,8-cineolis (12,7 proc.), β -kariofilenas (8,5 proc.) ir borneolis (8,3 proc.). Skirtumų priežastys gali būti įvairios – skirtingos klimato sąlygos, skirtinga augalų auginimo vieta ar pasirinktas skirtingas ekstrakcijos metodas lakiesiems junginiams išskirti.

Apie kitų mūsų tyrimo metu naudotų šalavijo rūšių lakiųjų junginių sudėtį ir analizę literatūroje duomenų pateikta mažai. Pavyzdžiui, tik viena publikacija rasta apie *S. pratensis* lakiųjų junginių sudėtį. Anačkovo ir jo bendraautorius 2009 m. išleistoje publikacijoje minima, kad *S. pratensis* dominuojantys lakieji junginiai yra E-kariofilenas ir kariofileno oksidas, ir tai sutapo su šio tyrimo rezultatais. Tiriant *S. verticillata* lakiųjų junginių sudėtį, nustatyta, kad spatulenolis (90 mg/kg), gerkakrenas D (56 mg/kg) ir gerkakra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -olis (37 mg/kg) yra dominuojantys lakieji junginiai *S. verticillata* L-N ekstraktuose, o SKE-CO₂ metodu gautuose ekstraktuose dominavo skvalenas (44 mg/kg), gerkakrenas D (36 mg/kg), fitolis (28 mg/kg) ir vitaminas E (24 mg/kg). Literatūros šaltiniuose minimi skirtingi dominuojantys *S. verticillata* lakieji junginiai: β -pinenas (21 proc.) ir 1,8-cineolis (16 proc.). Kariofileno oksidas (57 mg/kg), humuleno epoksidai II (49 mg/kg) ir α -humulenas (30 mg/kg) nustatyti dominuojantys junginiai *S. glutinosa* šalavijo rūšyje. Palyginus gautus rezultatus su literatūroje pateiktais, dominuojantys junginiai nustatyti tie patys. Publikacija apie *S. austriaca* ir *S. amplexicaulis* lakiųjų junginių sudėtį rasta taip pat viena. Nustatyta, kad dominuojantys junginiai *S. austriaca* rūšyje buvo spatulenolis (17 proc.), heksahidrofarnecilacetonas (14 proc.), isobornilacetatas (13 proc.), palmitino rūgštis (14 proc.), trans-fitolis (7,4 proc.) ir kariofileno oksidas, o *S. amplexicaulis* – gerkakrenas D (21 proc.), kariofileno oksidas (15 proc.), β -kariofilenas (9,2 proc.), α -kadinolis (6,7 proc.), gerkakra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -olis (5,4 proc.) ir fotolis (5,1 proc.). *S. sclarea* taip pat pasižymėjo dideliu kiekiu lakiųjų junginių, kurie buvo išskirti taikant tiek SKE-CO₂ ekstrakciją, tiek L-N. Nustatyta, kad dominuojantys lakieji junginiai *S. sclarea* buvo sklareolis (4241 mg/kg), linalilacetatas (411 mg/kg), linalolis (296 mg/kg), kariofileno oksidas (272 mg/kg) ir (5E,9E)-farnecilacetonas (234 mg/kg). Sklareolis buvo pagrindinis junginys *S. sclarea* (2411 mg/kg) SKE-CO₂ metodu pagamintuose ekstraktuose. Kitų pagrindinių junginių SKE-CO₂ pagamintuose ekstraktuose buvo nustatyti mažesni kiekiai nei L-N metodu pagamintuose ekstraktuose. Palyginus gautus rezultatus su literatūra, aiškiai matyti skirtumai, pavyzdžiui, sausringose vietose surinktos *S. sclarea* rūšies lakiųjų junginių pagrindinės sudedamosios dalys buvo: linalolis (26–29 proc.) ir linalilacetatas (35–53 proc.). Kaip jau minėjome, skirtumų priežastys gali būti įvairios – skirtingos klimato sąlygos, skirtinga augalų auginimo vieta ar pasirinktas skirtingas ekstrakcijos metodas lakiesiems junginiams išskirti.

