

CERCETĂRI FARMACOGNOSTICE
ASUPRA SPECIEI *Salvia officinalis* L. (*Lamiaceae*)

TEZĂ DE DOCTORAT

R e z u m a t

Autor: Tiberiu Sebastian Németh

Conducător științific: Prof.dr. Honorius Popescu

Membru al Academiei Internaționale de Istoria Farmaciei

Membru de onoare al Academiei de Științe Medicale

Cluj, 2009

Planul tezei

1. Introducere

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

2. Date botanice asupra speciei *Salvia officinalis* L.
3. Date fitochimice asupra *Salvia officinalis* L.
4. Acțiuni farmacologice și utilizări

CONTRIBUȚII PERSONALE

5. Cercetări genetice asupra speciei *Salvia officinalis* L
6. Cercetări microscopice asupra unor specii de *Salvia*
7. Analiza fitochimică preliminară asupra produsului vegetal *Salviae folium*
8. Cercetări prin CSS asupra flavonoidelor din *Salviae folium*
9. Cercetări prin HPLC asupra compușilor polifenolici din *Salviae folium* și *S.herba*
- 10.. Studiul comparativ privind compușii polifenolici din *Salviae officinalis folium*, *S. pratensis Folium* și *S. sclareae folium*
11. Analiza acidului cafeic din extracte de *Salvia officinalis* L.
12. Analiza acidului rosmarinic din extracte de *Salvia officinalis* L.
13. Analiza compușilor sterolici din extracte de *Salvia officinalis* L.
14. Cercetări asupra uleiului volatil obținut din *Salviae folium*
15. Cercetări privind conținutul în acid ascorbic al produsului vegetal *Salviae folium*
16. Identificarea și dozarea substanțelor minerale și microelementelor din *Salviae folium*
17. Concluzii generale
18. Bibliografie

Rezumatul tezei

Salvia officinalis L. (*Lamiaceae*)– jaleș, plantă mediterană, crește spontan. În România se cultivă. Este perenă și se menține în cultură 5-6 ani. Înfloarește în mai – iunie.

Compușii chimici principali cunoscuți în produsul *Salviae officinalis folium* (*Salviae folium*) sunt: uleiul volatil, derivați polifenolici, di- și triterpenoide, steroli, vitamina C, acizi organici, cumarine, oze, substanțe minerale.

În fitoterapie se folosește atât produsul *Salviae folium*, sub formă de infuzie, decoct și extract alcoolic, cât și uleiul volatil obținut din frunze.

Dintre acțiunile farmacologice, cele mai cunoscute sunt: aromatizantă, coleretic-colagogă, antisudorifică, antibiotică, expectorantă, venotonică, astringentă, antiinflamatoare, antifungică, hiperemiantă, antioxidantă.

Pentru contribuțiile personale s-au efectuat cercetări genetice, microscopice, identificarea chimică preliminară a principalelor clase de componente, cercetarea comparativă a polifenolilor și a sterolilor din patru specii de *Salvia*, acidul ascorbic, uleiul volatil, microelementele și s-a elaborat un preparat fitoterapeutic cu eventuale proprietăți de tratament în parodontoză.

Caracterele genetice ale eșantioanelor de *Salvia officinalis* L., recoltate din câteva zone geografice (România, Ungaria, Grecia) arată un grad înalt de polimorfism și demonstrează variații genetice între diferitele populații ale speciei.

Prin cercetările microscopice s-a realizat identificarea caracterelor de diferențiere între speciile de *Salvia officinalis* L., *S. nemorosa* L., *S. verticillata* L. și *S. pratensis* L. Probele au fost recoltate în anul 2005 din grădinile Botanice ale Facultăților de Farmacie din Tg Mureș, Pecs (Ungaria), respectiv din localitatea Cefa județul Bihor (*Salvia pratensis* L.)

S-au studiat comparativ probe din frunză, tulpină, pețiol, floare, secțiuni transversale și de suprafață. Comparând 143 de secțiuni, s-au constatat diferențe caracteristice în numărul perilor tectori pe epiderme (pe lungimea de 1000 μm), precum și în dimensiunile acestora.

