

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vasja PROGAR

**VREDNOTENJE KAKOVOSTI ŽAJBLJA**  
**(*Salvia officinalis* L.) IZ NARAVNIH RASTIŠČ**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vasja PROGAR

**VREDNOTENJE KAKOVOSTI ŽAJBLJA  
(*Salvia officinalis* L.) IZ NARAVNIH RASTIŠČ**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EVALUATION OF QUALITY OF SAGE  
(*Salvia officinalis* L.) FROM NATURAL SITES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

*Cur moriatur homo, cui salvia crescit in horto*

Zakaj umrl bi človek, če žajbelj na vrtu ima?  
Why should a man die, in whose garden Salvia is grown?

*Johannes de Westfalia*  
Regimen sanitatis Salernitanum  
(cca. 1480)

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 12. aprila 2010 za mentorico dela imenovala prof. dr. Deo Baričevič.

Mentorica: prof. dr. Dea Baričevič

Recenzent: prof. dr. Samo Kreft

Komisija za zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Dea BARIČEVIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Samo KREFT  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo

Datum zagovora: 3. junij 2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Vasja PROGAR

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Dn                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| DK | UDK 633.88:582.929.4:581.5:615.07(043.2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| KG | zdravilne rastline/žajbelj/ <i>Salvia officinalis</i> L./ <i>Salviae folium</i> /Evropska farmakopeja/naravno rastišče/naravna populacija/kakovost/eterično olje                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| AV | PROGAR, Vasja                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| SA | BARIČEVIČ, Dea (mentorica)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| LI | 2010                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| IN | VREDNOTENJE KAKOVOSTI ŽAJBLJA ( <i>Salvia officinalis</i> L.) IZ NARAVNIH RASTIŠČ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| OP | IX, 42, [1] str., 7 pregl., 9 sl., 67 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| AI | Ovrednoteni sta bili dve naravni populaciji žajblja ( <i>Salvia officinalis</i> L.) iz naravnih rastišč na Petrinjskem Krasu. Ugotovljena je bila skladnost s predpisi Evropske farmakopeje glede vsebnosti tujih primesi, vode, pepela, eteričnega olja in prisotnosti tujonov in 1,8-cineola. Vsebnost eteričnega olja je dosegala koncentracijo 19,7 ml/kg oz. 22 ml/kg, pri čemer je bila višja vsebnost eteričnega olja v drogi po starosti starejše populacije, ki je imela tudi višje vsebnosti tujih primesi, vode in pepela. Ugotovljena je bila pozitivna korelacija med vsebnostjo vode in vsebnostjo eteričnega olja v drogi, pokazane pa so bile tudi razlike v sestavi ekstraktov in eteričnega olja posameznih rastlin. Rezultati imajo neposredno vrednost v smislu pokazane ustreznosti za pridelavo in uporabo droge, predstavljajo pa tudi iztočnico za nadaljnje raziskave in razmislek o možnih izboljšavah predpisov za vrednotenje kakovosti žajblja. |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 633.88:582.929.4:581.5:615.07(043.2)  
CX medical plants/sage/*Salvia officinalis* L./*Salviae folium*/European Pharmacopoeia/native site/native population/quality/essential oil  
AU PROGAR, Vasja  
AA BARIČEVIČ, Dea (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
PY 2010  
TI VREDNOTENJE KAKOVOSTI ŽAJBLJA (*Salvia officinalis* L.) IZ NARAVNIH RASTIŠČ  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 42, [1] p., 7 tab., 9 fig., 67 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Two natural populations of sage (*Salvia officinalis* L.) from natural habitats in Petrinjski Kras were evaluated. Compliance with European Pharmacopoeia regarding the presence of foreign matter, water, ash and the presence of thujones and 1,8-cineole in essential oil were shown. The mean content of essential oil is reaching 19.7 ml/kg and 22 ml/kg, with a higher content of essential oil obtained from the drug of the elderly population, which also had higher levels of foreign matter, water and ash. A positive correlation between water content and essential oil content was found and differences were indicated between the composition of extracts and composition of essential oil of individual plants. The results have a direct value in terms of the indicated suitability for production and use of drugs, and represent a starting point for further research and consideration of possible improvements to regulations for evaluating the quality of sage.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                | str.      |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| Ključna dokumentacijska informacija (KDI)                      | III       |
| Key words documentation (KWD)                                  | IV        |
| Kazalo vsebine                                                 | V         |
| Kazalo preglednic                                              | VII       |
| Kazalo grafikonov in slik                                      | VIII      |
| Okrajšave in simboli                                           | IX        |
| <br>                                                           |           |
| <b>1 UVOD</b>                                                  | <b>1</b>  |
| 1.1 ŽAJBELJ SKOZI ZGODOVINO                                    | 1         |
| 1.2 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA                             | 2         |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>                                         | <b>3</b>  |
| 2.1 VRSTE ŽAJBLJA                                              | 3         |
| <b>2.1.1 Taksonomska in genotipska karakterizacija</b>         | <b>3</b>  |
| <b>2.1.2 Botanični opis</b>                                    | <b>4</b>  |
| 2.2 SESTAVA ŽAJBLJA                                            | 4         |
| <b>2.2.1 Eterično olje</b>                                     | <b>4</b>  |
| 2.2.1.1 Vsebnost eteričnega olja v drogi <i>Salviae folium</i> | 4         |
| 2.2.1.2 Komponente eteričnega olja žajblja                     | 5         |
| 2.2.1.3 Spremenljivost sestave in vsebnosti eteričnega olja    | 7         |
| <b>2.2.2 Druge sestavine listov žajblja</b>                    | <b>11</b> |
| 2.3 UPORABA                                                    | 11        |
| <b>2.3.1 Protimikrobno delovanje</b>                           | <b>11</b> |
| <b>2.3.2 Antioksidativno delovanje</b>                         | <b>12</b> |
| <b>2.3.3 Protivnetno delovanje</b>                             | <b>12</b> |
| <b>2.3.4 Drugi učinki</b>                                      | <b>13</b> |
| <b>2.3.5 Toksičnost</b>                                        | <b>13</b> |
| 2.4 VREDNOTENJE KAKOVOSTI ZDRAVILNIH RASTLIN                   | 14        |
| <b>3 MATERIAL IN METODE</b>                                    | <b>15</b> |
| 3.1 RASTLINSKI VZORCI                                          | 15        |
| 3.2 DOLOČANJE TUJIH PRIMESI, VODE IN CELOKUPNEGA PEPELA        | 17        |
| 3.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI ETERIČNEGA OLJA                        | 19        |

|                                                 |           |
|-------------------------------------------------|-----------|
| 3.4 ANALIZA S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO (TLC) | 20        |
| 3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PRIDOBLENIH PODATKOV   | 22        |
| <b>4 REZULTATI</b>                              | <b>24</b> |
| 4.1 VSEBNOST TUJIH PRIMESI                      | 24        |
| 4.2 VSEBNOSTI VODE IN PEPELA                    | 25        |
| 4.3 VSEBNOST ETERIČNEGA OLJA                    | 27        |
| 4.4 KORELACIJE MED VSEBNOSTMI                   | 28        |
| 4.5 ANALIZA S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO (TLC) | 29        |
| <b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>                     | <b>33</b> |
| 5.1 RAZPRAVA                                    | 33        |
| 5.2 SKLEPI                                      | 35        |
| <b>6 POVZETEK</b>                               | <b>36</b> |
| <b>7 VIRI</b>                                   | <b>37</b> |
| <b>ZAHVALA</b>                                  | <b>43</b> |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                    | str. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Preglednica 1: Glavne sestavine in skupine sestavin eteričnega olja žajblja                                                                        | 6    |
| Preglednica 2: Razlike v sestavi eteričnih olj proizvedenih iz <i>S. officinalis</i> različnega izvora                                             | 8    |
| Preglednica 3: Celokupne mase vzorcev droge posameznih rastlin, delež stebel ter delež drugih tujih primesi                                        | 24   |
| Preglednica 4: Vsebnost vode v vzorcih ter delež pepela v osušenih vzorcih                                                                         | 25   |
| Preglednica 5: Mase vzorcev za destilacijo eteričnega olja, dobljeni volumni eteričnega olja ter koncentracije, preračunane na kilogram droge      | 27   |
| Preglednica 6: Rezultati analize TLC plošč glede hipotez, da je v ekstraktih večja vsebnost cineola in manjša vsebnost tujona kot v eteričnem olju | 30   |
| Preglednica 7: Izračunani retencijski faktorji za tujon, 1,8-cineol, borneol in ursolno kislino                                                    | 31   |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                 | str. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Slika 1: Topografski prikaz lokacije nabiranja vzorcev                                          | 16   |
| Slika 2: 'Ortofoto' (satelitski) posnetek lokacije nabiranja vzorcev                            | 16   |
| Slika 3: Skica Clevenger aparature                                                              | 19   |
| Slika 4: Razporeditev vzorcev na kromatografskih ploščah                                        | 22   |
| Slika 5: Frekvenčna distribucija vzorcev posameznih populacij glede na vsebnost vode            | 26   |
| Slika 6: Frekvenčna distribucija vzorcev posameznih populacij glede na vsebnost skupnega pepela | 26   |
| Slika 7: Frekvenčna distribucija vzorcev posameznih populacij glede na vsebnost eteričnega olja | 28   |
| Slika 8: Regresijska premica odvisnosti vsebnosti eteričnega olja od vsebnosti vode             | 29   |
| Slika 9: Primer razvite TLC plošče                                                              | 30   |

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|       |                                                                        |
|-------|------------------------------------------------------------------------|
| ANOVA | analiza razpršenosti (Analysis of Variance)                            |
| g     | gram                                                                   |
| kg    | kilogram                                                               |
| L.    | Linnaeus (Carl Linnaeus, avtor imena vrste <i>Salvia officinalis</i> ) |
| m/m   | masni delež                                                            |
| ml    | mililiter                                                              |
| mM    | milimolarna koncentracija                                              |
| MO    | monoterpenski ogljikovodiki                                            |
| OM    | oksigenirani monoterpeni                                               |
| OS    | oksigenirani seskviterpeni                                             |
| S.    | Salvia                                                                 |
| SO    | seskviterpenski ogljikovodiki                                          |
| TLC   | tankoplastna kromatografija (Thin Layer Chromatography)                |
| UV    | ultravijolično                                                         |
| μl    | mikroliter                                                             |

## 1 UVOD

### 1.1 ŽAJBELJ SKOZI ZGODOVINO

Žajbelj so visoko cenili že v antiki. Verjeli so, da pomaga proti kačjim pikom, varuje pred zlimi duhovi in podaljšuje življenje (Ceres, 1984; Galle-Toplak, 2002). Uporabljali so ga že v Egiptu, za povečanje ženske plodnosti (Schauenberg in Paris, 1990), prvi pa ga je v *Zgodovini rastlin* opisal grški mislec in botanik Teofrast (Dweck, 2000).

Plinij starejši v *Naturalis historia* (Clebsch, 2003) prvi zapiše latinsko ime za to rastlino – *salvia*, kot so jo poimenovali Rimljani. Ime izhaja iz glagola *salvere*, kar pomeni biti dobro, dobrega zdravja. Isti izvor ima tudi rimski pozdrav – *salve*.

Plinij žajblju pripisuje številne lastnosti: ceni ga kot diuretik (pospeševanje izločanja seča), hemostatik (zaustavljanje krvavitev, predvsem s krčenjem tkiva oz. žil), tonik (krepčilo), lokalni anestetik, sredstvo za pospeševanje menstruacije, zdravilo proti kačjim pikom ter v napitku s pelinom kot zdravilo za grižo (Dweck, 2000).

V zgodnjem srednjem veku, v času karolinškega imperija, so žajbelj gojili na samostanskih, grajskih in kmečkih vrtovih – Karel Veliki je v *Capitulare de villis* (kapitulariji oz. državne odredbe) celo zaukazal gojenje žajblja po vsem svojem cesarstvu (Galle-Toplak, 2002, Dweck, 2000).

Po legendi je žajbelj, poleg timijana, sivke in rožmarina, ena od glavnih sestavin 'Kisa štirih tatov', zeliščne mešanice, ki naj bi varovala pred kugo. Legenda pravi, da naj bi jo okoli 1630 leta ustvarili štirje roparji iz Toulousa, ki so praznili domove žrtev kuge po njihovem pogrebu, pri čemer pa sami niso zboleli; sčasoma so jih vendarle ujeli in obsodili na smrt, vendar jim nato vrnilo prostost v zameno za čudežno formulo za izdelavo tekočine, s katero so se mazali da so se obvarovali pred kugo (Mager, 2008).

Tudi star pregovor, razširjen tako v Angliji kot na celini (Clebsch, 2003), kaže na pozitivne vplive žajblja, in sicer na živčni sistem oziroma konkretno na paralizo: 'Žajbelj pomaga živcem in z njegovo mogočno močjo je paraliza ozdravljena in vročina zbeži' (prevod iz angleščine po Clebsch, 2003). Domnevo nadaljuje tudi John Gerard (16. stol.), ko v svoji *Zgodovini rastlin* govori o edinstvenem vplivu žajblja na glavo in možgane – da izostri čute in spomin, krepi moč in vitalnost ter celo povrne zdravje ljudem s paralizo in jih reši tresavice (Dweck, 2000).

Po neki drugi anekdoti naj bi ženske s podeželja jemale žajbelj s seboj v cerkev, ter si v primeru, da bi postale zaspane, pomagale zbuditi se z ovohavanjem njegovih listov (Dweck, 2000).

Do odkritja antibiotikov so žajbelj pogosto uporabljali kot sestavino zeliščnih čajev proti tuberkulozi in za preprečevanje potenja (Baričević in Bartol, 2000). Danes je v Evropi v zdravniški praksi žajbelj kot zdravilna učinkovina na splošno zapostavljen, še vedno pa se uporablja v ljudski medicini (Mager, 2008; Galle-Toplak, 2002; Dweck, 2000). Poleg tega je, zaradi okusa in antioksidativnih učinkov, še vedno zelo priljubljen kot začimba, pogosto pa je tudi sestavina preparatov za nego zob kot so zobne paste, ustne vode itd. (Baričević in Bartol, 2000).

## 1.2 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA

Namen dela je ovrednotiti kakovost posameznih naravnih populacij žajblja z dveh lokacij v Sloveniji (Petrinjski Kras). Kakovost populacij bomo vrednotili po predpisih, določenih s strani Evropske farmakopeje in populaciji primerjali med seboj po rezultatih farmakopejsko predpisanih analiz.

Delovna hipoteza je, da bo kakovost žajblja iz naravnih rastišč v skladu z merili kakovosti po Evropski farmakopeji, med posameznima populacijama pa se bo kakovost razlikovala. Predpostavljamo, da bo imela po starosti starejša naravna populacije žajblja v enaki fazi razvoja manjšo vsebnost eteričnega olja kot mlajša populacija.

Rezultati bodo lahko uporabljeni pri nadaljnjem vrednotenju naravnih populacij žajblja in načrtovanju strategij pridobivanja in uporabe žajblja.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 VRSTE ŽAJBLJA

#### 2.1.1 Taksonomska in genotipska karakterizacija

Žajbelj (*Salvia officinalis* L.) spada v deblo semenk (Spermatophyta), poddeblo kritosemenk (Magnoliophytina), razred dvokaličnic (*Magnoliopsidae*), red ustnatičevcev (Lamiales), družino ustnatic (Lamiaceae) in rod kadulj (*Salvia*) (Bisby in sod. 2010; Doljak in sod., 2005).

Rod *Salvia* (kadulje) je s skoraj 1000 vrstami eden najobsežnejših v kraljestvu rastlin; njegovi predstavniki so najbolj razširjeni v tropskih in subtropskih regijah – v Sredozemlju, v jugo-zahodni Aziji, južni Afriki in Ameriki (Radosavljevič in sod. 2010, Maksimovič in sod. 2007, Walker in sod. 2004, Hedge 1992). Vendar pa te različne vrste izkazujejo močno variabilnost v farmakoloških učinkih (bioaktivnosti) (Baričevič in Bartol, 2000). Precej manjše je število vrst, ki jih lahko najdemo na območju širšega Sredozemlja, medtem ko jih v srednji Evropi raste še manj – po oceni iz leta 1972 (Hedge, 1972), le 36 vrst.

Skupina *Salvia officinalis* sestoji iz osem do deset vrst, ki rastejo na področjih Sredozemlja in Bližnjega vzhoda, najznačilnejši predstavniki te skupine pa so *Salvia officinalis* L. (žajbelj, navadni žajbelj, vrtni žajbelj, dalmatinski žajbelj), *S. fruticosa* Mill. (grški žajbelj, znan tudi kot *S. triloba* L.) in *S. tomentosa* Mill. (Putievsky in sod., 1990, Simon in sod., 1984). Med njimi je najbolj reprezentativna in najbolj ekonomsko pomembna *Salvia officinalis* L. (Putievsky in sod., 1990), ki se uporablja kot zdravilna rastlina z mnogimi ugodnimi zdravilnimi učinki. Ima najbolj prefinjeno in karakteristično aromo, zaradi česar služi kot standard za primerjavo z dugimi vrstami žajblja (Radosavljevič 2010; Clebsch, 2003; Baričevič in Bartol, 2000; Simonin sod., 1984).

