

SAT-23-P-BFT(R)-11

**CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF
EXTRACTS FROM SAGE (*SALVIA OFFICINALIS* L.).**

Silvia Mollova, Stanka Damyanova, Iliana Kostova, Ivanka Stoilova, Albena Stoyanova

**ХИМИЧЕН СЪСТАВ, АНТИОКСИДАНТНА И АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА
ЕКСТРАКТИ ОТ САЛВИЯ (*SALVIA OFFICINALIS* L.)**

Силвия Моллова

Институт по розата и етеричномаслените култури, гр. Казанлък

Станка Дамянова

Илиана Костова

Катедра “Биотехнологии и хранителни технологии”

Русенски университет “Ангел Кънчев”, Филиал – Разград

E-mail: sdamianova@uni-ruse.bg

E-mail: ikostova@uni-ruse.bg

Иванка Стоилова

Albena Stoyanova

University of Food Technologies, Plovdiv, Bulgaria

E-mail: aastst@abv.bg

Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts from Sage (Salvia officinalis L.):

The chemical composition of extracts of sage (Salvia officinalis L.) was analyzed using GC/MS and HPLC. The sage extracts possess antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and has antioxidant activity against DPPH.

Key words: *ethanolic extracts from sage, chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities.*

ВЪВЕДЕНИЕ

Градинският чай (*Salvia officinalis* L.) произхожда от Средиземноморието и като диворастящо се среща по западното крайбрежие на Балканския полуостров (Далмация, Албания), острови в Адриатическо море, Италия, Гърция, Испания, където се и култивира. Отглежда се в Молдавия, Крим, Украйна, Кубанския край, страните на Средна Европа и Северна Америка [1, 6, 9].

В България градинският чай е диворастящ в южните райони, а се култивира в градините като подправка, лечебно и декоративно растение [1, 3].

Течните екстракти се получават при преработка на етеричномаслени и лечебни растения с полярни летливи и нелетливи екстрагенти, които след приключване на процеса не се отделят от разтвора. При екстракцията изборът на технологичните параметри зависи от вида на преработваната суровина и съдържанието на биологичноактивни вещества в нея [4].

От листата на градинския чай се получават разнообразни течни екстракти, които съдържат ароматични и биологичноактивни вещества [5, 7, 18, 19]. Течните екстракти са с доказано антимикробно действие [8, 18, 19] и антиоксидантна активност [13, 18], поради което намират приложение в различни козметични и фармацевтични продукти.

Цел на настоящата работа е определяне на химичния състав на екстракти от листа на градински чай, както и на тяхната антиоксидантна и антимикробна активност.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Суровина

Използвани са листа от градински чай (*Salvia officinalis* L.), закупени от търговската мрежа на град Казанлък, реколта 2015 г.

Получаване на течни екстракти

Проведена е статична екстракция [12]. Разделянето на суровината от получените екстракти е чрез филтруване през филтърна хартия. Преди анализ за определяне съдържанието на биологичноактивните вещества екстрактите са съхранявани в хладилник при 4 °С.

Химичен състав на екстрактите:

- Определяне на ароматични вещества - за газ-хроматографския (GC) анализ на екстрактите е използван апарат Agilent 7890A с пламъчно-йонизационен детектор; колона HP-INNOWax Polyethylene Glycol (60 m x 0,25 mm; филм 0,25 µm); температурни условия: 70 °С – 10 min, 70 – 240 °С – 5 °С/min, 240 °С – 5 min; 240 – 250 °С – 10 °С/min, 250 °С – 15 min; газ носител хелий, 1 cm³/min постоянна скорост; инжектор: split, 250 °С, split съотношение 50 : 1. За масспектралния/газхроматографски (MS/GC) анализ е използван апарат Agilent 5975 С, газ носител хелий, колона и температурни условия както при GC анализа; детектори: FID, 280 °С, MSD, 280 °С transfer line. Идентификацията на ароматичните вещества е чрез сравняване с индекса на задържане на свидетели.