Pentru analiza fitochimică preliminară, s-au efectuat extracții succesive și selective folosind solvenți de polarități diferite. Au rezultat: soluția eterică, soluția alcoolică, soluția apoasă. Clasele mai importante de compuși identificate în produsul vegetal au fost: ulei volatil, flavonoide, taninuri catechice, steroli, acizi uronici și oze. Pentru saponozide, rezultatul a fost neconcludent. S-a efectuat și un studiu comparativ, pe material vegetal recoltat din diferite zone geografice, în anul 2005.

Produsul vegetal destinat cercetărilor în detaliu a fost recoltat în luna iunie 2005, din localitatea Romos jud. Hunedoara.

În cadrul analizei calitative prin metoda CSS s-a utilizat ca fază fixă Silicagel GF254 pe folie de plastic, faza mobilă: acetat de etil – apă - acid formic - acid acetic 72:14:7:7 v/v,

revelator, reactivul NEU-PEG (după Jork). Pentru acidul rosmarinic s-au folosit aceleași tehnici, dar faza mobilă a fost toluen - acetat de etil - acid formic 5:3:1 v/v.

În urma analizei s-a constatat lipsa quercetolului, dar sunt prezente apigenina și luteolina, de asemenea apare și acidul cafeic rezultat în urma hidrolizei acidului rosmarinic.

Din materialul recoltat din diferite zone geografice în iunie 2005, au fost luate în studiu extractele etanolice, aplicând normele prescrise de FR X.

Pentru analiza compușilor polifenolici s-a folosit cromatografia de lichide de înaltă performanță, cuplată cu spectrometria de masă (LC/MS). Metoda utilizată se bazează pe o tehnică HPLC publicată în literatura de specialitate, la care s-au adus unele modificări. Principala modificare adusă metodei inițiale este schimbarea fazei mobile (s-a înlocuit fosfatul de potasiu cu acid acetic), astfel încât de la faza mobilă cu componente nevolatile s-a ajuns la una total volatilă. Au fost utilizate 18 standarde de compuși polifenolici. Acestea au fost: acid cafeic, acid clorogenic, acid caftaric, acid genistic, acid p-cumaric, acid cumaric, acid ferulic, acid sinapic, hiperozid, isoquercitin, rutozid, miricetol, fisetina, quercitin, quercetol, patuletina, luteolina, kaempferol și apigenina.

La cercetarea compușilor polifenolici s-au analizat în paralel câte două probe, una hidrolizată și una nehidrolizată. În cadrul acestui studiu comparativ s-a cercetat produsul vegetal *Salviae officinalis folium* (5 probe), recoltat din diferite zone geografice (Romos-România, Ungaria, Grecia, Albania, Olanda) și produsul vegetal *Salviae officinalis herba* (Romos – România). Ca urmare studiului efectuat s-a putut constata următoarele:

În toate probele analizate, compusul dominant este luteolina. În produsul vegetal recoltat în zona Romos = 8,8240 μg /mL în extract. În materialul vegetal = 0,17648 mg/g.

Acidul ferulic, luteolina și apigenina se găsesc în proporții mai mari în probele hidrolizate.

Conținutul cel mai mare de acid cafeic 0,530 mg/g probă plantă a fost identificat în proba nr 5 (*Salviae folium* – Romos). Proporția apropiată de aceasta s-a semnalat în proba nr.4 (*Salviae folium* – Olanda). Conținutul cel mai mic în acid cafeic îl are proba nr.6 (0,190 mg/g probă-plantă) adică tulpina fără frunze (Romos). S-a constatat că după hidroliză concentrația acidului cafeic crește de 4-5 ori, față de probele nehidrolizate, în urma eliberării acestuia din esteri.

Proporția maximă de acid rosmarinic a fost semnalată în proba nr.5: 11,87 mg/g probă-plantă (*Salviae folium* – Romos). Valoare apropiată s-a găsit în proba nr. 2 (Grecia).