Žajbelj (*Salvia officinalis* L.) naravno raste na območju severnega Sredozemlja in sicer kot divja rastlina v apnenčastih in kraških pogorjih severne in osrednje Španije, južne Francije in zahodnega dela Balkanskega polotoka (Hedge, 1972). Na njem so bile izvedene številne raziskave sestave hlapnih snovi (Maksimovič in sod., 2007, navaja 8 različnih virov).

Vseeno pa obstaja dosti nejasnosti glede taksonomije in variabilnosti *S. officinalis* (Reales in sod., 2004). Genetska struktura populacij žajblja odraža medsebojni vpliv številnih procesov, med njimi fragmentacije habitata, izolacije populacij ter sprememb v njihovi porazdelitvi, mutacij, genetskega zdrsa, sistema razmnoževanja, genskega pretoka in selekcije (Slatokin, 1987; Schaal in sod., 1998).

Po raziskavah Maksimovičeve in sodelavcev (2007), je velikost žajbljevega genoma 0.97 pg/2C (število kromosomov  $2n = 14$ ) in bazno razmerje 38.55 GC %. Za genetske študije populacij in primerjave genotipov kot tudi za hitro in natančno metodo razlikovanja genotipov po Radosavljeviču in sodelavcih (2010) največ obljublja markerski sistem z mikrosateliti. V omenjenem članku je podrobneje opisan tudi razvoj novih mikrosatelitskih markerjev iz knjižnic genomske DNA obogatenih z GA in GT ponovitvami, na podlagi predhodno opisane metode za hmelj (*Humulus lupulus*), objavljene v Jakše in Javornik (2001).

### 2.1.2 Botanični opis

Botanični opis žajblja v tem poglavju je povzet po Christman (1999), Tobias (1995) in Simon in sod. (1984); citirane vrednosti predstavljajo razpon vrednosti v omenjeni literaturi.

Žajbelj (*Salvia officinalis* L.) je lesnata trajnica, med 20 in 80 (običajno do 60) cm visok grmiček s podobnim premerom, ki vsako leto iz spodaj olesenelega stebela požene šop volnato dlakavih, ravnih in gosto olistanih stebel. Mlada stebela so zelena in do sledečega leta olesenijo; so kvadrataste oblike, listi na njih pa so razporejeni v nasprotnih parih. Listi so mesnati, suličaste oblike, dolgi 5 do 8 cm, sive do srebrno-zelene barve in gosto poraščeni z dlačicami, kar jim daje žametno teksturo in omogoča dobro varovanje rastline pred močno sončno pripeko. Rastlina cveti med pozno zimo in zgodnjim poletjem, cvetovi pa so običajno svetlo vijoličaste, redkeje bele, rožnate ali modre barve. V cvetovih nastaja obilo medicine. Rastlina se lahko razvije iz semen kot tudi vegetativno razmnožuje.

*S. officinalis* je rastlina suhih, toplih predelov južne Evrope in Sredozemskega morja; v naravi in gojena raste na območjih Balkana, Turčije, Grčije, Krete, Italije in Španije; v Sloveniji raste v submediteranskem območju na suhih in kamnitih tleh. Optimalni rastni pogoji so v temperaturnem območju med 5 in 26 stopinj Celzija, pri 300 do 2600 mm letnih padavin in pH tal med 4,2 in 8,3. *S. officinalis* je sicer dobro prilagojena visokim temperaturam in pomanjkanju vode, vendar je občutljiva na daljša obdobja suše s hudo vročino. Pozimi lahko pri zelo nizkih temperaturah tudi pomrzne.

## 2.2 SESTAVA ŽAJBLJA

### 2.2.1 Eterično olje

#### 2.2.1.1 Vsebnost eteričnega olja v drogi *Salviae folium*

Eterično olje žajblja je prozorna, v vodi netopna tekočina blede rumene barve, ki ima značilno, močno aromo. V tem poglavju so podane okvirne vrednosti vsebnosti eteričnega olja v drogi *Salviae folium*; nadaljnje informacije in obrazložitve so navedene v poglavju Spremenljivost sestave in vsebnosti eteričnega olja.

Vsebnost je v literaturi običajno podana kot koncentracija v ml eteričnega olja na kg suhe mase droge, ali pa kot masni delež (% m/m) eteričnega olja v suhi drogi; to velja tudi za sledeče podatke.

Perry in sod. (1999) navajajo, za komercialno sorto navadnega žajblja iz Nemčije, povprečno koncentracijo eteričnega olja 11,1 ml/kg suhe teže listov.

Tobias (1995) navaja iz literaturnih podatkov vsebnost eteričnega olja v listih žajblja za najpomembnejša nabiralna področja Dalmacije med 16 ml/kg in 36 ml/kg.

Dob in sod. (2007) navajajo 0,9 % donos eteričnega olja pri destilaciji listov navadnega žajblja z naravnih rastišč v Alžiriji; enak rezultat dosegajo tudi Mirjalili in sod. (2006) pri rastlinah, vzgojenih iz semen Iranskega izvora.

Hayouni in sod. (2008) so imeli pri navadnem žajblju z gojišč v predmestjih Tunizije 0,58 % donos.

Santos-Gomes in Fernandes-Ferreira (2001) navajata donos eteričnega olja za žajbelj gojen na dveh različnih lokacijah na Portugalskem; na eni od lokacij dosega do 0,5 % na drugi do 1,0 %.

Taarit in sod. (2010) navajajo literaturne podatke precej večjih vrednosti za vsebnost eteričnega olja v žajblju s področja Francije, Češke, Romunije, Madžarske in Portugalske, in sicer med 2,05 % in 2,90 %.

#### 2.2.1.2 Komponente eteričnega olja žajblja

V literaturi (Hayouni in sod., 2008; Bernotiene in sod., 2007; Mirjalili in sod., 2006; Santos-Gomes in Fernandes-Ferreira, 2003; Santos-Gomes in Fernandes-Ferreira, 2001) so sestavine eteričnega olja žajblja najpogostejše razdeljene (na osnovi funkcionalnih skupin) na štiri skupine, ki predstavljajo tudi največji delež:

- monoterpeni ogljikovodiki (1,3 – 32,2 %)\*,
- oksigenirani monoterpeni (9,8 – 77,8 %)\*,
- seskviterpeni ogljikovodiki (6,2 – 26,3 %)\*,
- oksigenirani seskviterpeni (0,3 – 29,4 %)\*.

Glavno skupino torej predstavljajo oksigenirani monoterpeni, ki po raziskavah Mirjalili in sod. (2006) prevladujejo v vseh fenoloških fazah razvoja.

Po Bernotiene in sod. (2007) monoterpenoidi eteričnega olja žajblja na splošno izkazujejo protimikrobne, protivnetne in antioksidativne lastnosti. Biosintetizirajo se, tako kot tudi sicer manjšinski diterpenoidi, v celičnih plastidih (kloroplastih, kromoplastih, levkoplastih itd.), za razliko od seskviterpenoidov, ki so sintetizirani v citosolu (Bernotiene in sod., 2007).

Med glavne posamične sestavine eteričnega olja žajblja pa sodijo:

- po Evropski farmakopeji (Evropska farmakopeja 5.0, 2004):
  - tujoni in 1,8-cineol,
- po ISO 9909 (citirano v Bruneton, 1999):
  - alfa-tujon (18–43%), beta-tujon (3–8.5%), kafa (4.5–24.5%), 1,8-cineol (5.5 – 13%), alfa-humulen (0–12%), alfa-pinen (1–6.5%), kamfen (1.5–7%), limonen (0.5–3%), linalool (do 1%), bornil acetat (do 2.5%),
- poleg naštetih se v literaturi (Hayouni in sod., 2008; Bernotiene in sod., 2007; Mirjalili in sod., 2006; Santos-Gomes in Fernandes-Ferreira, 2001) pogosto kot pomembnejše pojavljajo še:
  - manool, borneol, viridiflorol in beta-kariofilen.

---

\* podatki predstavljajo razpon vrednosti v citirani literaturi

Preglednica 1: Glavne sestavine in skupine sestavin eteričnega olja žajblja

|                                      |              |                 |
|--------------------------------------|--------------|-----------------|
| <b>Monoterpenški ogljikovodiki</b>   | monociklični | limonen         |
|                                      | biciklični   | kamfen          |
|                                      |              | pinen           |
| <b>Oksigenirani monoterpeni</b>      | aciklični    | linalool        |
|                                      | monociklični | cineol          |
|                                      | biciklični   | borneol         |
|                                      |              | tujon           |
|                                      |              | kafra           |
| <b>Seskviterpenški ogljikovodiki</b> | monociklični | beta-kariofilen |
|                                      |              | humulen         |
| <b>Oksigenirani seskviterpeni</b>    | triciklični  | viridiflorol    |
| <b>Drugo</b>                         | biciklični   | bomil acetat    |
|                                      |              | manool          |

#### 2.2.1.2.1 Tujon

Tujon je nepolaren, biciklični monoterpenški keton.

V naravi se pojavlja kot mešanica *cis*- in *trans*- (oz. *alfa*- in *beta*-) tujona. Najdemo ga v pelinu (*Artemisia absinthium*), različnih vrstah kadulj (*Salvia*), navadnem vratiču (*Tanacetum vulgare*) in v različnih vrstah brinov (*Juniperus* spp.) in ceder (*Cedrus* spp.). Ima vonj podoben mentolu (EU Scientific Committee on Food, 2003).

V žajblju prevladuje alfa-tujon, ki pogosto predstavlja tudi glavno sestavino eteričnega olja (Bernotiene in sod., 2007; Bozin in sod., 2007; Delamare in sod., 2007; Evropska farmakopeja 5.0, 2004; ISO 9009 po Bruneton, 1999).

Bettaieb in sod. (2009) ugotavljajo, da se v sušnih razmerah v žajblju sintetizira kar za 93-95% manj alfa-tujona (za razliko od ostalih sestavin, katerih sinteza se je v sušnih razmerah povečala).

Tujoni in 1,8-cineol vplivajo na osrednji živčni sistem. Majhne doze enega ali drugega domnevno pripomorejo k povečanju človeške aktivnosti v težkih življenjskih pogojih, vendar pa kronični vnos tujonov lahko vodi do trajnih poškodb osrednjega živčnega sistema in povzroča epileptične napade ali demenco. Zato je doziranje eteričnega olja žajblja povezano oz. določeno s količino njegovih konstituent, kar se še posebno nanaša na kvantiteto tujonov (Bernotiene in sod., 2007).

Po raziskavah Koroch in sod., 2007; Delamare in sod., 2007; ter Dorman in Deans, 2000, ima alfa-tujon antibakterijsko aktivnost.

#### 2.2.1.2.2 Cineol

1,8-cineol, znan tudi kot evkaliptol, je monociklični monoterpenški oksid.

Čisti 1,8-cineol je brezbarvna, nevodotopna, vnetljiva tekočina, z grenko-sladkim, evkaliptovim okusom; ob zelo visokih koncentracijah je lahko nevarna ob zaužitju ali inhalaciji, ob kontaktu s kožo in očmi pa lahko deluje kot iritant (Material safety data sheet: Cineole, 2008).

Z 1,8-cineolom bogata eterična olja izkazujejo antibakterijsko aktivnost tako proti Gram-pozitivnim kot Gram-negativnim bakterijam, vključno z *Listeria monocytogenes*, ter antifungalno aktivnost proti kvasovki *Candida albicans* ter proti fitopatogenim glivam (Koroch in sod., 2007). Viljoen in sod. (2003) nadalje ugotavljajo sinergističen vpliv 1,8-cineola in kafre, ki imata proti *Candida albicans* skupaj močnejši antimikrobni učinek kot posamično.

Juergens in sod. (2003) pri 1,8-cineolu ugotavljajo protivnetno aktivnost s supresijo metabolizma arahidonske kisline in produkcije citokinov v človeških monocitih. S tem argumentirajo možnost uporabe cineola za zdravljenje hujših astmatičnih obolenj.

#### 2.2.1.2.3 Pinen

Pinen je biciklični monoterpenški ogljikovodik.

Kot tujon se tudi pinen pojavlja v naravi kot mešanica *cis*- in *trans*- (oz. *alfa*- in *beta*-) pinena; v eteričnem olju navadnega žajblja sta običajno obe izomeri zastopani enakovredno (Bernotiene in sod., 2007; Bozin in sod., 2007), kar pa ni splošno pravilo – npr. v rožmarinu (*Rosmarinus officinalis* L.) *alfa*- izomera močno prevladuje (Bozin in sod., 2007).

Po raziskavah Delamare in sod., 2007, ter Dorman in Deans, 2000, ima *alfa*-pinen antibakterijsko aktivnost, medtem ko Koroch in sod. (2007) po drugi strani ugotavljajo, da ni jasno, katera od izomer je bolj aktivna. Pinenom na splošno pripisujejo še antifungalno aktivnost, *alfa*-pinenu pa tudi šibko antioksidativno aktivnost, na podlagi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testa (Koroch in sod., 2007).

#### 2.2.1.3 Spremenljivost sestave in vsebnosti eteričnega olja

Sestava eteričnega olja žajblja se spreminja glede na različne parametre. Franz (1993) deli te parametre na tri skupine:

1. individualna genetska variabilnost,
2. variacija med različnimi rastlinskimi deli in različnimi razvojnimi fazami rastline,
3. modifikacije na račun okolja.

K 1. lahko prištevamo vpliv različnih populacij in razlik med posameznimi rastlinami žajblja, k 2. različne fenološke faze rastline, starostne razlike in razlike med rastlinskimi deli, iz katerih izoliramo eterično olje. Najobsežnejša je 3. skupina, v katero lahko uvrstimo mnogo vplivov, od lastnosti tal in klime (temperatura, vlaga, osvetlitev), stopnje onesnaženja, načina žetve in metod izolacije, do vplivov *in vitro* gojenja rastline.

##### 2.2.1.3.1 Individualna genetska variabilnost

Variabilnost vsebnosti in sestave eteričnega olja zgolj na podlagi genetske raznolikosti populacij oz. posameznih rastlin je seveda težko določljiva, saj jo močno prekrivajo okoljski vplivi in do neke mere tudi vplivi razvojnih faz rastline (glej spodaj). Po Tobias

(1995) lahko genski izvor močno vpliva na kemijsko zgradbo rastline in s tem tudi eteričnega olja, kot je bilo pokazano na poskusih gojenja različnih genskih virov žajblja na istem mestu z enakimi agrotehničnimi ukrepi.

Sodeč po Boelens in Boelens (1997), obstajata vsaj dva kemotipa *Salvia officinalis* – eden z nizko vsebnostjo alfa-tujona (4-8%) in drugi z relativno visoko (16-32%), medtem ko Tucker in Maciarello (1990) predlagata delitev na štiri kemotipe, glede na prevladujočo sestavino: alfa-tujon, beta-tujon, kafra ali 1,8-cineol.

Bernath in Nemeth (2000) nadalje ugotavljata veliko kemijsko raznolikost med naravnimi in/ali vzgojenimi populacijami (pregl. 2). V tem vidita perspektivno ozadje za delo v smeri selekcije, pri čemer pa opazata potrebo po podrobnejših raziskavah genetskih vplivov znotraj vrste *Salvia officinalis*, tako na populacijskem kot tudi na intrapopulacijskem nivoju (ugotavljata do 45% razlike med rastlinami znotraj populacije).

Preglednica 2: Razlike v sestavi eteričnih olj proizvedenih iz *S. officinalis* različnega izvora; po literaturnih podatkih, kot sta jih zbrala Bernath in Nemeth (2000)

| Sestavina (%) | Slovenija / 1 | Slovenija / 2 | Italija | Izrael | Španija | Madžarska | Slovaška |
|---------------|---------------|---------------|---------|--------|---------|-----------|----------|
| Alfa-tujon    | 10.7          | 9.9           | 39.3    | 55.0   | 22.8    | 23.9      | /        |
| Beta-tujon    | 2.6           | 3.2           | 3.0     | 10.0   | 4.3     | /         | 35.0     |
| Limonen       | 2.7           | 2.7           | 0.7     | /      | 0.8     | /         | 1.1      |
| 1,8-cineol    | 3.5           | 4.0           | 7.7     | 13.0   | 15.7    | 6.2       | 7.9      |
| Kafra         | 12.8          | 14.3          | 2.1     | 2.0    | 5.0     | 6.9       | 14.2     |
| Beta-pinen    | /             | /             | 7.2     | 1.0    | 8.9     | 3.3       | 2.1      |
| Alfa-humulen  | /             | /             | 12.4    | /      | 0.3     | /         | /        |

Putievsky in sod. (1992) so se ukvarjali z genskim vplivom žajblja: semena z naravnih rastišč navadnega žajblja z Jadranske obale so prenesli in vzgajali v Izraelu. Pokazali so, da so vzgojene rastline morfološko in po vsebnosti ter sestavi eteričnega olja podobne svojim divje rastočim prednikom. Tako so ugotovili pri rastlinah rastočih oz. izvirajočih iz severne ali južne Dalmacije podobno sestavo eteričnega olja (27% tujona, 30-33% kafre), medtem ko se sestava eteričnega olja populacij iz osrednje Dalmacije, s 47% tujona in pod 14% kafre, precej razlikuje.