4 lentelė. Įvairių šalavijo rūšių pagrindinių lakiųjų junginių sudėtis, jiems išskirti taikant SKE-CO₂ ekstrakciją. Rezultatai išreikšti mg/kg SM

Junginys	KI th	KI [*]	Bandiniai										
			SAm-C	SAu-C	SF-C	SG-C	SN-C	SO-C	SP-C	SSc-C	SSt-C	SV-C	
1,8-cineolis	1031	1024	-	-	-	-	-	-	92,9	-	-	-	-
Linalolis	1096	1092	-	-	-	-	-	-	15,4	-	-	-	-
α-tujonas	1102	1098	-	-	-	-	-	-	351	-	-	-	-
(E)-kariofilenas	1419	1413	6,14	-	14,7	5,16	5,92	111	14,0	12,3	0,78	5,74	
α-humulenas	1454	1448	-	-	7,04	5,61	-	395	-	-	0,94	2,48	
Germakrenas D	1480	1476	3,66	-	9,32	-	-	2,18	0,61	9,55	-	35,7	
Spatulenolis	1578	1574	-	-	11,8	-	-	3,37	-	1,52	4,80	13,1	
Kariofileno oksidas	1583	1581	3,85	-	2,75	6,10	71,1	10,2	3,84	14,2	24,7	2,46	
Viridiflorolis	1592	1591	-	-	-	-	-	357	-	-	-	-	
Humuleno epoksidas II	1608	1605	-	-	-	4,54	2,90	39,4	-	-	1,03	2,01	
Fitolis	1943	1943	9,15	7,25	9,12	8,29	7,30	41,6	20,0	-	6,72	28,1	
Manolis	2057	2060	-	-	-	-	-	689	-	-	-	-	
Sklareolis	2223	2227	-	-	-	-	-	-	-	2411	-	-	
Skvalenas	2847 [*]	2841	10,6	24,3	-	14,7	32,2	61,5	26,0	10,9	20,1	44,2	
Triakontanas	3000	3006	5,00	5,71	8,01	-	8,69	12,0	4,96	1,29	8,95	7,02	
Vitaminas E	3112 [*]	3126	7,92	18,5	28,4	3,40	-	40,2	-	-	-	23,9	
β-sitosterolis	3200	3164	-	5,14	4,65	3,18	4,17	18,0	5,69	2,23	-	-	

- - neaptikta.

[♦] *Kováts* sulaikymo indeksas apskaičiuotas pagal C₇-C₃₀ alkanų mišinį nepolinėje Elite-5 kolonėlėje.

th *Kováts* sulaikymo indeksas nepolinėje kolonėlėje publikuotas literatūroje (Adams, 2009).

^{*} *Kováts* sulaikymo indeksas iš <http://webbook.nist.gov> duomenų bazės.

5 lentelė. Įvairių šalavijo rūšių pagrindinių lakiųjų junginių sudėtis, jiems išskirti taikant L-N metodą. Rezultatai išreikšti mg/kg SM

Junginys	KI th	KI [*]	Bandiniai										
			SAm	SAu	SF	SG	SN	SO	SP	SSc	SSt	SV	
1,8-cineolis	1031	1025	-	-	-	-	-	-	1394	-	-	-	-
Linalolis	1096	1093	-	-	1,28	1,44	-	-	864	-	296	10,3	5,50
α-tujonas	1102	1104	-	-	-	-	-	-	3391	-	-	-	-
β-tujonas	1114	1115	-	-	-	-	-	-	2041	-	-	1,54	-
Kamparas	1146	1146	-	-	-	-	-	-	2690	-	3,67	2,60	-
(E)-kariofilenas	1419	1413	151	2,77	50,5	33,2	12,0	-	588	291	107	4,24	28,0
α-humulenas	1454	1447	6,94	1,25	23,4	30,2	2,25	-	2058	11,6	-	1,64	11,6
Germakrenas D	1480	1477	15,6	2,28	15,6	5,48	3,62	-	7,52	5,62	34,6	-	56,2
Spatulenolis	1578	1571	1,79	14,8	100	2,25	-	-	20,3	40,0	72,6	27,9	89,7
Kariofileno oksidas	1583	1579	147	3,04	45,4	56,5	220	-	60,4	200	272	120	24,1
Humuleno epoksidai II	1608	1604	15,9	-	23,7	49,3	9,47	-	290	8,36	34,5	5,54	21,8
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-α-olis	1686	1682	14,9	1,15	10,0	1,96	2,91	-	3,10	1,45	24,7	1,96	36,9
(5E,9E)-farnezil acetonas	1913	1899	5,45	7,28	7,32	7,88	3,81	-	9,44	10,2	234	-	8,03
Fitolis	1943	1943	37,4	32,7	9,97	34,0	14,1	-	129	72,8	42,2	11,8	13,7
Manolis	2057	2060	-	-	-	-	-	-	2751	-	43,5	95,5	-
Sklareolis	2223	2223	-	-	-	-	-	-	-	-	4241	-	-

- – neaptikta.

♦ *Kováts* sulaikymo indeksas apskaičiuotas pagal C₇–C₃₀ alkanų mišinį nepolinėje Elite-5 kolonėlėje.

th *Kováts* sulaikymo indeksas nepolinėje kolonėlėje publikuotas literatūroje (Adams, 2009).