Pentru a avea o imagine mai complexă privind derivații polifenolici s-au luat în studiu încă două specii: *Salvia sclarea* L.(plantă cultivată) și *Salvia pratensis* L.(specie din flora spontană). S-a constatat că în toate probele (hidrolizate și nehidrolizate), polifenolii principali sunt luteolina și apigenina. Conținutul maxim a fost în extractul etanolic (50^o) din *Salviae folium* din România și Olanda.

În scopul cercetării sterolilor, s-a folosit metoda HPLC, aplicând o tehnică publicată în literatura de specialitate, în care s-au adus modificări. Principala modificare adusă metodei inițiale este schimbarea coloanei cromatografice și a debitului fazei mobile. Ca rezultat, față de metoda publicată în literatura de specialitate, timpul de analiză a scăzut de la 30 minute la 5 minute, fără a afecta separarea și rezoluția sterolilor. Pentru determinarea cantitativă au fost utilizate 3 standarde, beta-sitosterol, stigmasterol și colesterol. În prima fază au fost analizate 8 extracte etanolicе (FR X). Din aceste probe s-au identificat și dozat colesterolul și sitosterolul în cantități variabile. Stigmasterolul nu a fost decelat, din acest motiv s-a efectuat și o extracție metanolică într-un aparat Soxhlet. Comparând 4 extracte metanolicе obținute din *Salvia officinalis* L., recoltată din zona Romos (frunze uscate, frunze proaspete, rădăcină uscată, semințe uscate) s-a identificat și cuantificat stigmasterolul, pe lângă sitosterol și colesterol. De asemenea, s-a observat că prin aplicarea extracției continue folosind aparatul Soxhlet, sterolii se extrag mult mai bine.

Uleiul volatil este componentul principal și aromatic al speciei *Salvia officinalis* L., asupra căruia s-au efectuat cercetări calitative și cantitative. Obținerea și determinarea cantitativă acestuia s-a făcut după prevederile FR X, folosind aparatul Neo-Clevenger.

Identificarea și dozarea compușilor chimici din *Salviae aetheroleum* s-a realizat aplicând CSS și gazcromatografia. Prin extracția supercritică urmată de o analiză gazcromatografică, s-a semnalat prezența a 2 compuși chimici (kauren și guaiol) care nu sunt citați în literatura de specialitate consultată.

Pentru determinarea acidului ascorbic din frunze uscate de jaleș, s-a folosit o metodă de dozare potențiometrică, folosind electrozi de pastă de carbon. S-au cercetat două extracte, unul hidroalcoholic (macerat) și altul apos (infuzie), obținute din produsul vegetal recoltat în anul 2005, din zona Romos. Rezultatele sunt concordante cu maximele altor cercetători.

Prin analiza elementară a produsului *Salviae folium*, s-au pus în evidență 30 de elemente și microelemente.

CURRICULUM VITAE

INFORMAȚII PERSONALE

Nume **NEMETH TIBERIU SEBASTIAN**
Adresă **STR. TRANSILVANIEI NR17 BLAN3, 410412, ORADEA, ROMANIA**
Telefon **0740-521753**
Fax
E-mail snemeth@uoradea.ro

Naționalitate Romana
Data nașterii 31.03.1979

EXPERIENȚA PROFESIONALĂ

2008-PREZENT
Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicina si Farmacie
Asistent universitar
2003-2008
Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicina si Farmacie
Preparator universitar

STUDII ȘI CURSURI DE SPECIALITATE

2008-2009 Masterat „Formarea profesorilor”
Universitatea din Oradea, Departamentul pentru Pregatirea si Perfectionarea Personalului Didactic
Atestat psihopedagogic
2005-2006 Masterat “Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie”
Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, Specializarea Farmacie
Diploma de master
1998-2003 Facultatea de Medicină și Farmacie, Specializarea Farmacie
Diploma de licență
1992-1997 Colegiul National Mihai Eminescu, profil Chimie-Biologie
Diploma de bacalaureat