Bernath in Nemeth (2000) nadalje ugotavljata dobro predispozicijo navadnega žajblja za selekcijsko žlahtnenje zaradi enostavnosti razmnoževanja tako vegetativno, s potaknjenci, kot generativno z vzgojo iz semen. Navajata tudi uspešne rezultate s tega področja, kjer gre selekcija predvsem v smeri zvišanja koncentracije tujonov in zmanjšanja koncentracije kafre v eteričnem olju, ali pa so rastline selekcionirane glede na svoje morfološke in aromatične lastnosti.

Selekcijski pristop naj bi se izkazal za primernejšega tudi zaradi zelo nepredvidljivih rezultatov križanj navadnega žajblja, ki kažejo na prisotnost aditivnih in epistaznih genskih lastnosti pri regulaciji nastanka sestavin eteričnega olja (Franz, 1994).

#### 2.2.1.3.2 Variacija med rastlinskimi deli in razvojnimi fazami

Najprej velja omeniti celokupno vsebnost eteričnega olja, ki jo lahko dobimo iz biomase posameznih delov rastline. Tako lahko največ eteričnega olja pridobimo iz žajbljevih cvetov (19% požete biomase, od tega 1,6% eteričnega olja), nekoliko manj iz listov (15% biomase, od tega 1,1% eteričnega olja) in najmanj iz stebel (66% biomase, od tega 0,05% eteričnega olja) (Perry in sod., 1999).

Vsebnost tujonov dosega najvišji delež v stebelu rastline (55%), nižjega v listih (30%) in najnižjega v cvetu (20%), medtem ko vsebnost pinenov izkazuje, ravno obratno, najvišji delež v cvetu (18%), nižjega v listih (2%) in najnižjega v stebelu (1%) (Santos-Gomes in Fernandes-Ferreira, 2001; Perry in sod., 1999).

Po raziskavah Santos-Gomes in Fernandes-Ferreira (2001), dosegajo v cvetu navadnega žajblja približno enak delež (okoli 17%) alfa-tujon, beta-pinen in 1,8-cineol, medtem ko v listih prevladujeta alfa-tujon (25%) in kafa (20%) in v stebelu izrazito alfa-tujon (55%). V eteričnem olju iz posameznih organov so prisotne tudi za ta organ specifične spojine, ki pa vedno predstavljajo le majhen delež.

Skupino z najvišjim deležem (kot že omenjeno pri sestavi eteričnega olja žajblja) predstavljajo oksigenirani monoterpeni (OM), ki jim po vrsti sledijo monoterpeni ogljikovodiki (MO), seskviterpeni ogljikovodiki (SO) in oksigenirani seskviterpeni (OS), in sicer s sledečimi medsebojnimi razmerji med OM/MO in OS/SO: v cvetovih 1.74:1 in 0.35:1, v listih 6.43:1 in 0.87:1 ter v steblih 8.83:1 in 0.87:1 (Santos-Gomes in Fernandes-Ferreira, 2001).

Ker se pri žetvi žajblja za izolacijo eteričnega olja navadno nabira celoten nadzemni del rastline, se je potrebno zavedati, da na kemijsko sestavo (oz. kvaliteto) eteričnega olja močno vpliva razmerje med posameznimi deli rastlin v biomasi (predvsem med cvetovi in listi, saj je v steblih le malo eteričnega olja).

Sestava eteričnega olja pa je odvisna tudi od fenološke faze, v kateri je rastlina ob žetvi. Mirjalili in sod. (2006) ugotavljajo, da gre tako za kvantitativne kot za kvalitativne razlike. Tako dobimo največji delež eteričnega olja (masni delež, v % suhe mase) v fazi tvorbe cvetnih brstov (0,9%), potem pa si po vrsti sledijo vegetativna faza (0,7%), cvetenje (0,5%) in faza nedozorelih plodov (0,4%). Najmanjši delež eteričnega olja dobimo v fazi zrelih plodov (0,2%). Oksigenirani monoterpeni, ki predstavljajo skupino z največjim deležem v vseh fenoloških fazah, dosegajo največjo koncentracijo (56,9 %) v fazi zrelih plodov.

Skozi fenološki cikel se delež alfa-tujona močno poveča v fazi zrelih plodov, medtem ko se deleža 1,8-cineola in beta-pinena postopoma večata od vegetativne faze do faze cvetenja in nato upadata med tvorbo plodov. Kafa dosega najvišji odstotek (7,1%) v vegetativni fazi, medtem ko je najvišji odstotek borneola (11%) v fazi cvetenja. Enako kot alfa-tujon in beta-pinen nihajo tudi celokupni deleži tujonov in pinenov (Mirjalili in sod., 2006).

Santos-Gomes in Fernandes-Ferreira (2001) poročata tudi o vplivu starosti rastline oz. njenih delov na relativni delež tujonov, pinenov in kafe. Od vrha rastline proti bazalnemu nodiju (torej od mlajšega proti starejšemu delu rastline) delež tujonov pada, medtem ko deleža pinenov in kafe naraščata, kot to ugotavljajo tudi Länger in sod. (1993, 1998). Do nasprotnih rezultatov glede kafe pa so prišli Funk in sod. (1992), ki poročajo o močnem padcu vsebnosti kafe s staranjem, zaradi laktonizacije v vodotopni metabolit.

#### 2.2.1.3.3 Modifikacije na račun okolja

Ta skupina vplivov na vsebnost in sestavo je najobsežnejša in najkompleksnejša. Kljub temu Perry in sod. (1999) ugotavljajo, da so vplivi okolja pomembni le posredno, s tem ko določajo razvoj rastline in s tem razmerje in starost rastlinskih delov, katerih vpliv na vsebnost in sestavo eteričnega olja je obravnavan v prejšnjem razdelku.

Giannouli in Kintzios (2000) ugotavljata, da je uspešna kultivacija žajblja z namenom pridobivanja eteričnega olja možna v velikem spektru okoljskih pogojev, v nasprotju s prepričanjem, da je pridelava visoko kvalitetnega eteričnega olja možna le iz rastlin, živečih pod stresnimi pogoji (visoka temperatura, suša, nizka fertilnost; Hay, 1993), za kar pa so potrebne nadaljnje raziskave posameznih okoljskih vplivov v kontroliranih pogojih.

Zanimiv je vpliv svetlobe kot so ga proučevali Yan Li in sod. (1996), ki so gojili žajbelj v rastlinjaku pod različnimi senčili ali brez njih, s čimer so zagotovili svetlobne pogoje od 15% do 100% polne sončne svetlobe. Najvišja vsebnost olja je bila v rastlinah, gojenih pri 45% sončne svetlobe, pri tem nivoju pa je imelo olje tudi največji delež alfa-tujona in manjši delež kafre. Površina listov in gostota dlačic na njih sta se zmanjševala z manjšanjem intenzitete svetlobe.

Bettaieb in sod. (2009) ugotavljajo, da lahko zmerno pomanjkanje vode kljub negativnemu učinku na morfologijo rastline in s tem zmanjšanju suhe mase rastline (do 17%), vpliva na povečanje vsebnosti eteričnega olja v listih žajblja (iz 0,39 g/100g na 1,77 g/100g suhe mase), kot tudi na višjo koncentracijo alfa-tujona, 1,8-cineola in kafre v eteričnem olju.

Mineralna fertilizacija tal po ugotovitvah Piccaglia in Marotti (1993) nima pomembnejšega vpliva na sestavo eteričnega olja žajblja. Onesnaženost s težkimi kovinami kot so kadmij, baker, svinec in cink, ima po drugi strani močen vpliv na sestavo, kar se med drugim odraža v zmanjšanju koncentracij tujonov ter zvečanju koncentracij kafre in 1,8-cineola, kar negativno vpliva na kakovost eteričnega olja (Stancheva in sod., 2009).

Taarit in sod. (2010) ugotavljajo kompleksen vpliv stopnje slanosti (NaCl) na rast navadnega žajblja ter vsebnost in sestavo njegovega eteričnega olja. Tako ima povečevanje slanosti od 0 do 100 mM koncentracij premo negativen vpliv na rast žajblja. Povečevanje slanosti do 75 mM po drugi strani vpliva tudi na večanje vsebnosti eteričnega olja (0,66% m/m eteričnega olja pri 0 mM NaCl in 2,09% eteričnega olja pri 75 mM NaCl), ki pa pri nadaljnjem povečevanju koncentracije soli ponovno upade. Pri 25 mM NaCl se poveča odstotek 1,8-cineola in kafre v sestavi eteričnega olja, pri 75 mM pa se poveča predvsem odstotek alfa-tujona. Pri 100 mM koncentracijah se sestava močno spremeni, predvsem upade odstotek 1,8-cineola.

Santos-Gomes in Fernandes-Ferreira (2003) sta ob primerjavi sestave eteričnega olja, pridobljenega iz *in vitro* vzgojenih rastlin žajblja, s sestavo eteričnega olja iz *in vivo* gojenih rastlin ugotovila mnogo manjšo stopnjo variabilnosti prvih, kar bi sicer omogočalo tudi boljšo in konsistentnejšo kontrolo kvalitete eteričnega olja, vendar pa koncentracije alfa-tujona pri *in vitro* rastlinah ne dosegajo minimuma, predpisanega v ISO 9909.

### 2.2.2 Druge sestavine listov žajblja

Eterično olje žajblja torej predstavlja le del (do cca. 3%) sestave droge *Salviae folium*. Posušeni listi žajblja vsebujejo še čreslovine (3-7%), med njimi rožmarinsko kislino; nehlapno diterpensko grenčino karnozol (pikrosalvin) in sorodno negrenko karnozolno kislino, triterpenske kisline (ursolna in oleanolna) ter triterpen germanikol in flavonoide (luteolin in njegovi derivati, npr. salvigenin, ki predstavlja 1-3%) (Galle-Toplak, 2002; Baričević, 1996; Tobias, 1995).

Učinek posameznih sestavin je opisan v nadaljevanju, kjer so opisani tudi učinki eteričnega olja in droge kot celote.

## 2.3 UPORABA

Farmakološki učinki droge žajblja gredo predvsem na račun eteričnega olja (protimikrobno, antioksidativno, protivnetno delovanje) in čreslovin (adstringentno, antioksidativno delovanje), zaradi česar se večinoma uporablja pri vnetjih v ustni votlini in žrelu ter za podporno zdravljenje vnetij želodčno-črevesnega trakta (Hayouni in sod., 2008; Bernotiene in sod., 2007; Galle-Toplak, 2002; Baričević in Bartol, 2000; Baričević, 1996). Poleg omenjenih glavnih uporabnih učinkov, se žajblju pripisuje še delovanje na centralni živčni sistem (CŽS) in antihidrotična aktivnost, raziskave pa so bile narejene tudi v smeri antimutagenih in protitumorskih učinkov (glej 2.3.4).

### 2.3.1 Protimikrobno delovanje

Hayouni in sod. (2008) ugotavljajo povezavo med protimikrobno aktivnostjo eteričnega olja žajblja in kemotipom rastline – tako naj bi imela močnejši učinek eterična olja rastlin z večjim odstotkom 1,8-cineola, tujonov, pinenov, kafre in borneola, za katere citirajo posamične protimikrobne efekte. Isti avtorji zaradi protimikrobne aktivnosti predlagajo žajbljevo eterično olje kot naravni konzervans v prehrambeni oz. farmacevtski industriji.

Do podobnih ugotovitev so prišli Bernotiene in sod. (2007), ki eteričnemu olju žajblja tujonskega kemotipa pripisujejo poudarjene protivirusne in antifungalne lastnosti, žajbelj pa predlagajo kot sredstvo za celjenje ran in v kozmetične namene (nega kože in las).

Delamare in sod. (2007) ugotavljajo, da za žajbljevo eterično olje, tako kot za rastlinska eterična olja na splošno, velja večja učinkovitost proti Gram-pozitivnim kot proti Gram-negativnim bakterijam, kar gre na račun zunanje membrane slednjih, ki je skorajda neprepustna za lipofilne molekule, ki so nosilci protimikrobnih učinkov v eteričnih oljih. Po British Herbal Compendium (2006) te distinkcije ni, saj naj bi žajbljevo eterično olje imelo močne protimikrobne učinke tako na Gram-pozitivne kot na Gram-negativne bakterije, poleg tega pa tudi na spekter glavnih mikroorganizmov.

Tudi Baričević in Bartol (2000) navajata različna mnenja iz literaturnih podatkov glede vpliva na Gram-negativne in Gram-pozitivne bakterije, hkrati pa ugotavljata nižjo protibakterijsko in antifungalno aktivnost eteričnega olja žajblja v primerjavi z eteričnimi olji drugih pripadnic ustnatic (predvsem *Thymus* spp. in *Origanum* spp.)

Ista avtorja navajata inhibitoren efekt eteričnega olja žajblja na številne bakterije ustne votline, in sicer predvsem na obligatne anaerobe, efekt pa naj se ne bi zmanjšal tudi pri

mikroenkapsulaciji. Po drugi strani naj bi se fungistatičen vpliv zelo razlikoval v odvisnosti od vrste glive, glavna učinkovina pa naj bi bili, kot pri protibakterijski aktivnosti, tujoni (Baričevič in Bartol, 2000).

Protivirusno delovanje ekstraktov žajblja ugotavljajo tako v British Herbal Compendium (2006), kot Baričevič in Bartol (2000) ter Manolova in sod. (1995), in sicer predvsem na račun diterpenoidov saficinolida (učinkovit proti virusu vezikularnega stomatitisa) in sageona (aktiven proti herpes simplex virusu). Po raziskavah Manolove in sod. (1995) pa naj bi imeli vodno-alkoholni ekstrakti nadzemnih delov žajblja v poskusu s tkivnimi kulturami zaviralni učinek tudi na viruse influence tipov H1N1 in H3N2.

### 2.3.2 Antioksidativno delovanje

Bozin in sod. (2007) ugotavljajo pomembno antioksidativno delovanje eteričnega olja žajblja, kar povezujejo predvsem s prisotnostjo oksigeniranih monoterpenov in seskviterpenskih ogljikovodikov v njegovi sestavi. Uporabo ekstraktov žajblja kot antioksidativne učinkovine zato avtorji predlagajo ne le v namene prehrambene in kozmetične produkcije, temveč tudi za preventivo in zdravljenje različnih človeških bolezni.

Pizzale in sod. (2002) so preizkušali antioksidativno delovanje metanolnih ekstraktov žajblja, pri čemer so ugotovili nekoliko šibkejše antioksidativno delovanje navadnega žajblja *S. officinalis* v primerjavi s *S. fruticosa*, ki pa je bilo vseeno močnejše kot v vzporednih poskusih z origanom. Največjo korelacijo z antioksidativno aktivnostjo žajblja naj bi imeli karnozolna kislina, karnozol in metil karnozat.

Baričevič in Bartol (2000) poleg omenjenim sestavinam visoko antioksidativno aktivnost pripisujeta še rozmanolu in rožmarinski kislini, v splošnem pa vsem fenolnim spojinam v žajblju. Enako poročajo v British Herbal Compendium (2006).

Avtorji se na splošno strinjajo o zahtevnosti določitve antioksidativne aktivnosti zaradi različnih načinov učinkovanja aktivnih sestavin, ki ima za posledico velike razlike v rezultatih, pridobljenih z različnimi metodami merjenja antioksidativnega potenciala (Bozin in sod., 2007; Pizzale in sod., 2002).

### 2.3.3 Protivnetno delovanje

Baričevič in Bartol (2000) ter British Herbal Compendium (2006) poročajo o protivnetnem delovanju ekstraktov navadnega žajblja, površinsko nanešenih na mesto vnetja, medtem ko Bernotiene in sod. (2007) pripisujejo protivnetno aktivnost tudi eteričnemu olju žajblja oz. monoterpenoidom v njem.

Baričevič in sod. (2001) nadalje poročajo o protivnetnem delovanju triterpenov ursolne in oleanolne kisline in diterpena karnozola, pri čemer naj bi bil protivnetni učinek predvsem posledica delovanja ursolne kisline. Slednja je v najvišjih koncentracijah prisotna v kloroformskih ekstraktih žajblja (predstavlja skoraj 50%). Na podlagi teh ugotovitev in dokazanih razlik v protivnetnem delovanju različnih virov žajblja, avtorji predlagajo določitev vsebnosti ursolne kisline kot kontrolno mero kakovosti za žajbelj z namenom uporabe za pripravke s površinsko protivnetno aktivnostjo.