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

Aromatiniai augalai ir prieskoninės žolės kaupia įvairias fitochemines medžiagas, kurios yra svarbus funkcinį ingredientų šaltinis, nes turi platų teigiamų poveikių sveikatai spektrą. Biologiškai veiklių sudedamųjų dalių pridėjimas į maistą yra vienas pagrindinių būdų plėtoti funkcinius maisto produktus, kurie gali toliau būti testuojami dėl numanomo poveikio sveikatai. Dėl to šiandien naujų augalų šaltinių, turinčių daug biologiškai veiklių komponentų, paieška ir vertinimas tapo svarbia mokslininkų ir maisto gamintojų problema.

Šalavijo ekstraktuose yra nemažai biologiškai veiklių medžiagų, tarp jų ir flavonoidų bei fenolinių rūgščių, kurie yra potencialūs natūralių antioksidantų šaltinis. Šie ekstraktai plačiai vartojami komerciniais tikslais bei įvairiuose maisto produktuose, gėrimuose ir kosmetikos priemonėse, daugiausia kaip astringentai ir aromatizatoriai. Šie natūralūs antioksidantai nepasižymi toksiškumu, kurį gali sukelti sintetiniai antioksidantai, pvz., butilintas hidroksianizolas (BHA), butilintas hidroksitoluenas (BHT) ir propilgalatas.

Nustatyta, kad rozmarinų rūgštis buvo dominuojantis junginys visuose šalavijo rūšių ekstraktuose, ypač etanoliniuose (iki 30,0 mg/g SM). Didžiausia šio junginio koncentracija pasižymėjo *S. officinalis* (30,0 mg/g SM), *S. amplexicaulis* (18,5 mg/g SM), *S. forsskaolii* (16,6 mg/g SM) ir *S. verticillata* (15,4 mg/g SM) etanoliniai ekstraktai. Remiantis Peterseno and Simmondso 2003 m. išleista publikacija, galima teigti, kad rozmarinų rūgšties antioksidacinės savybės yra net triskart stipresnės nei trolokso, todėl ji slopina ksantino oksidazę ir gali pašalinti laisvųjų radikalų perteklių žmogaus kūne. Be to, rozmarinų rūgštis oksiduoja molibdeną ir sumažina jo valentingumą nuo 6 iki 5, todėl gali užkirsti kelią laisvųjų radikalų, kurių atsiradimą skatina oksiduojantys polivalenčių metalų katalizatoriai, susidarymui. Kavos rūgšties koncentracija įvairiose šalavijo rūšyse nustatyta taip pat didelė: nuo 0,51 iki 3,72 mg/g ekstrakto ir nuo 171 iki 1142 μg/g SM. Didžiausia šio junginio koncentracija pasižymėjo *S. nemorosa*, *S. forsskaolii*, *S. amplexicaulis* ir *S. verticillata* etanoliniai ekstraktai. Kavos rūgšties vaidmuo širdies ir kraujagyslių sistemos ir tam tikrų vėžio formų prevencijos srityje taip pat yra išsamiai aprašytas. Todėl šias šalavijo rūšis galima naudoti kaip naujas žaliavas išgaunant funkcinius ingredientus funkcionaliajam maistui kurti. Šalavijas yra taip pat geras apigenin-7-*O*-β-D-gliukuronido šaltinis. Apigenin-7-gliukuronidas pasižymi farmakologiniais poveikiais, tarp jų ir antioksidaciniu, antikomplementariniu ir slopinančiu aldazės reduktazę. Jį taip pat galima pritaikyti kaip sveikatai naudingą ingredientą funkciniam maisto produktams ar papildams kurti. Apigenin-7-*O*-β-D-gliukuronido koncentracija skirtingose šalavijo rūšių ekstraktuose nustatyta didelė. Jo koncentracija šalavijo ekstraktuose svyravo nuo 0,80 iki 37,43 mg/g ekstrakto ir nuo 217 iki

6789 µg/g SM. Didžiausiu jo kiekiu pasižymėjo etanoliniai *S. sclarea*, *S. pratensis* ir *S. forsskaolii* ekstraktai.

Apibendrinant galima teigti, kad etanoliniai *S. officinalis*, *S. sclarea*, *S. amplexicaulis*, *S. verticillata*, *S. nemorosa* ir *S. forsskaolii* ekstraktai sukaupia vertingų biologiškai veiklių medžiagų, kurios turi teigiamą poveikį sveikatai. Galima prognozuoti, kad šios šalavijo rūšys gali būti auginamos ir taikomos funkcionaliojo maisto ar maisto papildų gamyboje.