LIMBI STRĂINE CUNOSCUTE

- Abilitatea de a citi
- Abilitatea de a scrie
- Abilitatea de a vorbi

ENGLEZĂ
AVANSAT
AVANSAT
AVANSAT

APTITUDINI ȘI COMPETENȚE TEHNICE

UTILIZAREA PROGRAMELOR MICROSOFT OFFICE (WORD, EXCEL, POWERPOINT) ȘI A APLICAȚIILOR GRAFICE ADOBE ILLUSTRATOR, PHOTOSHOP ETC.
- UTILIZAREA ECHIPAMENTELOR ȘI INSTALAȚIILOR DE LABORATOR (CROMATOGRAFE, SPECTROFOTOMETRE, ANALIZOARE, ETC.).

INFORMAȚII SUPLIMENTARE**APARTENENȚĂ LA ASOCIAȚII ȘI SOCIETĂȚI PROFESIONALE ȘI ȘTIINȚIFICE:**

2004 - Membru în Societatea Română de Chimie

2004 - Membru în AMAPSEEC

2003 - Membru în Societatea de Științe Farmaceutice din România

2003 - Membru în Uniunea Medicală Balcanică

2003 – Membru în Colegiul Farmaciștilor din Bihor

PUBLICAȚII ȘTIINȚIFICE ȘI DIDACTICE:

Lucrări științifice publicate: 20

Cărți de specialitate in edituri: 3

PHARMACOGNOSTIC RESEARCHES
ON THE *Salvia officinalis* L. (*Lamiaceae*) SPECIES

DOCTORAL THESIS

A b s t r a c t

Author: Tiberiu Sebastian Németh

Scientific Director: Prof.Dr. Honorius Popescu

Member of the International Academy of the History of Pharmacy

Member of Honor of the Academy of Medical Sciences

Cluj, 2009

Plan of the thesis

1. Introduction

CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE

2. Botanical data on the *Salvia officinalis* L. species

3. Phytochemical data on *Salvia officinalis* L.

4. Pharmacological actions and uses

PERSONAL CONTRIBUTIONS

5. Genetic researches on the *Salvia officinalis* L. species

6. Microscopic researches on some *Salvia* species

7. Preliminary phytochemical analysis on the *Salviae folium* plant product

8. TLC researches on flavonoids from *Salviae folium*

9. HPLC researches on polyphenolic compounds from *Salviae folium* and *S. herba*

10. Comparative study on polyphenolic compounds from *Salviae officinalis folium*, *S. pratensis Folium* and *S. sclareae folium*

11. Analysis of caffeic acid from *Salvia officinalis* L. extracts

12. Analysis of rosmarinic acid from *Salvia officinalis* L. extracts

13. Analysis of sterol compounds from *Salvia officinalis* L. extracts

14. Researches on volatile oil obtained from *Salviae folium*

15. Researches on the ascorbic acid content of the *Salviae folium* plant product

16. Identification and dosage of mineral substances and microelements from *Salviae folium*

17. General conclusions

18. Bibliography

Abstract of the thesis

Salvia officinalis L. (*Lamiaceae*) – sage, a Mediterranean plant, grows spontaneously. In Romania, it is cultivated. It is a perennial plant which is maintained in culture for 5-6 years. It flowers in May - June.

The main chemical compounds known in the *Salviae officinalis folium* (*Salviae folium*) product are: volatile oil, polyphenolic derivatives, di- and triterpenoids, sterols, vitamin C, organic acids, coumarins, oses, mineral substances.

In phytotherapy, the *Salviae folium* product in the form of infusion, decoction and alcohol extract, as well as the volatile oil obtained from leaves are used.

The best known pharmacological actions include: aromatizing, choleric-cholagogic, antiperspirant, antibiotic, expectorant, venotonic, astringent, antiinflammatory, antifungal, hyperemic, antioxidant action.

The personal contributions included genetic, microscopic researches, the preliminary chemical identification of the main classes of components, the comparative research of polyphenols and sterols from four *Salvia* species, ascorbic oil, volatile oil, microelements, and a phytotherapeutic preparation with potential properties for the treatment of periodontitis was elaborated.