### 2.3.4 Drugi učinki

Žajblju se pripisuje tudi pomemben vpliv na živčni sistem; tako v British Herbal Compendium (2006) navajajo pozitivne učinke listov žajblja na kognitivno sposobnost in razpoloženje zdravih mladih prostovoljcev in na kognitivno sposobnost starejših bolnikov z milo do zmerno obliko Alzheimerjeve bolezni (Akhondzadeh in sod., 2003).

Metanolni ekstrakt žajblja izkazuje afiniteto do benzodiazepinskih receptorjev v človeških možganih s kompetitivno zamenjavo specifičnih benzodiazepinskih antagonistov, pri čemer sta najbolj aktivna diterpen galdosol in flavon hispidulin (British Herbal Compendium, 2006).

Za žajbelj je značilna tudi antihidrotična aktivnost, o čemer poročajo mnogi avtorji (HMPC, 2009; British Herbal Compendium, 2006; Galle-Toplak, 2002; Baričevič in Bartol, 2000). Žajbljevi listi so uporabni za preprečevanje potenja, predvsem kadar je to posledica tuberkuloze ali drugih infekcijskih bolezni, premočnega delovanja žleze ščitnice ali pa je živčnega izvora (Galle-Toplak, 2002).

Ursolna kislina in karnozol naj bi imela tudi protitumorske lastnosti – predvsem ursolna kislina naj bi bila po sposobnosti preprečevanja tvorbe tumorjev primerljiva z retinojsko kislino, ki je znan inhibitor promocije tumorjev (Baričevič in Bartol, 2000).

Poleg tega naj bi imelo eterično olje žajblja tudi antimutageni potencial proti UV-induciranim in spontanim mutacijam. Za to naj bi bili odgovorni alfa-tujon, 1,8-cineol, kafa in alfa-humulen, vendar pa so podatki o antigenotoksičnih efektih teh terpenov omejeni; terpenoidi eteričnega olja žajblja so zato zanimivi za nadaljnje študije antimutagenosti in antikarcinogenosti (Knežević-Vukčević in sod., 2005).

### 2.3.5 Toksičnost

Žajbelj in njegovi pripravki imajo lahko tudi toksične učinke, kar gre predvsem na račun tujona in kafe; pri inhalaciji ali ingestiji previsokih koncentracij eteričnega olja poročajo o napadih, podobnim epileptičnim, ki izvirajo iz centralnega živčnega sistema. Tudi vsakodnevna injekcija subkliničnih doz eteričnega olja ima kumulativen toksičen efekt s podobnimi rezultati (Baričevič in Bartol, 2000).

V monografiji Odbora za zdravila rastlinskega izvora je predpisan sprejemljiv dnevni vnos čaja za pitje z 1-2 g droge trikrat dnevno, vendar največ za dva tedna, vnos tujona pa ne sme preseči 5 mg dnevno (Committee On Herbal Medicinal Products, 2009).

Previdnost je potrebna tudi zaradi interakcije z drugimi zdravili; žajbelj lahko interferira s hipoglikemičnimi in antiepileptičnimi tretmaji in potencira sedativni učinek drugih drog. Zaradi visoke vsebnosti tujonov, za katere je znano abortivno delovanje, je žajbelj kontraindiciran v nosečnosti (Baričevič in Bartol, 2000).

## 2.4 VREDNOTENJE KAKOVOSTI ZDRAVILNIH RASTLIN

Vsekakor je, zaradi njegove kompleksne in variabilne sestave, težko predvideti korelacijo med farmakološko aktivnostjo žajblja in vsebnostjo posameznih spojin, kar posledično problematizira enoznačno ovrednotenje kakovosti droge v farmakološkem smislu glede na kvantiteto posameznih sestavin. Vendar pa nekateri raziskovalci vseeno poročajo o povezavi med deležem najbolj zastopanih sestavin v eteričnem olju in njegovo aktivnostjo (Hayouni in sod., 2008).

Kakovost rastlinskih drog in standarde kakovosti opredeljujejo, če naštejemo le najpomembnejše (po Baričevič, 1996):

- farmakopejske zahteve (Evropska farmakopeja in druge) – te predpisujejo identifikacijo droge in določitev čistote ter določitev vrednosti (minimalna vsebnost aktivne učinkovine),
- ISO standardi – ti nekoliko natančneje predpisujejo sestavo droge oz. vsebnosti aktivnih učinkovin v njej,
- pravila, ki usmerjajo kakovost zdravilnih proizvodov v Evropski skupnosti (npr. HMPC – Odbor za zdravila rastlinskega izvora v okviru EMEA – Evropske agencije za zdravila),
- zasebni standardi, določeni na podlagi pogodb med farmacevtskimi tovarnami in drugimi kooperanti; ta pravila so strožja kot farmakopejski predpisi.

Odločili smo se za determinacijo kakovosti navadnega žajblja *Salvia officinalis* L. oz. droge *Salviae folium* po merilih Evropske farmakopeje. Ta predpisuje (Evropska farmakopeja 5.0, 2004) določitev vsebnosti eteričnega olja v drogi ter vsebnosti tujih primesi, vode in skupnega pepela; za te vrednosti so podane meje:

- minimalno 15 ml/kg eteričnega olja v celi drogi in minimalno 10 ml/kg v rezani drogi,
- maksimalno 3% stebel in maksimalno 2% drugih tujih primesi v drogi,
- maksimalno 100 ml/kg vsebnosti vode v drogi,
- maksimalno 10,0 % skupnega pepela.

Poleg omenjenih predpisov je naveden še identifikacijski test določitve skupnih tujonov in cineola s tankoplastno kromatografijo (TLC).

### 3 MATERIAL IN METODE

Vrednotili smo kakovost rastlin žajblja (*Salvia officinalis* L.) z dveh naravnih rastišč v Sloveniji, pri čemer smo izhajali iz monografije za žajbljeve liste (*Salviae folium*) v Evropski farmakopeji (Evropska farmakopeja 5.0, 2004). Ta zahteva določitev vsebnosti tujih primesi, vode in celokupnega pepela v drogi ter analizo eteričnega olja, ki zajema določitev koncentracije eteričnega olja v drogi in vsebnosti tujonov ter cineola v njem.

Eterično olje smo pridobili z vodno destilacijo s Clevenger aparaturom, prisotnost tujonov in cineola pa smo preverjali s tankoplastno kromatografijo (TLC).

Delo je potekalo na Oddelku za agronomijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, v laboratorijih Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko ter Katedre za pedologijo in varstvo okolja, in sicer v koncu leta 2009 in začetku 2010.

#### 3.1 RASTLINSKI VZORCI

Rastline (listi) so bile nabrane v juliju 2009 na dveh lokacijah, ki predstavljata dve različni populaciji žajblja. Rastišči sta naravni, z vrstami žajblja (*Salvia officinalis* L.), ki so na razmere Petrinjskega klasa dobro prilagojene. Populacija žajblja na rastišču B (glej spodaj) je bila po starosti starejša od populacije na rastišču A, kar je bilo razvidno iz drugačne morfologije rastlin (debelejša in bolj olesenela stebela, manjše število listov na rastlini).

*Rastišče A: Petrinjski kras; 0,9 km južno of Petrinj*

Geografska širina (N): 45° 33' 59,58"

Geografska dolžina (E): 13° 54' 19,43"

Nadmorska višina: 464 m

*Rastišče B: Petrinjski kras; 0,6 km jugo-zahodno od Petrinj*

Geografska širina (N): 47° 19' 35"

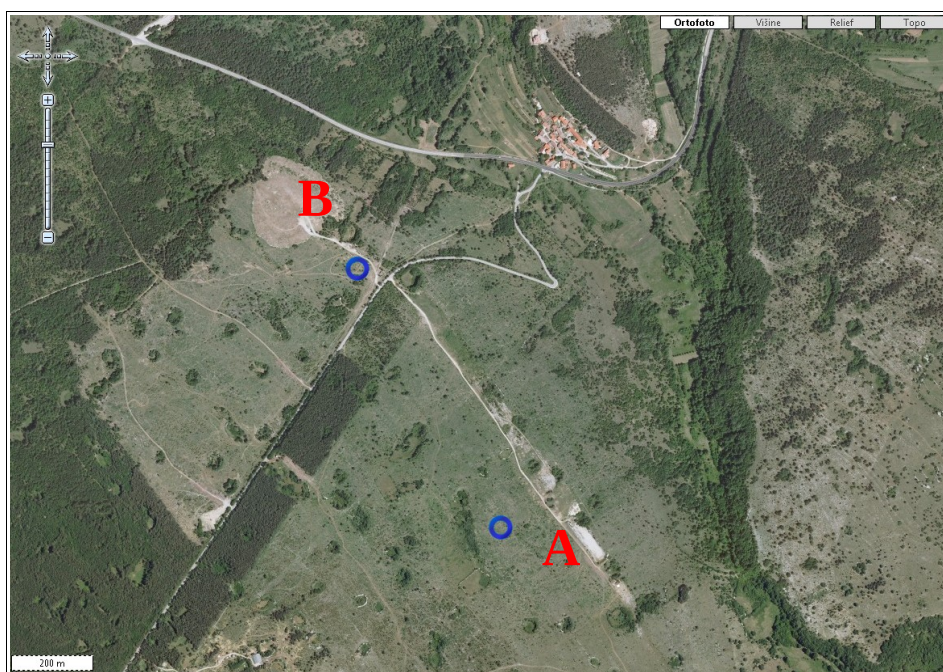
Geografska dolžina (E): 13° 51' 53,75"

Nadmorska višina: 450 m

Vsak vzorec predstavlja liste posamezne rastline, in sicer je bilo analiziranih po 25 vzorcev za vsako od populacij. Nabrani listi so bili posušeni v sušilnikih (okoli 40°C, krožna ventilacija) do konstante mase (2-3 dni). Do analiz so bili shranjeni v papirnatih vrečkah v prostorih Biotehniške fakultete, na Jamnikarjevi 101 v Ljubljani.



Slika 1: Topografski prikaz lokacije nabiranja vzorcev (označen). Vir: Geopedia – interaktivni spletni atlas in zemljevid Slovenije



Slika 2: 'Ortofoto' (satelitski) posnetek lokacije nabiranja vzorcev; označeni sta rastišči A in B, na zgornji desni strani slike pa je vidno naselje Petrinje. Vir: Geopedia – interaktivni spletni atlas in zemljevid Slovenije

### 3.2 DOLOČANJE TUJIH PRIMESI, VODE IN CELOKUPNEGA PEPELA

#### Uporabljen material:

- rastlinski material – posušeni listi žajblja (glej 3.1).

#### Uporabljene aparature:

- vodno hlajeni analizni mlinček (z volumnom bobna okoli 100 ml),
- posodice iz zatemnjenega stekla in z alu-folijo ovite posodice iz navadnega stekla za shranjevanje zmletih vzorcev,
- tehtiči za določanje izgube pri sušenju,
- talilni lončki za določanje celokupnega pepela,
- precizna tehtnica (5 decimalnih mest),
- eksikator,
- sušilnik,
- žarilnik,
- peč.

#### Postopek:

##### *Določanje tujih primesi*

Vsebnost tujih primesi smo določali z metodo makroskopske determinacije.

Rastlinski material posameznega nabranega vzorca smo razpostrli v tanki plasti. Z vizualnim pregledom smo izločili tuje primesi, in sicer najprej stebila in druge nezaželenne rastlinske dele, ter nato še druge tuje delce v drogi *Salviae folium*, jih stehtali, in izračunali njihov delež glede na celotno suho maso rastlinskega vzorca.

Izračun vsebnosti tujih primesi, podane kot masni delež [%]:

$$100 * m_x / m_0 \quad \dots (1)$$

kjer je:

$m_0$  – masa suhega nabranega rastlinskega vzorca [g],

$m_x$  – masa tujih primesi [g].

Izračune smo naredili posebej za vsebnost stebel in drugih nezaželenih rastlinskih delov ter posebej za vsebnost drugih tujih primesi.

##### *Mletje vzorcev*

Od posameznega vzorca smo odstranili stebila in druge tuje primesi, ga ročno zmečkali in stresli v vodno hlajeni analizni mlinček, in sicer v takšni količini, da smo z vsakim mletjem dobili 5-10 g uprašenega vzorca.

Uprašene vzorce smo spravili v posodice iz zatemnjenega stekla in posodice iz navadnega stekla ovite z alu-folijo (ker bodo zmleti vzorci uporabljeni v nadaljnjih raziskavah za določanje antioksidativne aktivnosti), ter jih spravili v temnem prostoru na sobni temperaturi.

#### *Določanje vsebnosti vode*

Vsebnost vode smo določali z metodo izgube vode pri sušenju vzorca na 105 °C, kar se razlikuje od farmakopejsko predpisanega testa določitve vsebnosti vode z azeotropsko metodo. Metoda izgube pri sušenju se nam je zdela primernejša zaradi manjše škodljivosti te metode v primerjavi z azeotropsko, kjer bi morali porabiti velike količine organskih topil (200 ml toluena na vzorec).

Tehtiče, v katerih smo sušili vzorce, smo predhodno očistili in osušili ter stehtali. Vanje smo dodali zmlete vzorce (okoli 2 g), jih ponovno stehtali in (odčepljene) sušili v sušilniku na 105 °C čez noč (do konstantne mase). Po sušenju smo tehtiče začepili in ohladili v eksikatorju ter stehtali.

Izračun izgube pri sušenju, podane kot masni delež [%]:

$$100 * (m_0 - m_1) / (m_0 - m_T) \quad \dots (2)$$

kjer je:

$m_0$  – masa tehtiča in vzorca [g],  
 $m_1$  – masa tehtiča in osušenega vzorca [g],  
 $m_T$  – masa pripravljenega tehtiča [g].

#### *Določanje vsebnosti celokupnega pepela*

Celokupni pepel smo določali z metodo določitve razlike v masi materiala pred in po sežigu vzorca.

Talilne lončke smo segreli do rdečega žarenja (1 ura v peči na 550 °C), jih ohladili v eksikatorju in stehtali. V lončke smo dodali osušene vzorce (okoli 1,5 g) in jih stehtali, ter nato sežgali na sežigalniku do rdečega žarenja. Potem smo lončke prestavili v peč in jih žarili do konstantne mase (čez noč na 550 °C). Po končanem žarenju smo vzorce ohladili v eksikatorju in stehtali.

Izračun vsebnosti pepela, podane kot masni delež [%]:

$$100 * (m_1 - m_L) / (m_0 - m_L) \quad \dots (3)$$

kjer je:

$m_0$  – masa talilnega lončka in osušenega vzorca [g],  
 $m_1$  – masa talilnega lončka in ostanka po žarenju [g],  
 $m_L$  – masa pripravljenega talilnega lončka [g].

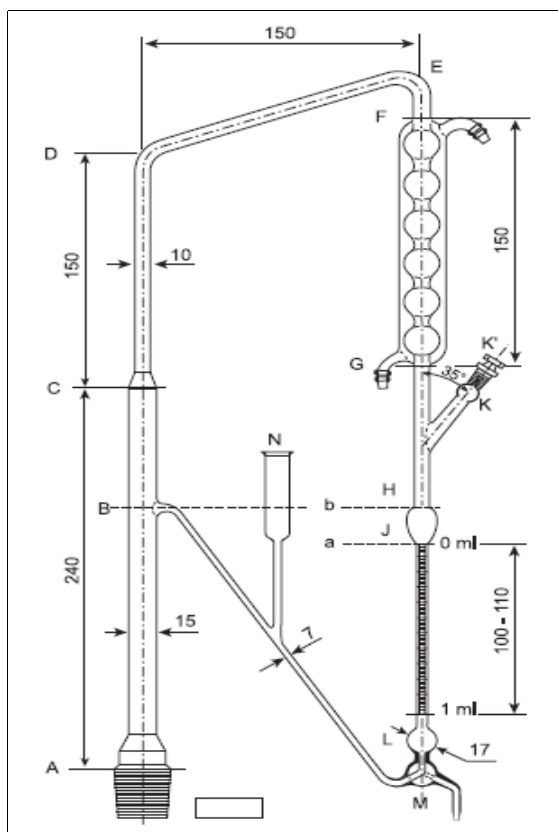
### 3.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI ETERIČNEGA OLJA

#### Uporabljen material:

- rastlinski material – posušeni listi žajblja (glej 3.1),
- destilirana voda,
- detergent in 70% etanol za čiščenje aparatur.

#### Uporabljene aparature:

- bučke (500 ml),
- stojala,
- tehtnice,
- čaše,
- grelci,
- viala iz temnega stekla,
- Clevenger aparature (sl. 3)



Slika 3: Skica Clevenger aparature (Evropska farmakopeja 5.0, 2004). Clevenger aparatura je posebej oblikovana steklena aparatura za destilacijo eteričnega olja v analitske namene. Sestavljena je iz kondenzorske cevi, ki vodi iz bučke, hladilnika, bočne cevi z oddušnikom, zbirnika z merilom, trikotnega ventila in građuirane cevke.

### Postopek:

Eterično olje smo pridobili s pomočjo vodne destilacije s Clevenger aparaturo.

Aparaturo in 500 ml bučko smo pred vsako destilacijo dobro oprali z detergentom in vodovodno vodo, oplaknili z etanolom in sprali še z destilirano vodo.