- Определяне на фенолни киселини – извършено е чрез HPLC система Waters 1525, (Waters, Milford), UV-VIS детектор (Waters, Milford), термостат, софтуер Breeze 3,30, колона Supelco Discovery HS C18 (25 cm × 4,6 mm, филм 5 µm), работеща при 26 °С. Подвижната фаза за фенолни киселини е разтвор А (2 % оцетна киселина) и разтвор В (ацетонитрил : 0,5 % оцетна киселина = 1 : 1, v/v), градиентен режим, 20 µL, дължина на вълната λ = 280 и 320 nm. Определянето на фенолните киселини е осъществено по предварително построена стандартна права.

- Определяне на розмаринова киселина – използва се описаната при фенолните киселини Waters HPLC система и колона, и изокритично елуиране с подвижна фаза А (метанол : к. Н₃РO₄ : вода = 50 : 0,3 : 49,7 v/v), скорост на потока 1 mL/min, дължина на вълната λ = 327 nm и температура на колоната 26 °С. Определянето на розмариновата киселина е осъществено по предварително построена стандартна права.

- Определяне на флавоноиди – използва се описаната при фенолните киселини Waters HPLC система и колона, и градиентно елуиране с подвижна фаза от разтвор А (2 % оцетна киселина) и разтвор Б (метанол) при дължина на вълната λ = 308 и 380 nm и температура на колоната 26 °С. Определянето на флавоноидите е осъществено по предварително построена стандартна права.

- Кверцетин гликозидите – използва се описаната при фенолните киселини Waters HPLC система и колона, и линейно градиентно елуиране с разтвор А (2 % оцетна киселина) : разтвор Б (ацетонитрил) = 80 : 20 (v/v) при дължина на вълната λ = 370 nm. Определянето на кверцетин гликозидите е осъществено по предварително построена стандартна права.

- Определяне на тритерпенови съединения – използва се описаната при фенолните киселини Waters HPLC система и колона, и елуиране с подвижна фаза КН₂РO₄ с рН 2,8 : метанол = 12 : 88, скорост на потока 0,80 cm³/min при дължине на вълната λ = 210 nm. Определянето на тритерпеновите съединения е осъществено по предварително построена стандартна права.

Антиоксидантна активност на екстрактите

Радикал-улавящата активност спрямо DPPH радикала е определена съгласно метода на Mensor и съавт. [11].

Антимикробна активност на екстрактите

- Тест-култури – използвани са: Gram-положителни: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; Gram-отрицателни: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella abony* NTCC 6017; Дрожди: *Saccharomyces*

Cerevisiae ATCC 9763, *Candida albicans* ATCC 10231; Плесенни гъби: *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium moniliforme*. Подбраните тест-култури най-често се срещат по кожата и в козметичните препарати. Референтните тест-култури са от Националната Банка за Промислени Микроорганизми и Клетъчни Култури (НБПМКК), София. Всички използвани тест-микроорганизми са депозираны в микробната културална колекция на катедра „Биотехнологии и хранителни технологии” на Русенски Университет „А. Кънчев”, Филиал – Разград.

Антимикробното действие е изследвано по метода дифузия в агар с използване на ямки ($d = 8 \text{ mm}$) [20]. Опитите са проведени върху хранителна среда Nutrient Agar (Vacto - Beef Extract – 3 g; Vacto-Peptone – 5 g; Vacto-Agar – 15 g) – за бактерии; среда на Сабуро за дрождите и картофено-глюкозов агар за плесенните гъби. В ямките са накапвани по 50 μl от изследваните екстракти. След дифундиране за 30 min при стайна температура, петриевите блюда са поставяни в термостат при температура 37 $^{\circ}\text{C}$ за 24 h при бактериите; 30 $^{\circ}\text{C}$ за 24 h при дрождите и за 72 h при плесенните гъби.

Опитите са извършени паралелно с контроли от съответните екстрагенти, като се отчита и коригира тяхното действие.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Съдържание на ароматични вещества

Съдържанието на идентифицираните ароматични вещества в изследваните четири екстракта е представено на табл. 1. От данните се вижда, че количеството на идентифицираните компоненти е от 84,88 до 91.34%. Основните компоненти (над 3 %) са: α -thujone (6,72-10,65%), 1,8-cineole (4,70-6,96 %), β -thujone (4,82-5,89 %) и camphor (7,49-9,15 %). Разликата в съдържанието на ароматичните вещества се дължи на селективността на екстрагента. От данните се вижда, че в екстрактите преобладават терпеновите кислородни съединения, следвани от дитерпеновите кислородни съединения и алифатните въглеводороди.