4. IŠVADOS

1. Iš 10 *Salvia* genties augalų rūšių išskirta po tris frakcijas (kiekvienos rūšies), atliekant pakopinę aukšto slėgio ekstrakciją su superkritiniu CO₂, etanoliumi (96 proc.) ir vandeniu. Vandeniųjų ekstraktų išeigos (30,2–43,7 proc.) buvo didesnės, palyginti su išeigomis ekstraktų, gautomis naudojant etanolį (18,1–36,2 proc.) ir superkritinį CO₂ (1,8–5,2 proc.).

2. 10 *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo įvertintas naudojant BFJK, ABTS⁺ ir ORAC tyrimo metodus. Etanoliniai *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktai pasižymėjo daug didesniu antioksidaciniu aktyvumu ir bendroju fenolių junginių kiekiu nei ekstraktai, išskirti naudojant superkritinį CO₂ ar vandenį. Pritaikius QUENCHER metodą, kai antioksidacinės savybės matuojamos pradinėje žaliavoje bei ekstrakcijų liekanose, antioksidacinio aktyvumo vertės išlieka didelės, ypač po SKE-CO₂; tai rodo, kad augalinėje medžiagoje po ekstrakcijos lieka didelis kiekis junginių, pasižyminčių antioksidaciniu aktyvumu. Stipri koreliacija ($r^2=0,812-0,942$) nustatyta tarp BFJK ir *in vitro* antioksidacinio aktyvumo vertinimo metodų ABTS⁺ ir ORAC.

3. Rozmarinų, karnozo ir kavos rūgštys bei apigenin-7-*O*-β-D-gliukuronidas yra dominuojantys junginiai tirtuose *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktuose. Šiuose *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktuose taip pat pirmą kartą identifikuoti etilgalatas, 3',4',5',7-tetrahidroksi-3-metoksiflavonas, hiperozidas ir izorhamnetin-gliukozidas.

4. Rozmarinų rūgštis nustatyta kaip dominuojantis junginys (iki 30017 μg/g SM) įvairiuose *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktuose, ypač etanoliniuose. Apigenin-7-*O*-β-D-gliukuronido (iki 6798 μg/g SM), kavos (iki 1142 μg/g SM) ir karnozo (iki 8294 μg/g SM) rūgščių taip pat nustatyti dideli kiekiai daugumoje *Salvia* genties augalų rūšių. Taikant ESCh-DPPH[•] nustatyta, kad tirtuose ekstraktuose rozmarinų, kavos ir karnozo rūgštys aktyviausiai sujungia DPPH radikalą. Naudojant etaloninius junginius, *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktuose iš viso identifikuota 15 junginių, 12 iš jų buvo įvertinti kiekybiškai. Papildomai kai kurie junginiai buvo identifikuoti preliminariai pagal gautus MS fragmentus ir palyginus juos su literatūroje aprašytais spektrinėmis charakteristikomis.

5. Bendras tokoferolių kiekis tirtose *Salvia* genties augalų rūšyse kito nuo 2360 iki 10071 μg/g ekstrakto ir nuo 52,64 iki 221 μg/g SM. Didžiausiu tokoferolių kiekiu pasižymėjo *S. nemorosa* (221 μg/g SM), *S. forsckaolii* (193 μg/g SM) ir *S. verticillata* (187 μg/g SM). α-tokoferolis buvo dominuojantis vitamino E izomeras *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktuose; jo koncentracija kito nuo 2242 iki 8473 μg/g ekstrakto ir nuo 50,01 iki 179 μg/g SM. γ ir δ-tokoferolių koncentracijos buvo daug mažesnės. β izomero nenustatyta nė viename iš tirtų šalvijo ekstraktų.

6. Lakiųjų junginių kiekis *Salvia* genties augalų rūšių ekstraktuose, jiems išskirti taikant SKE-CO₂, buvo daug mažesnis, palyginti su lakiųjų junginių kiekiu, išskirtu taikant L-N metodą. Labiausiai tikėtina to priežastis yra lakiųjų junginių pašalinimas iš surinktuvo su dujiniu CO₂ srautu.

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

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

STRAIPSNIAI

Mokslinės publikacijos disertacijos tema, paskelbtos mokslinės informacijos Clarivate Analytics (buv. Thomson Reuters) WOS sąrašo leidiniuose:

1. Šulniūtė, Vaida; Baranauskienė, Renata; Ragažinskienė, Ona; Venskutonis, Petras Rimantas. Comparison of composition of volatile compounds in ten *Salvia* species isolated by different methods // Flavour and Fragrance Journal. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2017, vol. 32, no. 4, p. 254-264. ISSN: 0882-5734. (I.F. 1.693 (2015)).