The genetic characters of the *Salvia officinalis* L. samples, harvested from several geographic areas (Romania, Hungary, Greece) show high polymorphism and demonstrate genetic variations between the different populations of the species.

The microscopic researches allowed to identify the differentiation characters between the *Salvia officinalis* L., *S. nemorosa* L., *S. verticillata* L. and *S. pratensis* L. species. The samples were collected in 2005 from the Botanical Gardens of the Faculties of Pharmacy of Tg. Mureş, Pecs (Hungary), and the locality Cefa from Bihor county (*Salvia pratensis* L.)

Leaf, stem, leaf stalk, flower samples, cross and surface sections were comparatively studied. By comparing 143 sections, characteristic differences in the number and size of tector hairs from the epidermis (over a 1000 µm length) were found.

For the preliminary phytochemical analysis, successive and selective extractions were performed using solvents with different polarities. The ether solution, the alcohol solution, the aqueous solution resulted. The most important classes of compounds identified in the plant product were: volatile oil, flavonoids, catechic tannins, sterols, uronic acids and oses. For saponosides, the result was non-conclusive. A comparative study on plant material collected from various geographic areas in 2005 was also performed.

The plant product intended for detailed researches was harvested in June 2005, from the

locality Romos, Hunedoara county.

For qualitative analysis by TLC, Silicagel GF254 was used as a fixed phase on a plastic foil, mobile phase: ethyl acetate – water – formic acid – ethyl acid 72:14:7:7 v/v, developer, NEU-PEG reagent (according to Jork). For rosmarinic acid, the same techniques were used, but the mobile phase was toluene – ethyl acetate – formic acid 5:3:1 v/v.

Following the analysis, the absence of quercetol was found, but apigenin and luteolin were present, as well as caffeic acid resulting from the hydrolysis of rosmarinic acid.

Ethanol extracts of the material collected from various geographic areas in June 2005 were studied, by applying the norms prescribed by FR X.

For the analysis of polyphenolic compounds, high performance liquid chromatography was used, coupled with mass spectrometry (LC/MS). The method used was based on a HPLC technique published in the literature, with certain changes. The main modification of the initial method was the change of the mobile phase (potassium phosphate was replaced by acetic acid), so that the mobile phase with non-volatile components was changed into a completely volatile phase. 18 standards of polyphenolic compounds were used. These were: caffeic acid, chlorogenic acid, caftaric acid, genistic acid, p-coumaric acid, coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, hyperoside, isoquercitin, rutoside, miricetol, fisetin, quercitin, quercetol, patuletin, luteolin, kaempferol, and apigenin.

For the research of polyphenolic compounds, two samples were analyzed in parallel, one hydrolyzed and the other unhydrolyzed. In this comparative study, the *Salviae officinalis folium* plant product (5 samples), harvested from various geographic areas (Romos-Romania, Hungary, Greece, Albania, Netherlands) and the *Salviae officinalis herba* plant product (Romos – Romania) were researched. The study showed the following:

In all analyzed samples, the dominant compound was luteolin. In the plant product harvested from the Romos area, luteolin = 8.8240 µg /mL in extract. In plant material, luteolin = 0.17648 mg/g.

Ferulic acid, luteolin and apigenin were found in high proportions in the hydrolyzed samples.

The highest caffeic acid content, 0.530 mg/g plant sample, was identified in sample no. 5 (*Salviae folium* – Romos). A proportion close to this was reported in sample no. 4 (*Salviae folium* – Netherlands). The lowest caffeic acid content was found in sample no. 6 (0.190 mg/g plant sample), i.e. in leafless stem (Romos). After hydrolysis, the concentration of caffeic acid was found to increase 4-5 fold compared to unhydrolyzed samples, following its release from esters.

The highest proportion of rosmarinic acid was reported in sample no. 5: 11.87 mg/g plant sample (*Salviae folium* – Romos). A value close to this was found in sample no. 2 (Greece).