По съдържание на основните компоненти, както и по разпределението на монотерпеновите кислородни съединения по функционални групи екстрактите се различават от етеричното масло, обяснимо с разтворимостта им в използвания посредник – етанол с различна концентрация при екстракцията и вода и водна пара при дестилацията [7, 19].

Таблица 1. Съдържание на ароматични вещества в течни екстракти.

№	Компоненти, %	RI	Екстракти с			
			30 % етанол	50 % етанол	70 % етанол	95 % етанол
1.	n-octane	800	0,32	0,36	0,34	0,69
2.	n-nonane	900	0,40	0,44	0,42	0,56
3.	n-decane	1000	5,99	6,58	6,28	8,39
4.	1,8-cineole	1032	6,33	6,96	6,65	4,70
5.	α -thujone	1098	9,68	10,65	10,17	6,72
6.	n-undecane	1110	6,49	7,14	6,81	8,84
7.	β -thujone	1112	5,35	5,89	5,62	4,82
8.	camphor	1141	8,32	9,15	8,74	7,49
9.	n-dodecane	1200	2,11	2,32	2,21	4,90
10.	neral	1232	1,84	2,02	1,93	1,66
11.	geranial	1266	1,69	1,86	1,77	1,52
12.	(E)- β -caryophyllene	1418	1,55	1,71	1,63	3,40
13.	α -humulene	1455	1,48	1,63	1,55	3,33

14.	lilial	1541	4,92	5,41	4,17	4,43
15.	ledol	1589	5,77	6,35	5,06	5,19
16.	Palmitic acid	1942	1,89	0,98	0,93	3,71
17.	Srearic acid	1967	1,93	1,02	0,98	3,74
18.	13-epimanol	2052	9,03	13,13	9,48	3,13
19.	Olei acid	2081	3,12	1,23	4,28	2,81
20.	shonanol	2379	4,64	2,90	5,87	2,18
21.	sugiol	2395	5,19	3,51	6,45	2,67
Aliphatic hydrocarbons, %			17.39	18.46	17.58	27.55
Oxygenated monoterpenes, %			37.72	40.03	38.19	31.70
Sesquiterpenes hydrocarbons, %			3.44	3.66	3.48	7.93
Oxigenated sesquiterpenes, %			6.55	6.96	5.55	6.11
Diterpenes, %			21.42	21.42	23.86	9.40
Aromatic compounds, %			5.60	5.93	4.56	5.22
Other compounds, %			7.88	3.55	6.78	12.09

Съдържание на полифенолни съединения

Съдържанието на идентифицираните полифенолни съединения в изследваните четири екстракта е представено на табл. 2.

Таблица 2. Съдържание на полифенолни съединения в течни екстракти.

Компоненти, µg/cm ³	Екстракти с			
	30 % етанол	50 % етанол	70 % етанол	95 % етанол
Gallic acid	17,69	15,18	7,38	-*
3,4-di OH Benzoic acid	-	3,01	1,61	-
2-OH Benzoic acid	28,02	114,01	20,16	7,84
Chlorogenic acid	22,53	34,22	72,89	29,05
Vanillic acid	112,33	15,16	29,86	28,51
Cafeic acid	21,86	83,43	85,41	9,58
Syringic acid	13,24-	15,50	16,47	20,42
p-Coumaric acid	120,40	23,69	24,65	48,01
Sinapic acid	542,63	716,85	41,55	7,73
Ferulic acid	171,46	186,20	146,82	18,90
Cinnammic acid	3,68	7,04	12,10	8,64
Rosmarinic acid	27,87	98,99	677,04	77,03
Myrecatin	15,26	16,68	15,96	14,27
Hesperetin	18,39	22,03	57,40	33,84
Quercetin	4,87	4,83	4,83	4,90
Luteolin	22,56	16,32	16,01	43,54
Kaempferol	2,79	3,42	3,68	2,79
Apigenun	9,59	0,68	1,85	21,61
Rutin	-	-	47,08	21,68
Hyperosid	-	-	770,89	45,46

* не са идентифицирани

По съдържание на основните компоненти, както и по тяхното разпределение по функционални групи екстрактите се различават от данните в литературата [18], което се дължи на различните технологични фактори за получаването им, както и на методите за анализ.