2. Šulniūtė, Vaida; Pukalskas, Audrius; Venskutonis, Petras Rimantas. Phytochemical composition of fractions isolated from ten *Salvia* species by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction methods // Food Chemistry. Oxford: Elsevier, 2017, vol. 224, p. 37-47. ISSN: 0308-8146. (I.F. 4.052 (2015)).

3. Šulniūtė, Vaida; Ragažinskienė, Ona; Venskutonis, Petras Rimantas. Comprehensive evaluation of antioxidant potential of 10 *Salvia* species using high pressure methods for the isolation of lipophilic and hydrophilic plant fractions // Plant Foods for Human Nutrition. Dordrecht: Springer, 2016, vol. 71, no. 1, p. 64-71. ISSN: 0921-9668. (I.F. 2.276 (2015)).

Kitos mokslinės publikacijos, paskelbtos mokslinės informacijos Clarivate Analytics (buv. Thomson Reuters) WOS sąrašo leidiniuose:

1. Kitrytė, Vaida; Povilaitis, Darius; Kraujalienė, Vaida; Šulniūtė, Vaida; Pukalskas, Audrius; Venskutonis, Petras Rimantas. Fractionation of sea buckthorn pomace and seeds into valuable components by using high pressure and enzyme-assisted extraction methods // LWT-Food Science and Technology. (I.F. 2.711 (2015)) (priimta spausdinti).

2. Basegmez, Hatice Imge Oktay; Povilaitis, Darius; Kitrytė, Vaida; Kraujalienė, Vaida; Šulniūtė, Vaida; Alasalvar, Cesarettin; Venskutonis, Petras Rimantas. Biorefining of blackcurrant pomace into high value functional ingredients using supercritical CO₂, pressurized liquid and enzyme assisted extractions // The Journal of Supercritical Fluids. Amsterdam: Elsevier, 2017, vol. 124, p. 10-19. ISSN: 0896-8446 (print). (I.F. 2.579 (2015)).

3. Šulniūtė, Vaida; Jaime, Isabel; Rovira, Jordi; Venskutonis, Petras Rimantas. Rye and wheat bran extracts isolated with pressurized solvents increase oxidative stability and antioxidant potential of beef meat hamburgers // Journal of Food Science. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2016, vol. 81, no. 2, p. H519-H527. ISSN: 0022-1147. (I.F. 1.649 (2015)).

4. Povilaitis, Darius; **Šulniūtė, Vaida**; Venskutonis, Petras Rimantas; Kraujalienė, Vaida. Antioxidant properties of wheat and rye bran extracts obtained by pressurized liquid extraction with different solvents // Journal of Cereal Science. London: Academic Press-Elsevier Science, 2015, vol. 62, p. 117-123. ISSN 0733-5210. (I.F. 2.402 (2015)).

Disertacijos tema išspausdinti pranešimai užsienio konferencijų pranešimų medžiagoje:

1. **Sulniute, Vaida**; Pukalskas, Audrius; Venskutonis, Petras Rimantas. Phytochemical composition and antioxidants from ten different *Salvia* spp. isolated by high pressure extraction methods // 3rd International Conference on Food and Biosystems Engineering (FaBE2017), June 1-4, 2017, Rhodes island, Greece. Book of abstracts/ Thessaly: Technological Educational Institute of Thessaly, 2017, p. 138.

2. **Sulniute, Vaida**; Venskutonis, Petras Rimantas; Pukalskas, Audrius; Baranauskienė, Renata. Antioxidant activities and phytochemical composition of products isolated by high pressure extraction methods from *Salvia* spp. // 11th Baltic Conference on Food Science and Technology “Food Science and Technology in a Changing World“ (FoodBalt-2017), April 27-28, 2017, Jelgava, Latvia. Abstract book/ Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology. Riga: Drukātava, 2017, p. 29. ISSN 2501-0190.

3. **Šulniūtė, Vaida**; Venskutonis, Petras Rimantas; Baranauskienė, Renata. Essential oils and antioxidants from ten *Salvia* spp. isolated by high pressure extraction methods // 47th International Symposium on Essential Oils (ISEO2016), September 11-14, 2016, Nice, France. Program and book of abstracts/ Université de Nice-Sophia Antipolis. Nice: Centre de Production Numérique Universitaire (CPNU), 2016, p. 141. (*Laimėtas finansavimas dalyvio mokesčiui*).

4. Venskutonis, Petras Rimantas; **Sulniute, Vaida**. Comprehensive evaluation of antioxidant properties of different *Salvia* species as sources of nutraceutical ingredients // Institute of Food Technologists Annual Meeting and Food Expo “Where Science Feeds Innovation“ (IFT-2015), July 11-14, 2015, McCormick Place South, Chicago, IL USA. Book of abstracts/ Chicago (Illinois): Institute of Food Technologists, 2015, p. 122. ISSN 2470-1416.