In order to have a more complex picture of polyphenolic derivatives, two other species were included in the study: *Salvia sclarea* L. (a cultivated plant) and *Salvia pratensis* L. (a spontaneous flora species). In all (hydrolyzed and unhydrolyzed) samples, the main polyphenols were luteolin and apigenin. The highest content was in the ethanol extract (50°) of *Salviae folium* from Romania and Netherlands.

For the study of sterols, the HPLC method was used, by applying a technique published in the literature, to which certain changes were made. The main modification of the initial method was the change in the chromatographic column and in the mobile phase flow rate. As a result, compared to the method published in the literature, the analysis time was reduced from 30 minutes to 5 minutes, without affecting the separation and the resolution of sterols. For the quantitative determination, 3 standards were used, beta-sitosterol, stigmasterol and cholesterol. In the first phase, 8 ethanol extracts (FR X) were analyzed. Of these samples, cholesterol and sitosterol were identified and dosed in variable amounts. Stigmasterol was not detected, which is why methanol extraction was also performed in a Soxhlet apparatus. By comparing 4 methanol extracts obtained from *Salvia officinalis* L., harvested from the Romos area (dry leaves, fresh leaves, dry root, dry seeds), stigmasterol was identified and quantified in addition to sitosterol and cholesterol. It was also found that by the application of continuous extraction using the Soxhlet apparatus, sterols were much better extracted.

Volatile oil is the main aromatic component of the *Salvia officinalis* L. species, in which qualitative and quantitative researches were performed. Its obtaining and qualitative determination were in accordance with FR X provisions, using the Neo-Clevenger apparatus.

The identification and the dosage of the chemical compounds from *Salviae aetheroleum* were performed using TLC and gas chromatography. By supercritical extraction followed by gas chromatographic analysis, the presence of 2 chemical compounds (kauren and guaiol) was reported, which are not cited in the consulted literature.

For the determination of ascorbic acid from dry sage leaves, a potentiometric dosage method was employed, using carbon paste electrodes. Two extracts were studied, one hydroalcoholic (macerated) and the other aqueous (infusion), obtained from the plant product harvested in 2005, from the Romos area. The results are in accordance with the maximum values of other researchers.

The elementary analysis of the *Salviae folium* product evidenced 30 elements and microelements.

CURRICULUM VITAE

PERSONAL INFORMATION

Name **NEMETH TIBERIU SEBASTIAN**
Address **TRANSILVANIEI ,17 BLAN3, 410412, ORADEA, ROMANIA**
Telephone **+40 740/521753**
Fax
E-mail snemeth@uoradea.ro
Nationality Romanian
Date of birth 31.03.1979

EXPERIENCE

2008-PRESENT DAY
University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy
Teaching assistant
2003-2008
University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy
Junior teaching assistant

EDUCATION AND TRAINING

2008-2009 Master „Teachers’ Training”
University of Oradea, The Teacher Training Department
Certificate
2005-2006 Master “Farmacognozie, Fitochemistry, Fitotherapy”
University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, Speciality Pharmacy
Master’s Degree
1998-2003 Faculty of Medicine and Pharmacy, Speciality Pharmacy
Bachelor’s Degree
1992-1997 „Mihai Eminescu” High School, Speciality Chemistry-Biology
Baccalaureate Diploma

OTHER LANGUAGE(S)

ENGLISH

- Reading level ADVANCED
- Writing level ADVANCED
- Speaking level ADVANCED

PERSONAL SKILLS AND TECHNICAL COMPETENCES

THE USE OF MICROSOFT OFFICE PROGRAMME (WORD, EXCEL, POWERPOINT) AND OF THE GRAPHIC APITUDES ADOBE ILLUSTRATOR, PHOTOSHOP ETC.
- THE USE LAB EQUIPMENTS

OTHERS**MEMBERSHIP**

2003 - The Romanian Society of Pharmacy Sciences

2003 – Balkan Medical Union

2003 – The Romanian Pharmaceutical Society

2004 - The Romanian Society of Chemistry

2004 - Association for Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries

Journal Publications: 20

Books: 3