Съдържание на тритерпенови съединения

Съдържанието на идентифицираните тритерпенови съединения в изследваните четири екстракта е представено на табл. 3.

Таблица 3. Съдържание на тритерпенови съединения в течни екстракти.

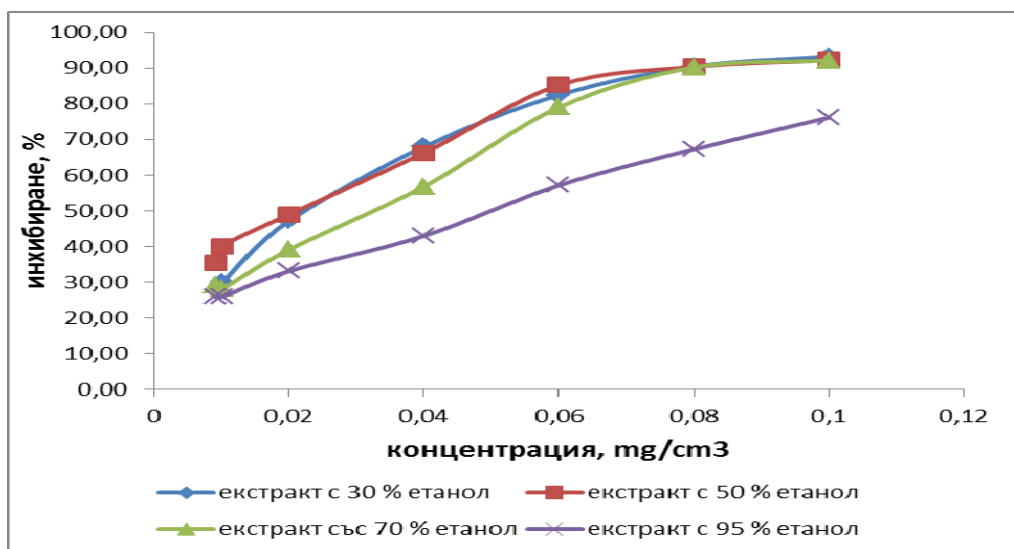
Компоненти, µg/cm ³	Екстракти с			
	30 % етанол	50 % етанол	70 % етанол	95 % етанол
Betulin	-*	41,72	76,53	162,94
Betulinic acid	10,63	29,94	72,42	183,77
Oleanolic acid	3,86	37,04	72,24	38,50
Ursolic acid	9,74	61,29	128,22	292,78
Carnosic acid	-	10,42	14,36	14,58

* не са идентифицирани

По съдържание на основните компоненти, както и по тяхното разпределение по функционални групи екстрактите се различават от данните в литературата [7], което се дължи на различните технологични фактори за получаването им, както и на методите за анализ.

Антиоксидантна активност

Резултатите от антиоксидантната активност на течните екстракти са представени на фиг. 28. От данните се вижда, че с най-значителна активност е екстрактът, получен с 50 % етанол, обяснимо с по-високото съдържание на фенолни киселини.



Фигура 1. Антиоксидантна активност на течни екстракти.

За антиоксидантната активност най-често се съди по концентрацията, необходима за 50 % улавяне на DPPH радикала (IC₅₀). Колкото е по-ниска тази стойност, толкова са по-силни антиоксидантните свойства на изследвания продукт.

Изчислените IC₅₀ концентрации на изследваните екстракти са представени на табл. 11. От данните се вижда, че стойността на IC₅₀ за екстракта, получен с 50 % етанол е най-ниска (0,023 mg/cm³), т.е. този екстракт е с най-висока антиоксидантна активност. Антирадикаловото действие на екстракта с 30 % етанол е най-близко до полученият с 50 % етанол. Коефициентът на корелация (R²) при всички екстракти е висок.

Наблюдава се ясна тенденция за намаляване на антирадикаловата активност с увеличаване на концентрацията на етанола като екстрагент. Антирадикалова активност на

екстракта, получен с 95 % етанол (с $IC_{50} = 0,051 \text{ mg/cm}^3$), е 2,26 пъти по-ниска от тази на екстракта с 50 % етанол.