5. **Šulniūtė, Vaida**; Venskutonis, Petras Rimantas. Screening of antioxidant properties of ten *Salvia* species by the *in vitro* assays // 10th Baltic Conference on Food Science and Technology “Future Food: Innovations, Science and Technology“ (FoodBalt-2015), May 21-22, 2015, Kaunas, Lithuania. Abstract book/ Department of Food Science and Technology. Kaunas: Kaunas University of Technology, 2015, p. 51. e-ISBN 978-609-02-1138-0. (*Gauta nominacija už geriausią stendinį pranešimą*).

Trumpa informacija apie autorių

Vaida Šulniūtė gimė kovo 18 d. Šiauliuose.

2007 m. baigė Šiaulių Didždvario gimnaziją.

2007–2011 m. Studijavo Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete, baigė Maisto technologijos ir inžinerijos studijų programą ir įgijo chemijos inžinerijos bakalauro kvalifikacinį laipsnį.

2011–2013 m. Studijavo Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete, baigė Maisto technologijų studijų krypties Maisto mokslo ir saugos studijų programą ir įgijo maisto technologijų magistro kvalifikacinį laipsnį.

2013–2017 m. Studijavo Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete, chemijos krypties doktorantūros studijose.

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovui prof. dr. Petrui Rimantui Venskutoniui už disertacijos temos idėją, vertingas mokslines konsultacijas, pasitikėjimą ir pagalbą rengiant mokslines publikacijas ir disertaciją. Doc. A. Pukalskui ir j. m. d. R. Baranauskienei – už pagalbą atliekant mokslinius tyrimus. Kolegoms – už kūrybišką darbinę atmosferą ir gerą nuotaiką.

Nuoširdžiai dėkoju tėvams, sesei, artimiesiems ir draugams už moralinį palaikymą, pasitikėjimą, supratingumą ir kantrybę.

Ačiū visiems, kurie prisidėjo prie sėkmingo šio darbo įgyvendinimo!

Vaida Šulniūtė

PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF EXTRACTS ISOLATED FROM VARIOUS SPECIES OF THE GENUS *SALVIA*

INTRODUCTION

Botanicals are among the most important sources of natural antioxidants and other valuable phytochemicals which may find applications as novel food additives or bioactive ingredients for functional foods and nutraceuticals. In addition, more than 25% of the pharmaceutical drugs prescribed worldwide are derived from the plant sources (Schmidt et al., 2008). Moreover, 'naturalness' has become one of the most important factors for the consumer's preferences in choosing various products for human consumption. Therefore, the interest in a more systematic and comprehensive characterisation of less studied plant species has been systematically increasing. Such studies are necessary for developing new natural preparations which might impart double benefits to foods, i.e. by not only enhancing their health benefits but also by providing antioxidant and antimicrobial protection; in the latter case, they may be considered as promising alternatives for such currently widely used synthetic food additives as butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), benzoates and others which are prominently becoming more and more refused by the consumers due to safety concerns.

Numerous studies have demonstrated that dietary antioxidants may protect human cells from the negative effects of excessive free radicals which are linked to the development of many chronic diseases; if present in foods, such constituents may retard lipid oxidation and rancidity. Oxidation of lipids in foods reduces the sensory quality and nutritional value of the food products (Kristinová, Mozuraityte, Storrø, and Rustad, 2009), while in living organisms under conditions of excess of reactive oxygen species (ROS), they may damage cell membranes, accelerate their ageing, and induce the development of a number of diseases. Therefore, the application of natural antioxidants in foods is considered as a promising means for increasing their shelf-life, reducing waste and nutritional losses (Tsuda, Osawa, Ohshima, and Kawakishi, 1994). All the above-mentioned factors as well as the presence of a vast number of poorly investigated plant species foster search and valorisation of new sources of valuable and applicable natural substances, including dietary antioxidants.

Lamiaceae family herbs are among the most popular aromatic, medicinal and spicy plants, many of which have been extensively studied and reported to accumulate high amounts of essential oils, strong phenolic antioxidants and other valuable constituents. Some species of 'sage' (the common name used for many genus *Salvia* plants) have also been widely used in cosmetics, perfumery, soft drinks and various foods. *S. officinalis* and *S. sclarea* are the most thoroughly studied *Salvia* species, whereas the information about many other *Salvia* species

is rather scarce. To fill this gap, 10 different *Salvia* spp. plants, namely *S. amplexicaulis*, *S. austriaca*, *S. forsskaolii*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, *S. officinalis*, *S. pratensis*, *S. sclarea*, *S. stepposa* and *S. verticillata* have been selected.