Rastlinskemu materialu smo odstranili stebela in druge tuje primesi, po 20 g droge zatehtali in grobo zdrobili v 500 ml bučko ter vzorec prelili z 250 ml destilirane vode. Ker je bilo pri nekaterih vzorcih droge premalo za vse analize, smo uporabili 15 g droge in temu ustrezen volumen, 205 ml destilirane vode. Za razliko od farmakopejske metode smo destilacijo izvedli brez organskega topila (glej komentar k 3.2 – Določanje vsebnosti vode).

Vzorci smo s pomočjo ustreznih grelcev zavreli in nato ob zmernem segrevanju destilirali 2 uri. Po končani destilaciji smo odčitali volumen eteričnega olja v aparaturi in odlili destilat, pri čemer smo eterično olje ujeli v vialo iz temnega stekla, ki smo jih do analiz s tankoplastno kromatografijo skladiščili v temi pri 4 °C.

Izračun vsebnosti eteričnega olja v drogi [ml/kg]:

$$1000 * V_E / m_0 \quad \dots (4)$$

kjer je:

$V_E$  – odčitani volumen eteričnega olja (destilata) [ml],

$m_0$  – masa vzorca (droge) [g].

## 3.4 ANALIZA S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO (TLC)

### Uporabljen material:

- rastlinski material – zmleti vzorci listov žajblja (glej 3.2),
- 96% etanol,
- kromatografski standardi: tujon (mešanica alfa- in beta-), 1,8-cineol, ursolna kislina, rožmarinska kislina,
- toluen in etil-acetat,
- fosfomolibdenska kislina.

### Uporabljene aparature:

- centrifuga,
- ultrazvočna kadička,
- steklene vialo,
- kromatografske plošče (TLC silikagel, 200 x 100 mm),
- avtomatski nanašalec vzorcev 'Camag Linomat IV',
- razvijalna komora 'Camag ADC',
- dispenzer.

## **Postopek:**

### *Priprava alkoholnih ekstraktov*

Za vsak vzorec smo v centrifugirko zatehtali 0,5 g zmletih žajbljevih listov, s pomočjo dispenzerja dodali 5 ml etanola, pokrili s parafilmom in postavili v kad z ultrazvočnim stresalnikom za 5 minut (na sobni temperaturi).

Nato smo vzorce centrifugirali 2 minuti pri 4000 obratih na minuto, ter dobljeni supernatant odpipetirali v steklene vialle.

### *Nanos vzorcev na kromatografske plošče*

Najprej smo pripravili sledeče raztopine standardov s 96 % etanolom kot topilom:

- tujon (mešanica alfa- in beta-) – 2 µl/ml,
- 1,8-cineol – 1,25 µl/ml,
- borneol – 5 mg/ml,
- ursolna kislina – 2 mg/ml.

Nato smo vzorce s pomočjo avtomatskega nanašalca nanесли na plošče, in sicer s sledečimi parametri:

- po 12 vzorcev na ploščo, nanešenih en za drugim v horizontalni smeri (sl. 4),
- razporeditev vzorcev na ploščah: 4 pari ekstrakt/eterično olje za posamezen rastlinski vzorec, ter standardi tujon, 1,8-cineol, borneol ter ursolna kislina (sl. 4),
- širina pasu posameznega vzorca: 8 mm,
- prostor med pasovi vzorcev: 7 mm,
- začetek nanosa: 15 mm od spodnjega roba plošče,
- volumen nanešenega vzorca: 20 µl.

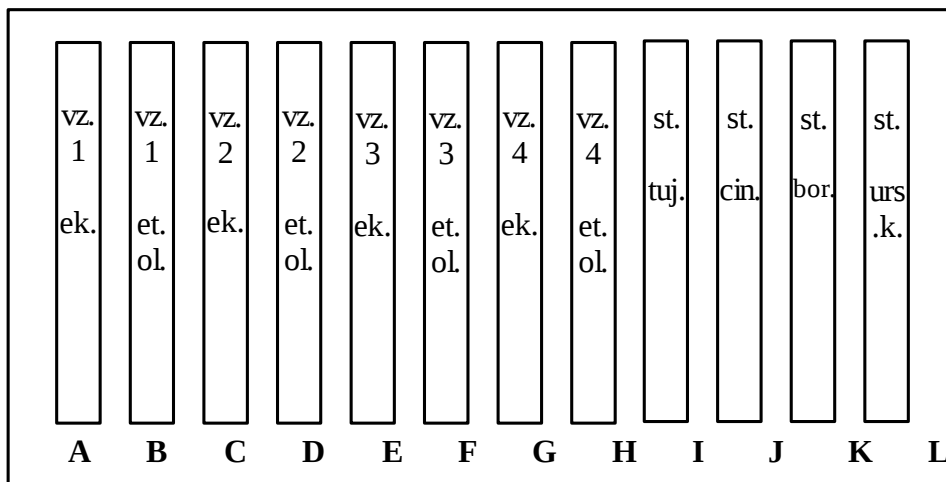
Vsak vzorec smo iz vialle zajeli v injekcijsko brizgo, le-to namestili na aparaturo ter določili mesto nanosa vzorca; aparatura je nato, po predhodno nastavljenem programu z zgoraj opisanimi nastavitvami, nanesla vzorec na ploščo.

### *Razvijanje kromatografskih plošč*

Plošče smo razvijali v avtomatski razvijalni komori.

Posamezno ploščo z nanešenimi vzorci smo vstavili v razvijalno komoro, aparaturi dovedli mobilno fazo (toluen in etil-acetat v volumskem razmerju 95 : 5), nastavili dolžino fronte 80 mm od spodnjega roba plošče in pred-kondicioniranje na 10 min, ter aparaturo pognali. Tipičen razvijalni čas je bil 10 minut.

Plošče smo nato osušili v sušilniku (5 min na 40 °C), jih ročno (s pomočjo pršilke) popršili z raztopino fosfomolibdenske kisline in jih 5 minut sušili na 105 °C.



Slika 4: Razporeditev vzorcev na kromatografskih ploščah (vz. - vzorec; st. - standard; ek. - ekstrakt; et. ol. - eterično olje; tuj. - tujon; cin. - 1,8-cineol; bor. - borneol; ur. k. - ursolna kislina)

Za kalibracijo parametrov nanašanja in razvijanja plošč smo predhodno naredili 3 testne plošče, nato pa serijo 13 kromatografskih plošč z zgoraj opisano razporeditvijo vzorcev. Zaradi neustrezne kvalitete smo morali zavreči plošče 1, 2, 3 in 8, ki smo jih na koncu serije ponovili.

Plošče smo vizualno ocenili in z merjenjem določili dolžino fronte in oddaljenost sredine lis posameznih snovi (tujon, cineol, borneol, ursolna kislina) od mesta nanosa, ter izračunali retencijske faktorje zanje:

$$R_f = d_x / d_f \quad \dots (5)$$

kjer je:

$R_f$  – retencijski faktor,

$d_f$  – dolžina fronte [mm],

$d_x$  – oddaljenost sredine lise od mesta nanosa [mm].

### 3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PRIDOBLJENIH PODATKOV

#### Uporabljena programska oprema:

- OpenOffice.org 3.2.0,
- STATGRAPHICS Plus for Windows 4.0.

#### Postopek:

*Razlika vsebnosti tujih primesi, vode, skupnega pepela in eteričnega olja v drogi med populacijama*

Za posamezne vrste podatkov (vsebnost tujih primesi, vode itd.) so bile s pomočjo programa OpenOffice.org izračunane aritmetične sredine, vzorčni standardni odkloni ter koeficient variacije.

Za objektivno preverjenje razlik v vsebnosti posameznih snovi med populacijama smo uporabili Studentov t-test s 95% intervalom zaupanja (izračune smo opravili v programu STATGRAPHICS).

Zaradi prevelikih razlik v varianci med populacijama smo pri vsebnosti tujih primesi, vode in skupnega pepela podatke logaritemsko (naravni logaritem) transformirali (Bland in Altman, 1996a; Bland in Altman, 1996b).

#### *Korelacija med vsebnostjo eteričnega olja in vsebnostjo vode ter vsebnostjo eteričnega olja in vsebnostjo pepela*

Korelacije smo določali z regresijsko analizo (model premice) in ovrednotili z ANOVA testom s 95% intervalom zaupanja. Izračune smo opravili v programu STATGRAPHICS.

#### *Določevanje retencijskih faktorjev posameznih snovi na TLC kromatogramih*

Pri meritvah oddaljenosti sredin lis od mesta nanosa so bile znotraj plošč vzete modus vrednosti za posamezno snov, iz katerih so bile nato izračunane vrednosti retencijskih faktorjev za te snovi. Določena je bila njihova povprečna vrednost med ploščami in standardni odklon.

## 4 REZULTATI

### 4.1 VSEBNOST TUJIH PRIMESI

Vsi vzorci so v skladu s farmakopejo glede vsebnosti drugih tujih primesi (predpisana maksimalna vrednost 2%), medtem ko je vsebnost stebel in drugih nezeželenih rastlinskih delov v drogi (po farmakopeji do 3%) presežena v dveh vzorcih iz populacije B (pregl. 3).

V splošnem so vrednosti precej pod predpisanimi maksimalnimi dovoljenimi in večinoma ne presegajo 1% suhe mase droge, vendar pa je koeficient variacije zelo velik (celo nad 100%), zaradi česar je nadaljna statistična analiza vprašljiva (glej Razpravo).

Preglednica 3: Celokupne mase vzorcev droge posameznih rastlin ( $m_0$ ), delež stebel in drugih tujih organov v teh vzorcih v odstotkih ( $x_s$ ) ter delež drugih tujih primesi v odstotkih ( $x_D$ ), maksimalne vrednosti (max) in izračunane aritmetična sredina ( $\bar{x}$ ), vzorčni standardni odklon ( $s$ ) in koeficient variacije v odstotkih (KV%)

| Vzorec                      | $m_0$ [g] | $x_s$ [%]  | $x_D$ [%]  | Vzorec                      | $m_0$ [g] | $x_s$ [%]  | $x_D$ [%]  |
|-----------------------------|-----------|------------|------------|-----------------------------|-----------|------------|------------|
| A_01                        | 44.4      | 0.2        | 0.0        | B_01                        | 35.9      | 0.2        | 0.0        |
| A_02                        | 41.2      | 0.1        | 0.1        | B_02                        | 46.5      | 0.1        | 0.1        |
| A_03                        | 40.0      | 0.4        | 0.0        | B_03                        | 37.5      | 0.0        | 0.0        |
| A_04                        | 48.6      | 0.5        | 0.0        | B_04                        | 30.9      | 1.1        | 0.2        |
| A_05                        | 44.5      | 0.3        | 0.0        | B_05                        | 24.6      | 0.2        | 0.2        |
| A_06                        | 34.6      | 0.0        | 0.0        | B_06                        | 26.2      | 0.6        | 0.0        |
| A_07                        | 41.4      | 0.1        | 0.0        | B_07                        | 60.3      | 0.1        | 0.1        |
| A_08                        | 35.7      | 0.1        | 0.0        | B_08                        | 37.8      | 1.6        | 0.4        |
| A_09                        | 37.8      | 0.0        | 0.1        | B_09                        | 30.4      | 0.0        | 0.0        |
| A_10                        | 38.0      | 0.0        | 0.1        | B_10                        | 60.9      | 0.0        | 0.3        |
| A_11                        | 30.9      | 0.1        | 0.0        | B_11                        | 38.5      | 0.2        | 0.1        |
| A_12                        | 38.1      | 0.1        | 0.0        | B_12                        | 43.1      | 0.0        | 0.0        |
| A_13                        | 38.7      | 0.2        | 0.1        | B_13                        | 34.2      | 0.0        | 0.0        |
| A_14                        | 36.9      | 1.0        | 0.0        | B_14                        | 40.9      | 0.6        | 0.4        |
| A_15                        | 36.3      | 0.4        | 0.0        | B_15                        | 42.2      | 0.0        | 0.3        |
| A_16                        | 35.7      | 0.1        | 0.2        | B_16                        | 49.2      | 0.1        | 0.3        |
| A_17                        | 38.6      | 0.0        | 0.0        | B_17                        | 26.7      | 0.0        | 0.3        |
| A_18                        | 40.7      | 0.1        | 0.0        | B_18                        | 32.3      | 0.0        | 0.2        |
| A_19                        | 29.3      | 0.0        | 0.0        | B_19                        | 47.7      | 5.7        | 0.2        |
| A_20                        | 38.6      | 0.3        | 0.0        | B_20                        | 49.6      | 3.1        | 0.7        |
| A_21                        | 37.7      | 0.0        | 0.1        | B_21                        | 40.8      | 0.0        | 0.4        |
| A_22                        | 29.5      | 0.8        | 0.1        | B_22                        | 34.8      | 0.0        | 0.1        |
| A_23                        | 40.6      | 0.7        | 0.1        | B_23                        | 47.8      | 0.1        | 0.4        |
| A_24                        | 36.0      | 0.3        | 0.2        | B_24                        | 34.8      | 0.9        | 0.4        |
| A_25                        | 42.2      | 0.0        | 0.0        | B_25                        | 35.6      | 0.2        | 0.1        |
| <b>max</b>                  |           | <b>1.0</b> | <b>0.2</b> | <b>max</b>                  |           | <b>5.7</b> | <b>0.7</b> |
| <b><math>\bar{x}</math></b> |           | <b>0.2</b> | <b>0.0</b> | <b><math>\bar{x}</math></b> |           | <b>0.6</b> | <b>0.2</b> |
| <b>s</b>                    |           | <b>0.3</b> | <b>0.1</b> | <b>s</b>                    |           | <b>1.3</b> | <b>0.2</b> |
| <b>KV%</b>                  |           | <b>116</b> | <b>120</b> | <b>KV%</b>                  |           | <b>215</b> | <b>87</b>  |

## 4.2 VSEBNOSTI VODE IN PEPELA

Pri analizi vsebnosti vode smo ugotovili, da so vsi vzorci v skladu s farmakopejskimi predpisi, saj noben izmed vzorcev ne presega vrednosti 100 ml vode na 1 kg droge, medtem ko je predpisana maksimalna vrednost vsebnosti skupnega pepela 10% m/m presežena le pri enem izmed vzorcev iz populacije B (pregl. 4).

Prav tako povprečne vrednosti (pregl. 4) za posamezno populacijo izkazujejo skladnost s farmakopejo, in vključno z vzorčnim standarnim odklonom ne presegajo maksimalnih dovoljenih vrednosti.