Антиоксидантната активност се различава от данните в литературата за екстракти от градински чай [13, 18], обяснимо с вида на използвания радикал, разтворител и неговата селективност.

За сравнение IC_{50} на екстрактите е по-висока от тази на екстракти от други суровини на същото семейство, например от трева от мащерка ($0,225 \text{ mg/cm}^3$) с основен компонент тимол [17], листа от мента ($0,365 \text{ mg/cm}^3$) с основен компонент ментол [14], от трева на чубрица ($0,636 \text{ mg/cm}^3$) с основен компонент карвакрол [15] и от листа на босилек ($0,291 \text{ mg/cm}^3$) с основен компонент 1,8-цинеол [16]. Тази разлика в антиоксидантната активност се обяснява както с вида на използвания разтворител, така и със състава на екстрактите в зависимост от условията на получаването им.

Антимикробна активност

• Резултатите от проведената антимикробна активност спрямо изследваните тест-култури бактерии, дрожди и плесенни гъби са представени на табл. 4. Анализът на данните показва, че екстрактите показват добра антимикробна активност срещу изследваните Gram-положителни бактерии *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*. От Gram-отрицателните бактерии единствено *Pseudomonas aeruginosa* е чувствителен към изследваните екстракти, докато тест-културите *Escherichia coli* и *Salmonella abony* не са чувствителни. Изследваните дрожди и плесенни гъби не се влияят от екстрактите. Като цяло бактериите са по-чувствителни към екстрактите, в сравнение с плесените и дрождите.

Установените разлики в зоните на инхибиране за един и същ тест-микроорганизъм при отделните екстракти се обяснява с варирането в съдържанието на биологичноактивните съставки, в случая дъбилните вещества, които са с доказано антибактериално действие [10].

Екстрактите от градински чай имат по-слаб антимикробен ефект в сравнение със спиртни извлеци, получени от други етеричномаслени суровини [2]. Това се дължи на разлика в състава им, произтичащи от вида на суровината и концентрацията на съответния разтворител.

Антимикробната активност се различава от данните в литературата за екстракти от градински чай [8, 19], обяснимо с вида на използвания разтворител и неговата селективност.

Таблица. 4. Антимикробна активност на течни екстракти.

Тест-микроорганизми	Диаметър на зони на инхибиране (mm)			
	30 % етанол	50 % етанол	70 % етанол	95 % етанол
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	9,4	18,5	16,8	16,8
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-*	15,4	13,4	13,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11,3	19,9	17,7	18,3
<i>Salmonella abony</i> NCTC 6017	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-	-
<i>Fusarium moniliforme</i>	-	-	-	-

* - неустановено действие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Екстрактите от градински чай съдържат ароматични вещества, полифеноли, тритерпенови съединения, проявяват по-силно антимикробно действие и антиоксидантен ефект, поради което са подходящи за влагане в козметични препарати, обект на следващи разработки.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Георгиев, Е., А. Стоянова. Справочник на специалиста от ароматичната промишленост, Пловдив, БНАЕМПК, 2006.
- [2] Дамянова, С. Технология на ароматични продукти от лечебни и етеричномаслени растения, Дисертация, д.н., УХТ, 2015.
- [3] Петков, В. (ред.) Съвременна фитотерапия, София, Изд. “Медицина и физкултура”, 1982.
- [4] Стоянова, А., Е. Георгиев. Технология на етеричните масла, Пловдив, Акад. Изд. УХТ, 2007.
- [5] Balinova-Cvetkova, A., A. Stojanova. Otrzymywanie ekstraktow roslinnych do cel ow kosmetycznych. Czesz I. Szalwia (*Salvia officinalis* L.), Biuletin Kosmologiczny, 1998, № 4, 187 – 189.
- [6] Başer, H., N. Kirimer. Essential oils of Lamiaceae plants of Turkey, Acta Horticulturae, 2006, v. 723, 26 – 31.
- [7] Durling, N., O. Catchpole, J. Grey, R. Webby, K. Michell, L. Foo, N. Perry. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures, Food Chemistry, 2007, v. 101, № 4, 1417 – 1424.
- [8] Garcia, C., M. Ely, R. Wasum, B. Zoppa, C. Wolleheim, G. Neves, V. Angeli, K. de Souza. Assesment of *Salvia officinalis* (L.) hydroalcoholic extract for possible use in cosmetic formulation as inhibitor of pathogens in the skin, Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada, 2012, v. 33, № 4, 509 – 514.
- [9] Koroch, A., H. Juliani, J. Simon. Tissue culture and genetic transformation for the improvement of aroma in plants of the Lamiaceae, Processing, analysis and application of essential oils, НКВ, Dehradun, India, 2005, 275 – 291.
- [10] Lutete, T., K. Kambu, D. Ntondele, K. Cimanga. Antimicrobial activity of tannins, Fitoterapia, 1994, v. 65, № 3, 276 – 278.
- [11] Mensor, L., F. Menezes, G. Leitao, A. Reis, T. Santos, C. Coube, S. Leitao. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, Phytotherapy Research, 2001, v. 15, 127 - 130.
- [12] Mollova S., S. Tasheva, S. Damyanova, M. Stoyanova, A. Stoyanova. Investigation of extracts from sage (*Salvia officinalis* L.) for application in cosmetics, Journal of Food and Packaging Science Technique and Technologies, 2016, год. V, № 8, 40 – 42.
- [13] Neagu, E., G. Paun, G. Radu. Chemical composition and antioxidant activity of *Salvia officinalis* concentrated by ultrafiltration, Romanian Biotechnological Letters, 2014, v. 19, № 2, 9203 – 9211.
- [14] Nenov, N., V. Gochev, I. Stoilova, T. Girova, T. Atanasova, A. Stoyanova. Low temperature extraction of plants by liquifacate cases. 16. Peppermint (*Mentha piperita* L.), Proceeding of the International Conference “Agri-Food Sciences, Processes and Technologies”, 2014a, May 14 – 15, Sibiu, Romania, 70 – 80.
- [15] Nenov, N., V. Gochev, I. Stoilova, T. Girova, T. Atanasova, A. Stoyanova. Low temperature extraction of Bulgarian essential oil bearing plants from Lamiaceae by liquefied cases. 17. Savory (*Satureja hortensis* L.), World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014b, v. 3, № 6, 2128 – 2135.
- [16] Nenov, N., V. T. Girova, I. Iliev, I. Stoilova, A. Stoyanova. Low temperature extraction of essential oil bearing plants by liquefied cases. 20. Basil (*Ocimum basilicum* L.), Материалы международной научно-практической конференции, Воронеж, 2014с, 140 – 143.

[17] Nenov, N., V. Gochev, I. Stoilova, T. Girova, T. Atanasova, A. Stoyanova. Low temperature extraction of essential oil bearing plants by liquefied cases. 21. Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Научный журнал для профессионалов агропромышленного комплекса, АПК России, 2015, № 72, 162 – 166.

[18] Then, M., K. Vásárhelyi-Perédi, R. Szölloösy, K. Szentmihályi. Polyphenol-, mineral element content and total antioxidant power of sage (*Salvia officinalis* L.) extract, Acta Horticulturae, 2004, v. 629, 123 – 129.

[19] Veličkovic, D., N. Randjelovic, M. Ristic, A. Veličkovic, A. Smelcerovic. Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L., Journal of Serbian Chemical Society, 2003, v. 68, № 1, 17 – 24.

[20] Zaika, L. Species and herbs: their antimicrobial activity and its determination, Food Safety, 1988, 97 – 118.

За контакти:

доц. дн Станка Дамянова, Катедра “Биотехнологии и хранителни технологии”, Русенски университет “Ангел Кънчев”, Филиал – Разград, тел.: 084-266 075, e-mail: sdamianova@uni-ruse.bg;

доц. д-р Илиана Иванова Костова, катедра „Биотехнологии и хранителни технологии“, Русенски университет “Ангел Кънчев”, Филиал-Разград, тел.: 084/266 063, e-mail: ikostova@uni-ruse.bg;

проф. дтн Албена Стоянова, Катедра “Технология на тютюна, захарта, растителните и етерични масла”, Университет по хранителни технологии, Пловдив, e-mail: aastst@abv.bg.

доц. д-р Иванка Стоилова, катедра „Биотехнологии“, Университет по хранителни технологии, Пловдив.