In order to obtain valuable compounds from 10 different *Salvia* spp. plants, various extraction techniques and different polarity solvents were used. Scholarly practice has proven that only by consecutively employing different techniques can the best results be actually achieved. In this study, the antioxidant properties as well as the composition of phenolic and volatile compounds were also evaluated for the valorisation of *Salvia* spp. as new raw materials for the isolation of functional ingredients for human nutrition.

The aim of the research

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

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

1. To evaluate the applicability and effectiveness of various extraction methods and solvents for the separation of different polarity soluble fractions from 10 *Salvia* spp. plants and to assess their yields.
2. To evaluate the antioxidant potential of soluble fractions isolated from 10 *Salvia* spp. plants by various methods using radical scavenging and other antioxidant capacity measurement assays.
3. To determine the content of total phenolics in soluble fractions isolated from 10 *Salvia* spp. plants by employing various methods and to evaluate their composition by using the chromatographic and mass spectrometric methods.
4. To determine the variations of the main compounds identified in *Salvia* spp. plants and to evaluate the species in terms of their possible uses for the recovery of valuable natural compounds.
5. To determine the composition of tocopherols in lipophilic CO₂ extracts of *Salvia* spp.
6. To determine the composition of volatile compounds in volatile fractions of different *Salvia* spp. plants isolated by employing simultaneous solvent extraction-distillation and supercritical fluid extraction methods.
7. On the basis of the obtained experimental results, to theoretically evaluate the prospects of application of *Salvia* extracts in the preparation of functional ingredients with health benefits.

Scientific novelty

The following scientific novelty was achieved by fulfilling the above outlined tasks:

1. Systematic studies on the variations of antioxidant properties and total phenolic compounds in various extracts isolated from different *Salvia* spp. plants were performed for the first time.

2. The phytochemical composition of the majority of plants of *Salvia* spp. selected in our study has not been reported previously. Only the common sage (*Salvia officinalis*) has been studied to some extent; although it is used in our study mainly for comparison purposes, comprehensive evaluation of its fractions isolated by using green high pressure extraction and fractionation technologies has not been reported previously.

3. We applied comprehensive and complex approach in the fractionation of *Salvia* spp. (separation into lipophilic and other fractions by different polarity green solvents, determination of the phytochemical concentration in the extracts and in the whole plant material). This approach has never been applied previously to any of the *Salvia* plants selected for our research; it has even never been applied to the more frequently studied *S. officinalis* and *S. sclarea*. Moreover, this concept has been rather scarcely applied to other plants as well.

4. Some phytochemicals (ethyl gallate, 3',4',5,7-tetrahydroxy-3-methoxyflavone, hyperoside and isorhamnetin-glucoside) are reported in *Salvia* spp. plants for the first time.

5. The composition of the volatile compounds of the majority of the *Salvia* spp. plants selected in our study has never been reported previously. Only *Salvia officinalis* has been studied, which is predominantly used in our study for comparison purposes only.

Practical significance

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

Structure and Outline of the Dissertation

The dissertation is written in English. It consists of a list of abbreviations, an introduction, a review of the most relevant scholarly literature, a section on the employed materials and methods, a chapter covering the results and discussion, conclusions, literature references (in total, 231 references were used), and a list of the author's publications on the theme of this dissertation. The final work contains 98 pages including 9 tables and 18 figures.

Publications of the research results

The results of the research have been presented in 3 publications delivered in journals covered in the list of Clarivate Analytics (formerly, Thompson Reuters) Web of Science database and reported at 5 international conferences.

Key points presented for the defence:

1. Application of consecutive extraction with supercritical CO₂ and pressurised liquid extraction with higher polarity solvents enables to obtain from *Salvia* spp. plant material whose valuable fractions possess strong antioxidant capacity and high concentrations of bioactive compounds.

2. Some underinvestigated *Salvia* spp. plants, namely, *S. amplexicaulis*, *S. verticillata*, *S. nemorosa*, *S. forsskaolii* and *S. pratensis*, may represent promising material for the recovery of valuable natural compounds.

3. The composition of volatile constituents of *Salvia* spp. plants isolated by simultaneous solvent extraction-distillation and supercritical fluid extraction methods is significantly different.

CONCLUSIONS

1. From 10 different *Salvia* spp. plants, three fractions per plant were isolated by consecutive high pressure extraction with CO₂, ethanol (96%) and water. The yields obtained with water (30.2–43.7%) were higher compared to the extracts isolated with ethanol (18.1–36.2%) and CO₂ (1.8–5.2%).