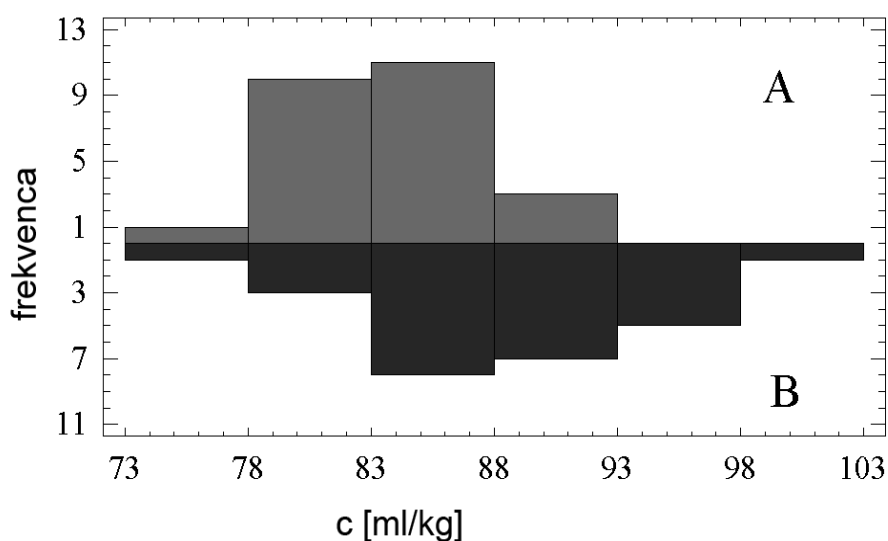
Preglednica 4: Vsebnost vode ( $c_v$ ) v vzorcih ter delež pepela v odstotkih ( $x_p$ ) v osušenih (105°C) vzorcih, maksimalne vrednosti (max) in izračunane aritmetična sredina ( $\bar{x}$ ), vzorčni standardni odklon (s) in koeficient variacije v odstotkih (KV%)

| Vzorec                      | $c_v$ [ml/kg] | $x_p$ [%]  | Vzorec                      | $c_v$ [ml/kg] | $x_p$ [%]   |
|-----------------------------|---------------|------------|-----------------------------|---------------|-------------|
| A_01                        | 84.1          | 7.2        | B_01                        | 84.3          | 7.2         |
| A_02                        | 82.1          | 6.9        | B_02                        | 88.7          | 7.0         |
| A_03                        | 83.3          | 7.1        | B_03                        | 78.2          | 6.1         |
| A_04                        | 84.9          | 6.1        | B_04                        | 81.7          | 9.0         |
| A_05                        | 78.6          | 6.6        | B_05                        | 90.3          | 8.0         |
| A_06                        | 74.3          | 6.8        | B_06                        | 89.7          | 7.7         |
| A_07                        | 86.3          | 6.0        | B_07                        | 87.2          | 7.4         |
| A_08                        | 85.1          | 6.6        | B_08                        | 87.9          | 9.4         |
| A_09                        | 83.2          | 6.9        | B_09                        | 84.6          | 7.1         |
| A_10                        | 84.4          | 7.1        | B_10                        | 93.3          | 8.3         |
| A_11                        | 86.9          | 7.2        | B_11                        | 87.1          | 7.2         |
| A_12                        | 82.6          | 6.2        | B_12                        | 95.6          | 7.9         |
| A_13                        | 83.7          | 6.8        | B_13                        | 89.8          | 7.3         |
| A_14                        | 81.9          | 6.4        | B_14                        | 98.5          | 7.9         |
| A_15                        | 81.7          | 7.0        | B_15                        | 93.9          | 8.2         |
| A_16                        | 83.0          | 6.5        | B_16                        | 86.0          | 8.1         |
| A_17                        | 80.2          | 7.2        | B_17                        | 76.0          | 6.5         |
| A_18                        | 82.0          | 6.9        | B_18                        | 82.3          | 8.5         |
| A_19                        | 83.8          | 6.8        | B_19                        | 86.6          | <u>10.2</u> |
| A_20                        | 84.6          | 6.4        | B_20                        | 89.5          | 9.3         |
| A_21                        | 90.6          | 8.0        | B_21                        | 83.2          | 6.4         |
| A_22                        | 79.4          | 9.1        | B_22                        | 93.3          | 6.5         |
| A_23                        | 88.7          | 7.4        | B_23                        | 97.5          | 8.4         |
| A_24                        | 82.6          | 6.4        | B_24                        | 89.6          | 9.3         |
| A_25                        | 91.1          | 7.0        | B_25                        | 91.9          | 7.8         |
| <b>max</b>                  | <b>91.1</b>   | <b>9.1</b> | <b>max</b>                  | <b>98.5</b>   | <b>10.2</b> |
| <b><math>\bar{x}</math></b> | <b>83.6</b>   | <b>6.9</b> | <b><math>\bar{x}</math></b> | <b>88.3</b>   | <b>7.9</b>  |
| <b>s</b>                    | <b>3.6</b>    | <b>0.7</b> | <b>s</b>                    | <b>5.6</b>    | <b>1.0</b>  |
| <b>KV%</b>                  | <b>4.3</b>    | <b>9.5</b> | <b>KV%</b>                  | <b>6.3</b>    | <b>13.3</b> |

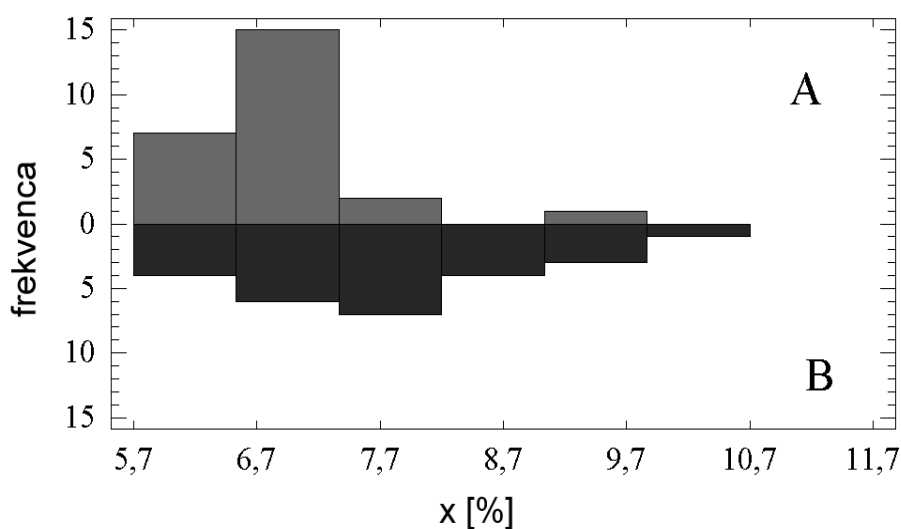
### Primerjava med populacijama

Iz izračunanih povprečij vsebnosti vode in vsebnosti pepela (pregl. 4) in frekvenčnih distribucij posameznih populacij glede omenjenih lastnosti (gr. 1, 2) je razvidno, da se med populacijama vrednosti razlikujejo, in sicer so vsebnosti tako vode kot pepela v drogi pri populaciji A manjši kot v populaciji B.

Statistična analiza s t-testom je pokazala, da se vsebnosti vode in pepela med populacijama s 95% intervalom zaupanja razlikujeta (P-vrednost za ničelno hipotezo da sta povprečji med populacijama enaki, je bila za vsebnost vode 0,0011 in za vsebnost pepela 0,0002).



Slika 5: Frekvenčna distribucija vzorcev posameznih populacij glede na vsebnost vode (c, v ml vode na kg droge)



Slika 6: Frekvenčna distribucija vzorcev posameznih populacij glede na vsebnost skupnega pepela (x, v odstotkih m/m pepela v osušeni drogi)

### 4.3 VSEBNOST ETERIČNEGA OLJA

Tudi vsebnost eteričnega olja (pregl. 5) je, z izjemo enega vzorca iz populacije A, pri obeh populacijah nad farmakopejsko določeno minimalno vrednostjo (15 ml eteričnega olja na kilogram droge).

Povprečne vrednosti (pregl. 5) za posamezno populacijo ponovno izkazujejo skladnost s farmakopejskimi zahtevami in vključno z vzorčnim standarnim odklonom ne presegajo maksimalnih dovoljenih vrednosti oz. so celo precej nad njimi.

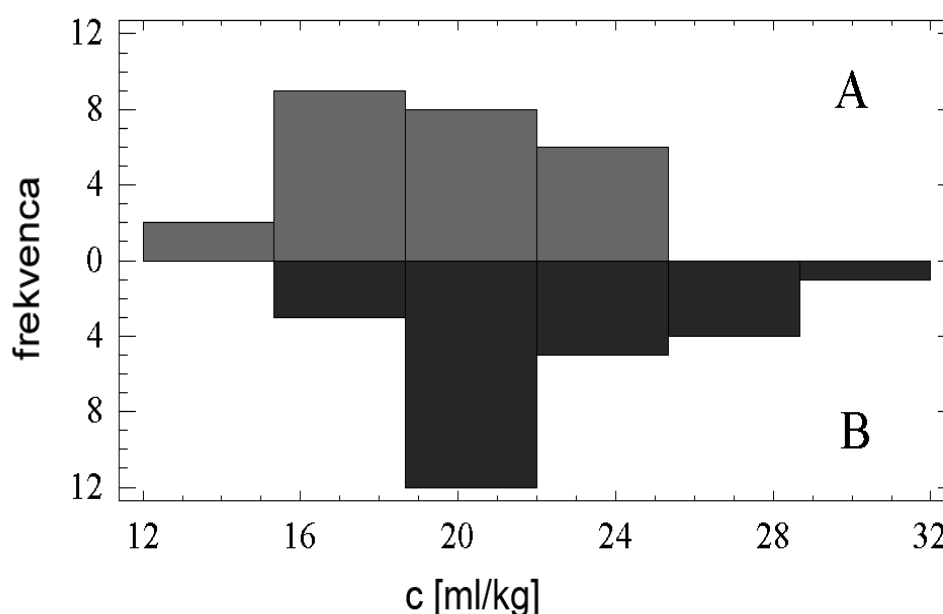
Preglednica 5: Mase vzorcev posušenih žajbljevih listov, uporabljenih za destilacijo eteričnega olja (m), dobljeni volumni eteričnega olja (V) ter koncentracije preračunane na kilogram droge (c), minimalne vrednosti (min) in izračunane aritmetična sredina ( $\bar{x}$ ), vzorčni standardni odklon (s) in koeficient variacije v odstotkih (KV%)

| Vzorec                      | m[g] | V[ml] | c[ml/kg]    | Vzorec                      | m[g] | V[ml] | c[ml/kg]    |
|-----------------------------|------|-------|-------------|-----------------------------|------|-------|-------------|
| A_01                        | 20.0 | 0.36  | 18          | B_01                        | 20.1 | 0.38  | 19          |
| A_02                        | 20.0 | 0.49  | 25          | B_02                        | 20.1 | 0.43  | 21          |
| A_03                        | 20.0 | 0.41  | 21          | B_03                        | 20.0 | 0.39  | 20          |
| A_04                        | 20.0 | 0.36  | 18          | B_04                        | 15.2 | 0.28  | 18          |
| A_05                        | 20.0 | 0.26  | 13          | B_05                        | 15.0 | 0.33  | 22          |
| A_06                        | 15.1 | 0.23  | 15          | B_06                        | 15.0 | 0.31  | 21          |
| A_07                        | 20.0 | 0.49  | 24          | B_07                        | 20.1 | 0.35  | 17          |
| A_08                        | 20.0 | 0.42  | 21          | B_08                        | 20.1 | 0.41  | 20          |
| A_09                        | 20.0 | 0.33  | 16          | B_09                        | 15.1 | 0.30  | 20          |
| A_10                        | 20.0 | 0.50  | 25          | B_10                        | 20.0 | 0.52  | 26          |
| A_11                        | 15.0 | 0.33  | 22          | B_11                        | 20.0 | 0.44  | 22          |
| A_12                        | 20.0 | 0.43  | 21          | B_12                        | 20.0 | 0.47  | 24          |
| A_13                        | 20.0 | 0.45  | 23          | B_13                        | 20.0 | 0.49  | 24          |
| A_14                        | 20.0 | 0.44  | 22          | B_14                        | 20.0 | 0.44  | 22          |
| A_15                        | 20.0 | 0.41  | 21          | B_15                        | 20.1 | 0.51  | 25          |
| A_16                        | 20.0 | 0.41  | 21          | B_16                        | 20.0 | 0.45  | 22          |
| A_17                        | 20.0 | 0.31  | 16          | B_17                        | 15.1 | 0.35  | 23          |
| A_18                        | 20.0 | 0.37  | 18          | B_18                        | 15.1 | 0.31  | 21          |
| A_19                        | 15.1 | 0.28  | 19          | B_19                        | 20.0 | 0.35  | 17          |
| A_20                        | 20.0 | 0.31  | 15          | B_20                        | 20.0 | 0.42  | 21          |
| A_21                        | 20.0 | 0.40  | 20          | B_21                        | 20.1 | 0.41  | 20          |
| A_22                        | 15.0 | 0.24  | 16          | B_22                        | 20.0 | 0.54  | 27          |
| A_23                        | 20.0 | 0.45  | 23          | B_23                        | 20.0 | 0.61  | 30          |
| A_24                        | 20.0 | 0.36  | 18          | B_24                        | 20.0 | 0.40  | 20          |
| A_25                        | 20.0 | 0.48  | 24          | B_25                        | 15.3 | 0.40  | 26          |
| <b>min</b>                  |      |       | <b>13</b>   | <b>min</b>                  |      |       | <b>17</b>   |
| <b><math>\bar{x}</math></b> |      |       | <b>19.7</b> | <b><math>\bar{x}</math></b> |      |       | <b>22.0</b> |
| <b>s</b>                    |      |       | <b>3.3</b>  | <b>s</b>                    |      |       | <b>3.2</b>  |
| <b>KV%</b>                  |      |       | <b>16.7</b> | <b>KV%</b>                  |      |       | <b>14.4</b> |

### Primerjava med populacijama

Ponovno lahko ob analizi povprečij vsebnosti eteričnega olja (pregl. 5) in frekvenčnih distribucij posameznih populacij za vsebnost eteričnega olja (gr. 3) ugotovimo, da se med populacijama vrednosti razlikujejo, in sicer spet v prid populacije B, ki ima večjo vsebnost eteričnega olja.

Tudi za primer eteričnega olja je statistični analiza s t-testom pokazala, da se povprečne vsebnosti med populacijama s 95% intervalom zaupanja razlikujeta (P-vrednost za ničelno hipotezo da sta povprečji med populacijama enaki, je bila 0,0162).



Slika 7: Frekvenčna distribucija vzorcev posameznih populacij glede na vsebnost eteričnega olja (c, v ml eteričnega olja na kg droge)

## 4.4 KORELACIJE MED VSEBNOSTMI

Z regresijsko analizo po modelu premice in vrednotenjem z ANOVA testom smo pri 95% intervalu zaupanja pokazali zmerno močno povezavo med vsebnostjo eteričnega olja in vsebnostjo vode v vzorcu, vrednoteno za vzorce obeh populacij. R-kvadrat statistika kaže na 39,45% pojasnljivost vsebnosti eteričnega olja s sledečo enačbo premice (gr.4):

$$c_o = 0,41 * c_v - 14,28, \quad \dots (6)$$

pri čemer je  $c_o$  koncentracija eteričnega olja in  $c_v$  koncentracija vode, v enakih enotah.

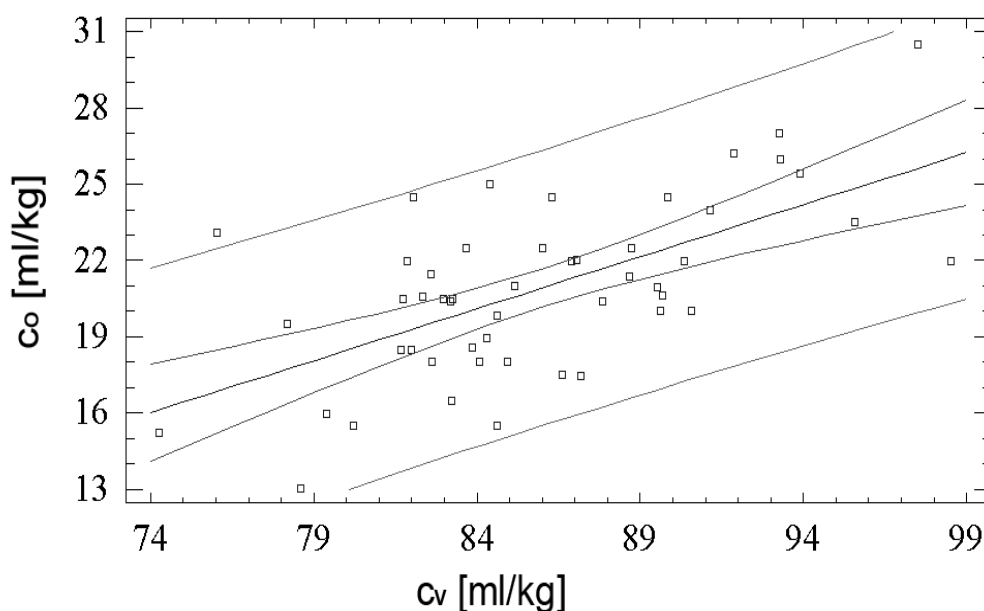
Da bi odvisnost dodatno preverili, smo statistični postopek ponovili še na posameznih populacijah; rezultati odvisnosti so za populacijo A:

$$c_o = 0,52 * c_v - 23,85 \quad \dots (7)$$

(R-kvadrat statistika 32,43%) in za populacijo B:

$$c_o = 0,33 * c_v - 7,51 \quad \dots (8)$$

(R-kvadrat statistika 37,75%).



Slika 8: Regresijska premica odvisnosti vsebnosti eteričnega olja ( $c_o$ , v ml eteričnega olja na kg droge) od vsebnosti vode ( $c_v$ , v ml vode na kg droge), skupno za obe populaciji

Z enakim testom pa nismo mogli pokazati signifikantne odvisnosti med vsebnostjo eteričnega olja in pepela, saj glede na R-kvadrat statistiko regresijska premica (za obe populaciji) pojasnjuje le 0,30% vsebnosti eteričnega olja z regresijsko premico odvisnosti vsebnosti eteričnega olja od vsebnosti pepela.

#### 4.5 ANALIZA S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO (TLC)

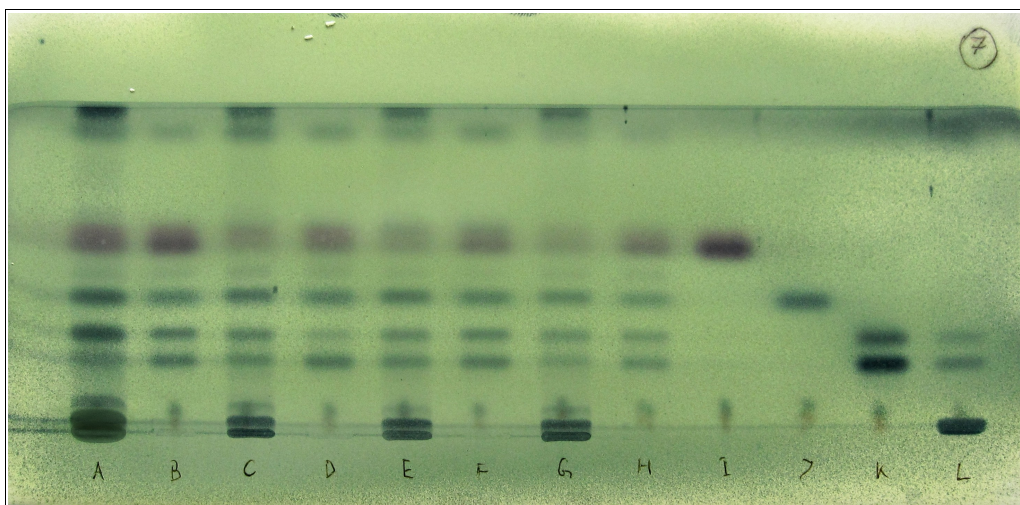
Razvitih je bilo 13 kromatogramskih plošč, od katerih je bilo treba štiri zaradi prevelikih odstopanj ponoviti. Tudi sicer so plošče izkazovale precejšnjo raznolikost (v barvi, intenziteti pasov, dolžini fronte), zaradi česar je bila primerjava med ploščami onemogočena. Vzorce smo tako primerjali znotraj plošče, na vsako od njih pa so bili nanešeni tudi standardi (glej Metode).

Za standarde smo izračunali retencijske faktorje, ki so podani v pregl. 6 in so v skladu s podatki iz literature. Pri borneolu smo tako v standardu kot v vzorcih opazili po dve lisi, kar nakazuje na prisotnost razpadnih produktov. Glede na literaturne podatke (pregl. 6) predstavlja razpadni produkt zgornja lisa.

Kot je razvidno iz sl. 9 (glej tudi sl. 4), je nekaj borneola prisotnega tudi v standardu ursolne kisline, kar pa je posledica eksperimentalne napake, kjer smo standardno raztopino borneola kontaminirali s standardno raztopino borneola.

Preglednica 6: Izračunani retencijski faktorji ( $R_F$ ) za tujon, 1,8-cineol, borneol (2 lisi) in ursolno kislino, podani za vsako ploščo posebej, in izračunane aritmetična sredina ( $\bar{x}$ ), vzorčni standardni odklon ( $s$ ) in koeficient variacije v odstotkih (KV%). \* – ponovljene plošče; \*\* – podatki iz literature (Wagner in Bladt, 1996)

| Plošča        | R <sub>F</sub> tujon | R <sub>F</sub> 1,8-cineol | R <sub>F</sub> borneol | R <sub>F</sub> ursolna k. |             |
|---------------|----------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|-------------|
| 1*            | 0.58                 | 0.45                      | 0.34                   | 0.26                      | 0.05        |
| 2*            | 0.56                 | 0.42                      | 0.33                   | 0.24                      | 0.05        |
| 3*            | 0.55                 | 0.34                      | 0.31                   | 0.23                      | 0.03        |
| 4             | 0.58                 | 0.42                      | 0.31                   | 0.22                      | 0.03        |
| 5             | 0.64                 | 0.46                      | 0.33                   | 0.26                      | 0.04        |
| 6             | 0.63                 | 0.31                      | 0.34                   | 0.25                      | 0.05        |
| 7             | 0.58                 | 0.42                      | 0.29                   | 0.22                      | 0.03        |
| 8*            | 0.57                 | 0.42                      | 0.32                   | 0.25                      | 0.05        |
| 9             | 0.48                 | 0.34                      | 0.25                   | 0.21                      | 0.03        |
| 10            | 0.58                 | 0.43                      | 0.34                   | 0.26                      | 0.05        |
| 11            | 0.56                 | 0.42                      | 0.33                   | 0.25                      | 0.03        |
| 12            | 0.58                 | 0.45                      | 0.34                   | 0.25                      | 0.05        |
| 13            | 0.58                 | 0.44                      | 0.32                   | 0.26                      | 0.05        |
| $\bar{x}$     | <b>0.58</b>          | <b>0.41</b>               | <b>0.32</b>            | <b>0.24</b>               | <b>0.04</b> |
| s             | <b>0.04</b>          | <b>0.05</b>               | <b>0.03</b>            | <b>0.02</b>               | <b>0.01</b> |
| KV%           | <b>6.6</b>           | <b>11.7</b>               | <b>8.2</b>             | <b>7.9</b>                | <b>19.9</b> |
| Literatura ** | <b>0.55</b>          | <b>0.45</b>               | <b>0.24</b>            | <b>/</b>                  |             |



Slika 9: Primer razvite TLC plošče; za pojasnilo nanosov glej sl. 4

Preglednica 7: Rezultati analize TLC plošč glede hipotez, da je v ekstraktih večja vsebnost cineola in manjša vsebnost tujona kot v eteričnem olju istega vzorca (+ pomeni da so rezultati v skladu s posamezno hipotezo), seštevek pozitivnih rezultatov (tot) in njihov delež ( $x_+$ ).

| Vzorec                  | Več cineola v ekstraktu | Manj tujona v ekstraktu |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| A_01                    | +                       | +                       |
| A_02                    | +                       | +                       |
| A_03                    | +                       | +                       |
| A_04                    | +                       | +                       |
| A_05                    | +                       | +                       |
| A_06                    | +                       | +                       |
| A_07                    | +                       | +                       |
| A_08                    | +                       | +                       |
| A_09                    | +                       | +                       |
| A_10                    | +                       | +                       |
| A_11                    | +                       | +                       |
| A_12                    | +                       | +                       |
| A_13                    | +                       | +                       |
| A_14                    | +                       | +                       |
| A_15                    | +                       | -                       |
| A_16                    | +                       | +                       |
| A_17                    | +                       | +                       |
| A_18                    | -                       | +                       |
| A_19                    | +                       | +                       |
| A_20                    | +                       | +                       |
| A_21                    | +                       | +                       |
| A_22                    | +                       | +                       |
| A_23                    | +                       | +                       |
| A_24                    | -                       | +                       |
| A_25                    | +                       | +                       |
| B_01                    | -                       | +                       |
| B_02                    | +                       | +                       |
| B_03                    | +                       | +                       |
| B_04                    | +                       | +                       |
| B_05                    | +                       | +                       |
| B_06                    | +                       | +                       |
| B_07                    | -                       | +                       |
| B_08                    | +                       | +                       |
| B_09                    | +                       | -                       |
| B_10                    | +                       | +                       |
| B_11                    | +                       | +                       |
| B_12                    | +                       | +                       |
| B_13                    | +                       | +                       |
| B_14                    | +                       | -                       |
| B_15                    | +                       | +                       |
| B_16                    | +                       | +                       |
| B_17                    | +                       | +                       |
| B_18                    | +                       | +                       |
| B_19                    | +                       | +                       |
| B_20                    | +                       | +                       |
| B_21                    | -                       | +                       |
| B_22                    | +                       | -                       |
| B_23                    | +                       | +                       |
| B_24                    | -                       | +                       |
| B_25                    | +                       | +                       |
| <b>tot</b>              | <b>44</b>               | <b>46</b>               |
| <b><math>x_+</math></b> | <b>88%</b>              | <b>92%</b>              |

Na podlagi vizualnega pregleda plošč (glej sl. 9) smo ugotovili, da vsi vzorci ustrezajo farmakopejskim predpisom glede prisotnosti tujonov in 1,8-cineola v eteričnem olju, saj imata obe spojini lise v vseh vzorcih, in sicer tako v ekstraktih kot v eteričnih oljih. Ravno tako je v vseh prisoten borneol, medtem ko je ursolna kislina prisotna le v ekstraktih, v eteričnem olju pa ne.

Med vzorci iz populacije A in populacije B nismo opazili nobenih karakterističnih razlik, na podlagi katerih bi lahko pripisali vzorcem iz posamezne populacije razlike v vsebnosti določene snovi od vsebnosti te snovi v drugi populaciji.

Na podlagi nadaljnjih opazovanj pa smo predpostavili, da je v ekstraktu večja koncentracija cineola ter manjša koncentracija tujonov kot v eteričnem olju iste rastline. Predpostavka se je izkazala kot pravilna v 88% primerov za cineol in v 92% primerov za tujone. Rezultati vizualne ocene predpostavke so podani v pregl. 7.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Vsebnosti tujih primesi se med posameznimi vzorci zelo razlikujejo (koeficient variacije je pri vseh nad 80%), kar je razumljivo, saj je vsebnost tujih primesi odvisna od nabiranja listov žajblja, oz. od natančnosti pri tem, to pa je lahko statistično značilno šele pri znatno večjih vzorcih. Podatek pravzaprav tudi ne opisuje kvalitete samih rastlin, temveč je bolj zanimiv npr. iz stališča nadaljne predelave nabrane droge, ki jo je v primeru prevelike vsebnosti tujih primesi potrebno dodatno prečistiti.

Kljub veliki variabilnosti so pri obeh populacijah vsebnosti drugih tujih primesi pod farmakopejsko predpisanimi (2%, medtem ko je največja vrednost v populaciji A 0,2% in v B 0,7%), predpisana zgornja meja vsebnosti stebel (3%) pa je presežena pri dveh vzorcih iz populacije B, pri kateri vzorci tudi sicer izkazujejo večjo vsebnost stebel kot tisti iz populacije A. To lahko povežemo s starostjo rastlin (populacijo B namreč sestavljajo starejše rastline) in posledično manjšim številom listov na rastlinah, kar otežkoča nabiranje čiste droge *Salviae folium*. Tako lahko kljub močni variabilnosti pripišemo večjo kvaliteto na podlagi vsebnosti tujih primesi populaciji A, ki zaradi po starosti mlajših rastlin omogoča enostavnejše nabiranje čiste droge. Da pa bi hipotezo lahko v celoti potrdili, bi morali analizirati večje vzorce rastlin iz posamezne populacije.

Pri vsebnosti vode in pepela imata obe populaciji povprečje znotraj farmakopejsko predpisanih vrednosti, pri čemer se povprečja med populacijama statistično značilno razlikujejo; opaženo je bilo, da ima populacija A nižje povprečje tako vsebnosti vode kot vsebnosti pepela od populacije B. Predvsem slednje bi lahko bila ponovno posledica večje starosti rastlin populacije B, ki so skozi daljše obdobje akumulirale mineralne snovi. Ker je bila, v skladu s farmakopejskimi predpisi, določena le vsebnost skupnega pepela, ne moremo postavljati nadaljnjih ugotovitev, vsekakor pa bi bilo lahko zanimivo v prihodnjih raziskavah določiti tudi njegovo sestavo – tako bi lahko videli, ali so za večjo vsebnost pepela v starejših rastlinah morda odgovorne točno določene snovi.

Iz stališča vsebnosti tujih primesi, vode in pepela je torej populacija B izkazovala nekoliko slabšo kakovost, vendar je po vsebnosti eteričnega olja kakovostnejša od populacije B, saj vsebuje v povprečju 22,0 ml eteričnega olja na 1 kg suhe droge, medtem ko je povprečna vsebnost eteričnega olja v populaciji A 19,7 ml/kg. Obe vrednosti sta precej nad farmakopejsko predpisano minimalno vrednostjo (15 ml/kg) in torej kakovostni, sploh npr. v primerjavi s komercialnimi sortami *S. officinalis* iz Nemčije, za katere Perry in sod. (1999) ugotavljajo povprečno vsebnost eteričnega olja 11,1 ml/kg (glej 2.2.1.1). Po drugi strani žajbelj iz preiskovanih rastišč s Petrinjskega Krasa po vsebnosti eteričnega olja dosegla le zmerno kakovost v primerjavi z vsebnostjo v žajblju z nabiralnih področij Dalmacije, za katere Tobias (1995) navaja povprečne vrednosti med 16 ml/kg in 36 ml/kg.

Dejstvo, da je večja vsebnost olja v starejši drogi je zanimivo in je v nasprotju z delovno hipotezo, vendar pravzaprav ne preseneča, saj ga lahko primerjamo z nekaterimi literaturnimi podatki, v katerih na primer poročajo o povečanju vsebnosti eteričnega olja v listih žajblja, ki raste pod stresnimi pogoji, kot so visoka temperatura, suša in nizka fertilnost (Hay, 1993). Tudi Bettaieb in sod. (2009) poročajo o obratnem sorazmerju morfologije (velikosti, razvejanosti) rastlin *S. officinalis* in vsebnosti eteričnega olja v njihovih listih.

Večjo vsebnost eteričnega olja v starejših rastlinah bi torej, enako kot v rastlinah pod stresnimi pogoji, lahko pojasnili v smislu sekundarno-metabolitne narave eteričnega olja; tako se metabolizem v manj ugodnih pogojih za rast raje usmeri v tvorbo sekundarnih metabolitov, kar posledično poveča koncentracijo eteričnega olja v listih.

Nekoliko presenetljivo je, da je v populaciji B hkrati večja vsebnost vode in eteričnega olja, saj bi pričakovali, da bo povezava obratno sorazmerna, vendar pa se je pozitivna korelacija statistično potrdila tako pri analizi posameznih populacij kot pri skupni analizi vzorcev iz obeh populacij (gr. 4). Razlog za to bi morda lahko bil v izgubi eteričnega olja pri sušenju vzorcev. Eterično olje je namreč hlapljivo, tako da bi zaradi naključnih razlik v izgubi vode pri sušenju vzorcev lahko prišlo do podobnih razlik v izgubi eteričnega olja, kar pa bi posledično napeljevalo na navidezno korelacijo med vsebnostma. Vsekakor bi bilo korelacijo, z ozirom na predlagano razlago, smiselno preveriti v nadaljnjih raziskavah.

Ker je v drogi iz populacije B večja vsebnost tujih primesi, vode in pepela, hkrati pa tudi večja vsebnost eteričnega olja, je torej objektivno težko določiti, katera od obeh populacij žajblja je kakovostnejša. Ker je populacija B po starosti starejša, bi se morda tehtnica lahko prevesila v prid populacije A, saj imajo pri tej populaciji same rastline tudi večje število listov, ki odtehta nekoliko manjšo vsebnost eteričnega olja. Poleg tega bi bila velikega pomena, kot že omenjeno, natančnejša določitev sestave pepela v rastlinah, saj bi na primer pri ugotovitvi večje vsebnosti težkih kovin v populaciji B lahko govorili o slabši kakovosti droge te populacije.

Pri analizi s tankoplastno kromatografijo (TLC) smo pri vseh vzorcih potrdili vsebnost tujonov in 1,8-cineola, kar ponovno priča o skladnosti s farmakopejskimi pogoji; s tem so izpolnjeni vsi pogoji iz Evropske farmakopeje za kakovost droge *Salviae folium*.

Pri vseh vzorcih smo, tako v ekstraktih kot v eteričnih oljih, potrdili še prisotnost borneola in v ekstraktih prisotnost ursolne kisline. Borneol je imel pri vseh vzorcih kot tudi v standardni raztopini neidentificiran razpadni produkt z retencijskim faktorjem 0,32. Pokazala se je tudi razlika v vsebnosti tujonov in cineola v ekstraktih oz. eteričnih oljih istih rastlin; eterična olja imajo namreč višjo vsebnost tujonov kot ekstrakti, medtem ko je v ekstraktih več 1,8-cineola. Rezultati torej kažejo na tujonski kemotip (Boelens in Boelens, 1997) žajblja iz preiskovanih rastišč.

Različno razmerje med sestavinami eteričnega olja in ekstrakta torej nagovarja k razmisleku o različni aplikaciji (v razmislek lahko vzamemo npr. že toksične učinke tujonov ali pa ugoden protivneten vpliv ursolne kisline – Baričević in Bartol, 2000).

Predpisi Evropske farmakopeje se nanašajo predvsem na identifikacijo droge in njeno kakovost v agronomskem/predelovalnem smislu in s tem pravzaprav bolj na njeno ekonomsko in ne toliko aplikativno vrednost. Poleg tega ne predpisujejo natančnejše sestave droge, od katere je odvisna njena uporaba (npr. za čaje, za preparate za nego zob in ustne votline, za topikalni nanos). To kaže na potrebo po dopolnitvi obstoječih farmakopejskih predpisov z ozirom na samo uporabo droge. Kot je že opisano pri Metodah (3.2, 3.3), pa so predpisani testi tudi precej škodljivi, saj vključujejo ekstenzivno uporabo organskih topil, ki pravzaprav niso upravičene z rezultati: tako bi npr. določanje izgube pri sušenju lahko nadomestilo azeotropsko metodo, pa tudi namesto tankoplastne kromatografije bi bil primernejši in bolj informativen test z metodo HPLC (visoko ločljivostna tekočinska kromatografija), ki omogoča tudi natančnejšo določitev sestave eteričnega olja oziroma ekstrakta.

## 5.2 SKLEPI

- Droga *Salviae folium* iz obeh preiskovanih populaciji iz naravnih rastišč na Petrinjskem Krasu je skladna s predpisi Evropske farmakopeje.
- Vsebnost eteričnega olja je s povprečjem 19,7 ml/kg oziroma 22 ml/kg relativno visoka, kar dodatno potrjuje kakovost žajblja iz teh rastišč.
- Droga iz po starosti starejše populacije ima večjo vsebnost tujih primesi, vode in skupnega pepela, vendar pa ima po drugi strani tudi večjo vsebnost eteričnega olja.
- Glede sestave eteričnega olja v primerjavi s sestavo ekstrakta iste rastline je bilo ugotovljeno, da slednji vsebuje manj tujonov in več 1,8-cineola kot eterično olje ter ursolno kislino, ki je v eteričnem olju ni.
- Predpisi Evropske farmakopeje se nanašajo zgolj na identifikacijo in ekonomsko vrednost droge, zato se kaže potreba po dopolnitvi z ozirom na uporabno vrednost, kot tudi po vključitvi manj škodljivih in bolj informativnih testov.

Pri vrednotenju kakovosti žajblja iz dveh naravnih rastišč na Petrinjskem Krasu smo torej prišli do zgoraj naštetih ugotovitev, ki imajo neposredno vrednost v smislu pokazane ustreznosti za pridelavo in uporabo droge, kot že omenjeno pa bi bile zanimive nadaljnje raziskave kot so natančnejša določitev sestavin eteričnih olj in ekstraktov ter s tem boljša opredelitev njihove uporabne vrednosti, podrobnejša določitev sestave pepela in ugotavljanje morebitnih drugih škodljivih snovi kot so pesticidi itd. Nadalje bi bilo zanimivo raziskati in pojasniti tudi korelacijo med vsebnostjo vode in eteričnega olja v drogi ter končno preučiti možne izboljšave predpisov za vrednotenje kakovosti droge.

## 6 POVZETEK

Žajbelj (*Salvia officinalis* L.) je zdravilna rastlina, katere uporaba v ljudski medicini zgodovinsko sega že v antiko in živi še danes. Tudi v znanstvenih krogih so bili potrjeni številni pozitivni učinki žajblja na zdravje – med najznačilnejšimi so protimikrobno, adstringentno in antioksidativno delovanje, zaradi česar je žajbelj npr. pogosta sestavina preparatov za nego zob in ustne votline ter priljubljena začimba; predmet raziskav pa so tudi druge pozitivne lastnosti kot protitumorska aktivnost in vpliv na živčevje.

Na rast in kvaliteto žajblja vplivajo številni pogoji, od genetske podlage, prek razlik v fenoloških fazah razvoja, do mnogih vplivov okolja. Zato smo želeli preveriti kakovost žajblja iz dveh naravnih populacij z rastišč na Petrinskem Krasu, od katerih je bila ena po starosti starejša. Za vsako populacijo smo analizirali 25 vzorcev, ki so predstavljali posušeno drogo *Salviae folium* posamičnih rastlin. Odločili smo se za ovrednotenje po predpisih Evropske farmakopeje.

Določili smo vsebnost tujih primesi (stebel ter drugih tujih primesi) z vizualnim pregledom, vsebnost vode z metodo izgube pri sušenju, celokupno vsebnost pepela z žarjenjem vzorcev, vsebnost eteričnega olja z destilacijo s Clevenger aparaturo ter prisotnost tujonov, 1,8-cineola, borneola in ursolne kisline v ekstraktih in eteričnih oljih z metodo tankoplastne kromatografije (TLC). Podatke smo statistično obdelali z metodami opisne statistike, vsebnosti med populacijama smo primerjali s Studentovim t-testom ter preverili korelaciji med vsebnostjo vode in vsebnostjo eteričnega olja ter vsebnostjo celokupnega pepela in vsebnostjo eteričnega olja v drogi s pomočjo modela linearne regresije in analize razpršenosti (ANOVA).

Populaciji sta v splošnem povsem skladni s predpisi Evropske farmakopeje, z izjemo posameznih odstopajočih vzorcev, ki presegajo nekatere predpisane vrednosti. Obe populaciji imata relativno visoke vsebnosti eteričnega olja (19,7 ml/kg suhe droge in 22 ml/kg), pri čemer ima višjo vsebnost po starosti starejša populacija, ki pa ima tudi višjo vsebnost tujih primesi, vode in skupnega pepela. Pozitivna korelacija med vsebnostjo vode in vsebnostjo eteričnega olja se je tudi statistično potrdila, razlog za to pa bi lahko bil v izgubi eteričnega olja pri sušenju vzorcev.

Pri TLC analizi je bila pokazana razlika med sestavo ekstraktov in eteričnega olja iste rastline, in sicer je v ekstraktih višja vsebnost 1,8-cineola in nižja vsebnost tujonov, prisotna pa je tudi ursolna kislina, ki je v eteričnem olju ni.

Dobljeni rezultati kažejo na primernost populacij žajblja iz preiskovanih naravnih rastišč za pridelavo in uporabo droge ter odpirajo iztočnice za nadaljnje raziskave. Nakazana je pomembnost smiselne izbire pripravkov iz droge (ekstrakt, eterično olje) za željeno uporabo in predstavljenih je nekaj pomanjkljivosti pri farmakopejskih predpisih oz. možnih predlogov za izboljšave.

## 7 VIRI

- Akhondzadeh S., Noroozian M., Mohammadi M., Ohadinia S., Jamshidi A. H., Khani M. 2003. *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 28: 53–59
- Baričević D., Sosa S., Della Loggia R., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A., Zupančič A. 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 75: 125–132
- Baričević D., Bartol T. 2000. The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. V: Sage: The genus *Salvia*. Kintzios S.E. (ur.). Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 143-184
- Baričević D. 1996. Rastlinske droge in njihovi sekundarni metaboliti – surovina rastlinskih zdravilnih pripravkov. Ljubljana, samozaložba: 81 str.
- Bernath J., Nemeth E. 2000. Genetic improvement of cultivated species of the genus *Salvia*. V: Sage: The Genus *Salvia*. Kintzios S.E. (ur.). Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 109-124
- Bernotiene G., Nivinskiene O., Butkiene R., Mockute D. 2007. Essential oil composition variability in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemija*, 18, 4: 38-43
- Bettaieb I., Zakhama N., Wannes W. A., Kchouk M. E., Marzouk B. 2009. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia Horticulturae*, 120, 2: 271–275
- Bisby F. A., Roskov Y. R., Orrell T. M., Nicolson D., Paglinawan L. E., Bailly N., Kirk P. M., Bourgoin T., Baillargeon G. 2010. Species 2000 & ITIS Catalogue of life: 2010 Annual checklist. Species 2000: Reading, UK.  
<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2010/details/species/id/7045048> (5. apr. 2010)
- Bland J. M., Altman D. G. 1996a. Statistics notes: Transforming data. *British Medical Journal*, 312: 770
- Bland J. M., Altman D. G. 1996b. Statistics notes: The use of transformation when comparing two means. *British Medical Journal*, 312: 1153
- Boelens M. H., Boelens H. 1997. Chemical and sensory evaluation of three sage oils. *Perfumer and Flavorist*, 22 (mar./apr.): 19-40
- Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Jovin E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 19: 7879-7885

- British Herbal Compendium. 2006. Sage Leaf – *Salviae officinalis folium*. V: British Herbal Compendium, a handbook of scientific information on widely used plant drugs. Companion to the British Herbal Pharmacopoeia. Volume 2. Bradley P. R. (ur.). Bournemouth, British Herbal Medicine Association: 339-344
- Bruneton J. 1999 Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Pariz, Lavoisier: 1119 str.
- Ceres. 1984. The healing power of herbal teas. Wellingborough, Thorsons: 128 str.
- Christman S. 1999. *Salvia officinalis*. Floridata.com LC (8. maj 2003)  
[http://www.floridata.com/ref/S/salv\\_off.cfm](http://www.floridata.com/ref/S/salv_off.cfm) (7. apr. 2010)
- Clebsch B. 2003. The new book of *Salvias*: sages for every garden. Cambridge, Tiber Press: 338 str.
- Committee On Herbal Medicinal Products. 2009. Community Herbal Monograph on *Salvia officinalis* L., *folium* – final. London, European Medicines Agency, 12. nov. 2009: 8 str.
- Delamare A. P. L., Moschen-Pistorello I. T., Artico L., Atti-Serafini L., Echeverrigaray S. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. Food Chemistry, 100, 2: 603-608
- Dob T., Berramdane T., Dahmane D., Benabdelkader T., Chelghoum C. 2007. Chemical composition of the essential oil of *Salvia officinalis* from Algeria. Chemistry of Natural Compounds, 43, 4: 491-494
- Doljak B., Kac J., Kreft S., Janeš D., Mlinarič A., Slanc P., Štrukelj B., Umek A. 2005. Vaje iz farmakognozi in farmacevtske biotehnologije. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo: 82 str.
- Dorman H. J. D., Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88, 1: 308–316
- Dweck A. C. 2000. The Folklore and Cosmetic Use of various *Salvia* species. V: Sage: The genus *Salvia*. Kintzios S.E. (ur.). Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 1-26
- EU Scientific Committee on Food. 2003. Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone (expressed on 2 December 2002). Bruselj, European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General: 11 str.
- Evropska farmakopeja 5.0. 2004. Sage Leaf (*Salvia officinalis*). European Pharmacopoeia 5.0. Strasbourg, Council of Europe: 3086 str.
- Franz C. 1994. A survey on applied genetics of medicinal and aromatic plants. Zbornik. 4emes Rencontres Internationales, Nyon, 5–7 december 1994: 139–145.
- Franz C. 1993. Genetics. V: Volatile oil crops: their biology. Hay R. K. M., Waterman P. (ur.) Harlow, Longman: 63-96

- Funk C., Koepp A. E., Croteau, R. 1992. Catabolism of camphor in tissue cultures and leaf disks of common sage (*Salvia officinalis*). Archives of Biochemistry and Biophysics, 294: 306-313.
- Galle-Toplak K. 2002. Zdravilne rastline na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 310 str.
- Geopedia – interaktivni spletni atlas in zemljevid Slovenije. Društvo za digitalizacijo Slovenije, Geopedia.  
<http://www.geopedia.si/> (12. maj 2010)
- Giannouli A. L., Kintzios S.E. 2000. Essential oils of *Salvia* spr: examples of intraspecific and seasonal variation. V: Sage: The genus *Salvia*. Kintzios S. E. (ur.). Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 69-79
- Hay, R. K. M. 1993. Physiology. V: Volatile oil crops: their biology. Hay R. K. M., Waterman P. (ur.) Harlow, Longman: 23-46
- Hedge, I. C. 1992. A global survey of the biogeography of the *Labiatae*. V: Advances in *Labiata* science. Harley R. M., Reynolds T. (ur.). Kew, Royal Botanical Gardens, Kew: 7-17.
- Hedge, I. C. 1972. *Salvia*. V: Flora Europaea, vol. 3. Tutin, T.G. in sod. (ur.). Cambridge, Cambridge University Press: 188-192
- Hayouni E. A., Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J. Y., Mohammed H., Hamdi M. 2008. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. International Journal of Food Microbiology, 125, 3: 242–251
- Jakše J., Javornik B. 2001. High throughput isolation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Molecular Biology Reporter, 19: 217-226
- Juergens U. R., Dethlefsen U., Steinkamp G., Gillissen A., Repges R., Vetter H. 2003. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. Respiratory Medicine, 97, 3: 250-256.
- Knežević-Vukčević J., Vuković-Gačić B., Stević T., Stanojević J., Nikolić B., Simić D. 2005. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its fractions against UV-induced mutations in bacterial and yeast cells. Beograd, Archives of Biological Sciences, 57, 3: 163-172
- Koroch A. R., Juliani H. R., Zygodlo J. A. 2007. Bioactivity of essential oils and their components. V: Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Berlin, Springer-Verlag: 87-115

- Länger R., Mechtler C., Jurenitsch J. 1998. Composition of the essential oils of commercial samples of *Salvia officinalis* L. and *S. fruticosa* Miller: a comparison of oils obtained by extraction and steam distillation. *Phytochemical Analysis*, 7, 6: 289 – 293
- Länger R., Mechtler C., Tanzler, H. O., Jurenitsch, J. 1993. Differences of the composition of the essential oil within an individuum of *Salvia officinalis*. *Planta Medica*, 59: 635-636
- Maksimović M., Vidic D., Miloš M., Šolić M. E., Abadžić S., Siljak-Yakovlev S. 2007. Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. Brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 473-478
- Mager I. 2008. Žajbelj, nasvet narave. *Dnevnik*, 17.09.2008  
[http://www.dnevnik.si/tiskane\\_izdaje/zdravje/1042207703](http://www.dnevnik.si/tiskane_izdaje/zdravje/1042207703) (5. apr. 2010)
- Manolova N., Serkedjieva J., Ivanova V. 1995. Antiinfluenza activity of the plant preparation Broncho Pam. *Fitoterapia*, 66, 3: 223-226
- Material safety data sheet: Cineole. 2008. Houston, Sciencelab.com, Inc: 6 str.  
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924005> (17. apr. 2010)
- Mirjalili M. H., Salehi P., Sonboli A., Vala M. M. 2006. Essential oil variation of *Salvia Officinalis* aerial parts during its phenological cycle. *Chemistry of Natural Compounds*, 42, 1: 19-23
- Perry N. B., Anderson R. E., Brennan N. J., Douglas M. H., Heaney A. J., McGimpsey J. A., Smallfield B. M., 1999. Essential oils from Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5: 2048-2054
- Piccaglia R., Marotti M. 1993. Characterization of several aromatic plants grown in northern Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 8, 2: 115–122
- Pizzale L., Bortolomeazzi R., Vichi S., Überegger E., Conte L. S. 2002. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 1645–1651
- Putievsky E., Ravid U., Sanderovich D. 1992. Morphological observation and essential oils of sage (*Salvia officinalis* L.) under cultivation. *Journal of Essential Oil Research*, 4: 291–293.
- Putievsky E., Ravid U., Diwan-Rinzler N., Zohary D. 1990. Genetic affinities and essential oil composition of *Salvia officinalis* L., *S. fruticosa* Mill., *S. tomentosa* Mill. and their hybrids. *Flavor and fragrance Journal*, 5: 121-123

- Radosavljević I., Jakše J., Šatović Z., Javornik B., Liber Z. 2010. Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 October 2009 – 30 November 2009 – Isolation and characterization of polymorphic microsatellites loci from common sage (*Salvia officinalis* L. (*Lamiaceae*)). *Molecular Ecology Resources*, 10, 2: 404-408
- Reales A., Rivera D., Palazon J. A., Obon C. 2004. Numerical taxonomy study of *Salvia* sect. *Salvia* (*Labiatae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 145: 353-371
- Santos-Gomes P. C., Fernandes-Ferreira M. 2001. Organ- and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 6: 2908-2916
- Santos-Gomes P. C., Fernandes-Ferreira M. 2003. Essential oils produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8: 2260-2266
- Schall B. A., Hayworth D. A., Olsen K. M., Rauscher J. T., Smith W. A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7: 465-474
- Schauenberg P., Paris F. 1990. Guide to medicinal plants. Cambridge, The Lutterworth Press: 349 str.
- Simon J. E., Chadwick A. F., Craker L. E. 1984. Herbs: an indexed bibliography 1971-1980. The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Hamden, Archon Books: 770 str.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236: 787-792.
- Stancheva I., Geneva M., Hristozkova M., Boychinova M., Markovska Y. 2009. Essential oil variation of *Salvia officinalis* (L.), grown on heavy metals polluted soil. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23, 2: 373-376
- Taarit M. B., Msaada K., Hosni K., Marzouk B. 2010. Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. *Food Chemistry*, 119: 951-956
- Tobias T. 1995. Analiza vsebnosti eteričnega olja in rožmarinske kisline v drogi *Salvia officinalis* L. z metodama GC in HPLC. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 50 str.
- Viljoen A., van Vuuren S., Ernst E., Klepser M., Demirci B., Baser H., van Wyk B. E. 2003. *Osmitopsis asteriscoides* (*Asteraceae*) – the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 2/3: 137-143

- Wagner H., Bladt S. 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2nd ed. Berlin, Springer-Verlag: 184 str.
- Walker J. B., Sytsma K. J., Treutlein J., Wink M. 2004. *Salvia* (*Lamiaceae*) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological spacialization of *Salvia* and tribe *Mentheae*. American Journal of Botany, 91, 7: 1115-1125
- YanLi L., Craker L. E., Potter T. 1996. Effect of light level on essential oil production of sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). Acta Horticulturae, 426: 419–426.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Dei Baričevič za mentorstvo, pomoč in svetovanje pri izdelavi diplomskega dela ter prof. dr. Samu Kreftu za strokovni pregled in predlagane popravke.

Pri delu mi je bila v veliko pomoč Petra Ratajc, ki mi je pomagala na tisoč in en način in mi dajala spodbudo, za kar se ji iskreno zahvaljujem.

Eksperimentalno delo na Katedri za pedologijo in varstvo okolja sta mi omogočili Andreja Hodnik in Zalka Ilc, ki sta mi pri delu tudi pomagali.

Zahvaljujem se še Nevenki Valič za vso strpnost in pomoč pri pospešenem prijavljanju diplomskega dela.

Hvala moji družini za omogočenje in vso podporo pri študiju.