2. The antioxidant potential of 10 *Salvia* spp. extracts was evaluated by using TPC, ABTS⁺⁺ and ORAC assays. Ethanol extracts possessed significantly higher antioxidant capacity and the total content of phenolics than the extracts obtained with CO₂ or water. The antioxidant power of the plant material extraction residues evaluated by the QUENCHER method was also comparatively high, particularly after SFE-CO₂; it suggests that a considerable amount of antioxidatively active compounds remain in the plant material after extraction. A strong correlation ($r^2=0.812-0.942$) between TPC and antioxidant activity measured by ABTS⁺⁺ and ORAC was also observed.

3. Rosmarinic, caffeic and carnosic acids and apigenin-7-*O*-β-D-glucuronide were identified as the main compounds in the selected *Salvia* spp. extracts. In addition, ethyl gallate, 3',4',5,7-tetrahydroxy-3-methoxyflavone, hyperoside and isorhamnetin-glucoside were also identified in the selected *Salvia* spp. extracts for the first time.

4. Rosmarinic acid was found to be the dominating compound (up to 30,017 μg/g DWP) in various *Salvia* spp. plants, particularly in their ethanolic extracts. Apigenin-7-*O*-β-D-glucuronide (up to 6,798 μg/g DWP), caffeic (up to 1,142 μg/g DWP) and carnosic (up to 8,294 μg/g DWP) acids were quantitatively important phytochemicals in the majority other *Salvia* spp. plants. Rosmarinic, caffeic and carnosic acids were determined to be the most active radical scavengers in the investigated extracts when employing the on-line HPLC-UV-DPPH^{*} method. In total, 15 compounds were identified in *Salvia* spp. extracts by using commercial standards, 11 of them were quantified, whereas some other compounds were identified tentatively based on the obtained MS fragments and a comparison with data provided in scholarly literature.

5. The total yield of tocopherol isomers in the studied *Salvia* spp. plants varied from 2,360 to 10,071 μg/g DWE and from 52.64 to 221 μg/g DWP. The highest total amount of the extracted tocopherols from dry plant material was determined in *S. nemorosa* (221 μg/g DWP) followed by *S. forsskaolii* (193 μg/g DWP) and *S. verticillata* (187 μg/g DWP). α-Tocopherol was found to be the dominating vitamin E isomer in 10 different *Salvia* species; its concentration in the extracts and plant material were from 2242 to 8473 μg/g DWE and from 50.01 to 179 μg/g DWP, respectively. The concentrations of γ- and δ-tocopherols were remarkably lower. β isomer was not detected in any of the extracts.

6. A comparison of simultaneous distillation/extraction in a *Likens-Nickerson* (L-N) apparatus and supercritical fluid extraction with carbon dioxide (SFE-CO₂) methods for the isolation of volatile compounds revealed that the amount of volatiles isolated from 1 kg of dried plant material by SFE-CO₂ method was remarkably lower comparing to the L-N method, most likely, due to the losses of volatiles with the exhaust from the system CO₂ after depressurising the extraction equipment.

7. Experimental studies revealed that ethanolic extracts of *S. officinalis*, *S. sclarea*, *S. amplexicaulis*, *S. verticillata*, *S. nemorosa*, *S. forsskaolii* and *S. pratensis* accumulate various valuable phytochemicals such as rosmarinic acid and tocopherols. Based on the existing knowledge on the health benefits of these constituents, it is assumed that these investigated *Salvia* spp. plants are promising plants which could be cultivated for the development of valuable ingredients for functional foods and nutraceuticals.

Information about the Author

Vaida Šulniūtė was born on 18th of March in Šiauliai, Lithuania.

In 2007, graduation from Šiauliai Didždvaris gymnasium.

2007–2011 Bachelor's degree studies at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology, Bachelor of Chemical Engineering.

2011–2013 Master's degree studies at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology, Master of Food Technology.

2013–2017 Doctoral degree studies at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology.

Acknowledgements

I wish to express gratitude to my scientific promoter Prof. Dr. Petras Rimantas Venskutonis for the idea and the subject of this doctoral dissertation, valuable scientific consultations, trust and help in preparing publications and this dissertation. Assoc. Prof. Dr. A. Pukalskas and Junior Researcher Renata Baranauskienė deserve immense praise for the assistance in coordinating my research work. I am highly thankful to my colleagues for the creative atmosphere and cheerful mood during the working hours.

I express my deepest affection, appreciation and thanks to my parents, sister, relatives and friends – for the moral support, encouragement, understanding and patience. Thanks to everyone who contributed to make this work reality!

Vaida Šulniūtė

UDK 582.929.4(043.3)

SL344. 2017-06-23, 2,75 leidyb. apsk. I. Tiražas 50 egz.

Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas
Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas