Salvia, *Lavandula* és *Morus* taxonok fitokémiai jellemzése terpén vegyületeik alapján

Doktori értekezés

Dr. Böszörményi Andrea

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető:	Dr. Lemberkovics Éva egyetemi tanár a kémiai tudomány kandidátusa
Hivatalos bírálók:	Dr. Németh Éva DSc. Dr. Hajdú Zsuzsanna PhD.
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Török Tamás egyetemi tanár DSc.
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Máthé Imre egyetemi tanár DSc. Dr. Sátory Éva egyetemi tanár DSc.

Budapest
2010

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4

1. BEVEZETÉS 5

2. IRODALMI HÁTTÉR 7

2.1. *Salvia* taxonok bemutatása 7

2.1.1. Rendszertani besorolás 7
2.1.2. Farmakobotanikai jellemzés 7
2.1.2.1 *Salvia officinalis* L. 7
2.1.2.2. *Salvia judaica* Boiss. 9
2.1.2.3. *Salvia africana-caerulea* L. 9
2.1.2.4. *Salvia mexicana* L. 10
2.1.3. *Salvia* taxonok drogjai 10
2.1.4. *Salvia* taxonokra jellemző hatóanyag csoportok 11
2.1.4.1. Illóolaj és vizsgálatára alkalmazott módszerek 11
2.1.4.2. Di- és triterpének 12
2.1.4.3. Egyéb hatóanyag csoportok 13
2.1.5. *Salvia* taxonok fitoterápiás jellemzése 13
2.1.6. *Salvia* taxonok készítményei és terápiás alkalmazása 15

2.2. *Lavandula* taxonok bemutatása 16

2.2.1. Rendszertani besorolás 16
2.2.2. Farmakobotanikai jellemzés 16
2.2.2.1 *Lavandula vera* DC. (syn. *L. angustifolia* Mill., *L. officinalis*L.) 16
2.2.2.2. *Lavandula intermedia* Emeric. 17
2.2.2.3. *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* L. 18
2.2.2.4. *Lavandula dentata* L. 19
2.2.3. *Lavandula* taxonok drogjai 19
2.2.4. *Lavandula* taxonokra jellemző hatóanyag csoporok 20
2.2.4.1. Illóolaj, és vizsgálatára alkalmazott extrakciós, analítikai módszerek 20
2.2.4.2. Triterpének 22
2.2.5. *Lavandula* taxonok fitoterápiás jellemzése 23
2.2.6. *Lavandula* taxonok terápiás és tradícionális felhasználása 25

2.3. *Morus alba* L. bemutatása 25

2.3.1. Rendszertani besorolás 25
2.3.2. Farmakobotanikai jellemzés 26
2.3.3. *Morus alba* drogjai 27
2.3.4. *Morus alba* jellemző hatóanyag csoportjai 28
2.3.4.1. Triterpének és gázkromatográfiás vizsgálati módszerek 28

2.3.4.2. Egyéb hatóanyag csoportok ... 29
2.3.5. *Morus alba* fitoterápiás jellemzése ... 29
2.3.6. *Morus alba* készítményei és népgyógyászati alkalmazása ... 31

3. CÉLKITŰZÉSEK ... 32

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK ... 34

4.1. Vizsgálati anyagok ... 34

4.1.1. Növényanyag ... 34
4.1.1.1. Salvia levél és virág ... 34
4.1.1.2. *Lavandula* virág és levél ... 34
4.1.1.3. *Morus alba* levél és ágkéreg ... 35
4.1.2. Vegyszerek ... 35

4.2. Vizsgálati módszerek ... 36

4.2.1. Minták előkészítése, szárítás, szárítási veszteség meghatározása ... 36
4.2.2. Extrakciós és tisztítási módszerek ... 36
4.2.2.1. Illóolajok vízgőzdesztillációja ... 36
4.2.2.2. Szilárd fázisú mikroextrakció (SPME) ... 37
4.2.2.3. DNS extrakció ... 37
4.2.2.4. Oldószeres extrakció Soxhlet készülékben ... 38
4.2.2.5. Szuperkritikus Fluid Extrakció (SFE) ... 39
4.2.2.5.1. Laboratóriumi (analitikai) szuperkritikus extrakció ... 39
4.2.2.5.2. Félüzemi szuperkritikus extrakció ... 39
4.2.2.6. Tisztítás elszappanosítással ... 40
4.2.3. Analitikai módszerek ... 40
4.2.3.1. Vékonyrétegkromatográfia (fitoszterolok, triterpének elővizsgálata) ... 40
4.2.3.2. Gázkromatográfiás vizsgálatok ... 40
4.2.3.2.1. Illóolajösszetétel gázkromatográfiás (GC-FID) vizsgálata ... 40
4.2.3.2.2. Szterolok és triterpének gázkromatográfiás (GC-FID) kvantitatív meghatározása belső standard alkalmazásával ... 41
4.2.3.2.3. Gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás vizsgálatok ... 42
4.2.3.3. Molekuláris taxonómiai vizsgálatok ... 42
4.2.3.3.1. PCR reakció ... 42
4.2.3.3.2. Gél elektroforézis ... 43
4.2.4. Statisztikai módszerek ... 44

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK ... 46

5.1. *Salvia* fajok vizsgálati eredményei ... 46

5.1.1. Salviae folium összillóolaj tartalma ... 46
5.1.2. Salviae folium és flos illóolajok kvalitatív vizsgálata ... 47
5.1.3. *Salvia* levél illóolajok kvantitatív (összetétel) vizsgálata ... 51
5.1.4. *Salvia officinalis* levél és virág illóolajának összehasonlítása ... 54

5.1.5. *Salvia officinalis* díszváltozatok levél-illóolaj tartalmának és összetételének vizsgálata a virágzás során ... 56
5.1.6. In vitro mikroszaporítással előállított *Salvia africana-caerulea* levél illóolaj vizsgálata ... 58
5.1.7. Kivonási módszerek hatása az illó komponensek összetételére ... 60
5.1.8. *Salvia* taxonok molekuláris- és kemotaxonómiai vizsgálata ... 64
5.1.8.1. RAPD markerek és az illókomponensek százalékos megoszlása alapján végzett taxonómiai vizsgálatok összehasonlítása ... 64
5.1.8.2. PCA analízis az illóolaj összetétel (kvalitatív és kvantitatív) alapján ... 66

5.2. *Lavandula* fajok vizsgálati eredményei ... 69

5.2.1. Lavandulae flos összillóolaj tartalma ... 69
5.3.2. *Lavandula* virág illóolajok kvalitatív vizsgálata ... 70
5.2.3. *Lavandula* virág illóolajok kvantitatív (összetétel) vizsgálata ... 75
5.2.4. *Lavandula dentata* virág és levél illóolajának összehasonlítása ... 77
5.2.5. Kivonási módszerek hatása a *Lavandula* virág illóolaj-összetételére ... 79
5.2.6. *Lavandula* taxonok kemotaxonómiai vizsgálata az illóolajösszetétel alapján . 82

5.3. *Morus alba* levél és ágkéreg vizsgálata ... 85

5.3.1. *Morus alba* levél és ágkéreg oldószeres és szuperkritikus kivonatok terpénjeinek vékonyrétegkromatográfiás vizsgálata ... 85
5.3.2. Terpének azonosítása *Morus alba* kivonatokban GC-MS módszerrel ... 87
5.3.3. Különböző kivonási módszerek β-szitoszterol tartalmat, illetve terpén összetételt befolyásoló hatásának vizsgálata ... 89
5.3.3.1. A kivonási módszerek β-szitoszterol tartalomra gyakorolt hatása ... 91
5.3.3.2. Kivonási módszerek hatása a di-, és triterpén összetételre ... 92
5.3.4. *Morus* levél β-szitoszterol tartalmának és terpénösszetételének alakulása termésérés során ... 93

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS ÚJ EREDMÉNYEK ... 94

7. ÖSSZEFOGLALÁS ... 105

8. SUMMARY ... 107

IRODALOMJEGYZÉK ... 109

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE ... 121

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ... 122

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ANOVA	variancia analízis (Analysis of Variance)
BFB	bromo-fluoro-benzén
cAMP	ciklikus adenozin-monofoszfát
CW-DVB	carbowax-divinylbenzol
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
FID	lángionizációs detektor (Flame Ionisation Detector)
GC	gázkromatográfia
ISO	International Organization for Standardization
LOD	a kimutathatóság alsó határa (Limit of Detection)
LOQ	mérési határ (Limit of Quantitation)
MQ	Milli-Q tridesztillált víz
MS	tömegspektroszkópia (Mass Spectroscopy)
NIST	National Institute of Standards and Technology
PA	poliacetilén
PCA	főkomponens analízis (Principal Component Analysis)
PCR	polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction)
PDMS-DVB	polidimetilsziloxán-divinilbenzol
RAPD	véletlenszerűen sokszorozott polimorf DNS (Random Amplyfied Polymorfic DNA)
RSD	relatív standard deviáció
SFE	szuperkritikus fluid extrakció
SPME	szilárdfázisú mikroextrakció
TBE	trisz-borát-EDTA puffer
TPA	12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetát
t_R	retenciós idő
UPGMA	csoportátlag módszer (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages)
VRK	vékonyréteg-kromatográfia

1. BEVEZETÉS

Az illóolajok, szterolok és triterpének analitikájában jelentős szerepet játszik a gázkromatográfia. A szakirodalomban a növények és drogok beltartalmi jellemzésére sok, gyakran eltérő érték található, ami nem feltétlenül a minta változatosságából, hanem a módszerek apró részleteinek eltéréséből adódnak; ezért szükség van gyors, megbízható és pontos elválasztás-technikákra a már ismert gázkromatográfiás módszeren belül is.

A tömegspektrometriás detektálást az 1950-es évektől alkalmazzák komponensek azonosítására. A terpénösszetétel százalékos meghatározására a lángionizációs detektálás alkamasabb, mivel érzékenysége nagyobb, és az illóolajok esetében a területnormalizációs értékelés pontos eredményt ad, minthogy az illóolaj minta teljes egészében eluálódik a kromatográfiás oszlopról (Gohlke 1959, 1993). A szterolok és triterpének százalékos jellemzésére a területnormalizáció nem megfelelő, mivel a komponensek kevésbé illékonyak és a kivonat nem kerül teljes egészében a detektálásra, kvantitatív jellemzésüket egy belső standard vegyülethez viszonyítva célszerű végezni.

Az illó komponensek a növényben lévő eredeti arányának meghatározása nehéz feladat, mivel az extrakciós módszer befolyásolhatja az összetételt. Az illóolaj vízgőzdesztillációjakor a magas hőmérséklet és a vizes közeg hatására egyes komponensek (pl. észterek, éterek, laktonok) hidrolizálhatnak, és egyéb szerkezeti átalakulások (pl. izomerizáció) is elképzelhetőek. A növények illatát legjobban megközelítő illóolaj összetételt szilárdfázisú mikroextrakcióval határozhatjuk meg (An és mtsai 2001, Deng és mtsai 2003).

Utóbbi évtizedekben egyre inkább elterjedt módszer a szuperkritikus fluid extrakció (SFE). A kivonás fluid állapotú (kritikus hőmérséklet feletti magas nyomású) indifferens gázok, többnyire $C0_2$ segítségével történik. A módszer elsősorban apoláris jellegű vegyületek kivonására alkalmas; előnye, hogy a fluid gáz nyomásának csökkentésével a kivonatból az oldószer nyom nélkül eltávolítható (Ambrus és mtsai 2006).

Az illóolaj tartalom és összetétel környezeti és genetikai tényezőktől egyaránt függ. Egyes esetekben a növénykémiai analízisek mellett fontos lehet a molekuláris

taxonómiai vizsgálat. A DNS alapú molekuláris markereket használják taxonazonosításra, illetve genetikai törvényszerűségek meghatározására. A RAPD markerek tanulmányozása gyors, DNS szekvenálás nélküli eszköz a genotípusok molekuláris taxonómiai jellemzésére. A kémiai és genetikai profil alapján felállított rokonsági mintázat összehasonlítása a kémiai tulajdonságok genetikai meghatározottságára utal, ugyanakkor bizonyítja, a kémiai jellemzők alkalmasságát a genetikai rokonság jellemzésére (Vieira és mtsai 2001, Echeverrigaray és mtsai 2001) .

Általában olyan modellnövényekre esik a választás, amelyek hatásának bizonyítása, vagy az alapanyagok (fajok, fajták) választékának bősége, továbbá a farmakológiailag aktív vegyületek, vagy hatóanyag-csoportok pontos azonosítása és mennyiségi mérése fontos gyakorlati feladat.

Az orvosi zsálya (*Salvia officinalis* L.) az egyik legfontosabb gyógynövény a *Lamiaceae* családban. A zsálya gyakori összetevője többkomponensű termékeknek és táplálékkiegészítőknek (Baricevic és mtsai 1986., Farag és mtsai 1986). Drogjai és tinktúrája hivatalosak több gyógyszerkönyvben (pl. a 8. Magyar Gyószerkönyvben és a 6. Európai Gyógyszerkönyvben). Jelentős hatóanyaga a vérnyomáscsökkentő, antimikróbás, görcsoldó hatású illóolaja (Liptak és mtsai 1995), melynek fő komponense a neurotoxikus tujon, belsőleg csak fokozott körültekintéssel alkalmazható.

A valódi levendula (*Lavandula angustifolia* Mill., *L. officinalis* L., *L. vera* DC.,) szintén a család kiemelkedő fontosságú, nyugtató, altató, anxiolítikus, antidepresszáns hatású gyógynövénye. Legfontosabb hatóanyaga az illóolaj, melynek fő komponensei a linalool és a linalil-acetát. A valódi levendula illóolaja és teljes virágzás előtt gyűjtött szárított virága hivatalos a 8. Magyar Gyógyszerkönyvben, és a 6. Európai Gyógyszerkönyvben; emellett az egyik legkedveltebb illatanyagként a kozmetikai iparban is jelentős szerepet játszik (Szendrei és Csupor 2009).

A fehér eperfa (*Morus alba* L., Moraceae) a távolkeleten tradícionálisan használt gyógynövény. A Mori folium kísérletes vizsgálata két évtizede intenzíven folyik és jelentős eredményeket hozott a diabetes terápiájában. Jelenleg az Európai Unióban több eperfalevelet tartalmazó étrend-kiegészítő készítmény is forgalomban van. Szterol és triterpén tartalmának köszönhetően (pl. β-amirin) gyulladáscsökkentő aktivitása a proteinkináz C enzim gátlásán alapul (Szendrei és mtsai 2006, Yun és mtsai 1999).

2. IRODALMI HÁTTÉR

2.1. *Salvia* taxonok bemutatása

2.1.1. Rendszertani besorolás

A *Salvia* fajok a kétszikűek osztályába, a Lamiidae (régi nevén Tubuliflorae, Tubiflorae) alosztályba, Schrophularianae rendcsoportba, Lamiales (ajakos-virágúak, árvacsalán-virágúak) rendbe, a Lamiaceae család Nepetoidae alcaládjába tartoznak. A *Salvia* (zsálya) nemzetségen belül részletesen foglalkoztunk a *Salvia officinalis* L. (orvosi zsálya, kerti zsálya) és három termesztett díszváltozata, a cv. *purpurascens*, cv. *tricolor* és a cv. *Kew Gold*, valamint a *Salvia judaica* Boiss. (júdeai zsálya), *Salvia africana-caerulea* L. (afrikai zsálya), és a *Salvia mexicana* L. (mexikói zsálya) taxonokkal.

2.1.2. Farmakobotanikai jellemzés

A Lamiaceae családban 180 nemzetség, ezekben 3500 faj ismert, fő elterjedési területük a mediterrán tájakra esik. Évelő lágyszárúak, ritkán egyéves növények, de félcserjék, cserjék és fák is előfordulnak köztük. A *Salvia* nemzetségben több, mint 700 fajt tartanak számon. Az idetartozó fajok évelő félcserjék.

2.1.2.1 *Salvia officinalis* L.

Az orvosi zsálya tipikus mediterrán faj: Dalmáciában, Montenegróban, az Ibériai-félszigeten, a Krímben és Kis-Ázsia hegyvidékein őshonos, igénytelen növény, karsztos hegyvidékeken is megterem (Petri 1991, Bernáth 1993). Melegigényes, szárazságtűrő növény, legtöbb talajtípuson sikerrel termeszthető. Szára idősebb korban elágazó, szürkésbarna, fás. Fiatal hajtásai lilás színnel futtatottak, szürkésfehér szőrőkkel sűrűn borítottak. Levelei (1.b. ábra) hosszúkás-lándzsás, vagy megnyúlt tojás alakúak, az alsók nyelesek, a felsők ülők, szélük csipkés. A levelek színe és főként a fonáka molyhosan szőrős. A virágzat (1.a. ábra) 2 – 3 virágból álló, 5 - 8 álörvben összetett álfüzér. A párta színe ibolyáskék, rózsaszín, vagy fehér, a csésze kétajkú, mirigyesen szőrös. Május végétől július végéig virágzik, majd négy, vörösbarna makkocska termést érlel.

1. ábra. A *Salvia officinalis* kékeslila virágzata (a), és levelei (b) (saját felvételek)

A *Salvia officinalis* díszváltozatok habitusa megegyezik a *S. officinalis*-nál leírtakkal, virágzatuk szintén rózsaszín, vagy lila, de a '*purpurascens*' és '*tricolor*' változatok szára is lila színű. A nemesítés célja a dekoratív levél kialakítása volt: a '*purpurascens*' változat levelei egyenletesen lilák, vagy zöldek; a '*tricolor*' változaté lila, fehér és zöld foltozottságot mutatnak, a '*Kew Gold*' változaté sárgán és zölden foltozottak (2. ábra) .

2. ábra: A *Salvia officinalis* 3 termesztett díszváltozata: a: cv. *purpurascens*, b: cv. *tricolor*, c: cv. *Kew Gold* (saját felvételek)

2.1.2.2. *Salvia judaica* Boiss.

A júdeai zsálya a Földközi-tenger keleti partvidékén, Izraelben, Batha és Phrygana környékén őshonos. Lágyszárú, évelő növény (3.a ábra). Tőlevelei tojásdadok, nyélre futók, fogazott szélűek, ezüstös mirigyszőrökkel borítottak. A szárlevelek kisebbek, a felsők szárölelőek. Áprilistól júniusig virágzik. Virágzata álfürt, 3 – 6 lilás rózsaszín virágból álló álörvökből tevődik össze (3.b ábra). (http://flora.huji.ac.il)

3. ábra A *Salvia judaica* habitusa (a) és álörvös virágzata (b).
(www.kerktuinnpbwassenaar.nl, http://flora.huji.ac.il)

2.1.2.3. *Salvia africana-caerulea* L.

Az afrikai zsálya Dél-Afrika homokos lejtőin és síkságain őshonos. Lágyszárú, szára elágazó, szürkésen molyhos. Egyszerű tojásdad alakú levelei színükön zöldes színűek, fonákukon szürkés szőrökkel fedettek, mirigyszőrökkel pöttyözöttek, átellenesek (4.a ábra). Tél közepétől nyár közepéig virágzik. Virágzata tömött álörvös, a párta két ajkú, az ajkak egyenlő hosszúak, a felső kékeslila, vagy rózsaszín, az alsó általában fehér (4.b ábra). (Jackson 1990, Roberts 1990, Van Rooyen 1999, Goldblatt 2000)

4. ábra. A *Salvia africana-caerulea* levelei (a) és virágzata (b)
(www.plantzafrica.com)

2.1.2.4. *Salvia mexicana* L.

A mexikói zsálya Közép-Mexikóban őshonos, 800 – 3000 m-ig nő, délen trópusi, északabbra szubtrópusi területen, gyakran erdők szélén. 1 – 3 m magas növény, levele középzöld mirigyes, fonákán szürkés szőrökkel fedett megnyúlt ovális, vagy szív alakú. A virágzat ritkás álörvökben áll, 15 – 25 cm hosszú (5. ábra). A lepel színe sötétlilától a liláskékig változik, a két ajak egyforma hosszú, az alsó lehajlik, a csésze vöröseslila. Késő nyártól tél közepéig virágzik (Clebsch 2003).

5. ábra. A *Salvia mexicana* virágzata (www.anniesannuals.com)

2.1.3. *Salvia* taxonok drogjai

A *Salvia officinalis* drogjai: a Salviae officinalis folium és a Salviae tinctura hivatalos a VIII. Magyar és a 6. Európai Gyógyszerkönyvben. Az ISO szabványokban orvosi zsálya szárított levele (ISO 11165:1995 Dried sage (Salvia officinalis L.), és illóolaja (ISO 9909:1997 Oil of Dalmatian sage (*Salvia officinalis L.*) hivatalos (www.iso.org). Szabó (2004, 2005) a Salviae radix, Salviae flos és Salviae semen drogokat is említi.

A VIII. Magyar, és a 6. Európai Gyógyszerkönyvben hivatalos zsálya fajok: a *Salvia sclarea* L. (Salviae sclareae aetheroleum), és a *Salvia triloba* L. (Salviae trilobae folium). ISO szabvánnyal a spanyol zsálya illóolaja (ISO 3526:2005 Oil of sage, Spanish (Salvia lavandulifolia Vahl) rendelkezik. Szabó (2004) a Salvia sclareae herba, valamint a *Salvia pratensis* L. drogja, a Salviae pratensis herba (folium) (syn. Horminii pratensis herba, folium) drogokat említi.

2.1.4. *Salvia* taxonokra jellemző hatóanyag csoportok

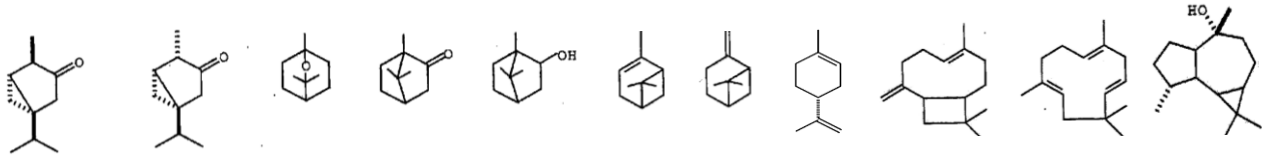
A disszertáció kísérletes részében terpén vegyületek vizsgálatával foglalkoztam, ezért csak a terpenoidokra vonatkozó irodalmi adatokat mutatom be részletesen. A további hatóanyagcsoportokat felsorolás szerűen ismertetem, a legfontosabb elérhető publikációk megjelölésével.

2.1.4.1. Illóolaj és vizsgálatára alkalmazott módszerek

A Salviae officinalis folium vízgőzdesztillációval kinyerhető illóolajtartalma 1 – 2,8 %. A Ph.Hg.VIII. szerint egész, szárított levele legalább 15 ml/kg, aprított levele legalább 10 ml/kg illóolajat tartalmaz. Fő komponensei monoterpének: α-, β-tujon, kámfor, eukaliptol (=1,8-cineol), borneol, és szeszkviterpének: α-humulén és β-kariofillén (6. ábra) (Schönfelder 2001, Hänsel 1994, Máthé és mtsai 2007). Az illóolaj összetételt több országban vizsgálták, a fő komponensek mennyisége alapján öt zsálya kemotípust különböztethetünk meg (Tucker és mtsai 1990, Mockuté és mtsai 1990):

1. kámfor > α-tujon > 1,8-cineol > ß-tujon
2. kámfor > α-tujon > ß-tujon > 1,8-cineol
3. ß-tujon > kámfor > 1,8-cineol > α-tujon
4. 1,8-cineol > kámfor > α-tujon > ß-tujon
5. α-tujon >kámfor > ß-tujon > 1,8-cineol

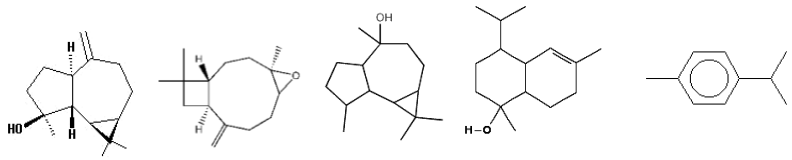
Más szerzők a szeszkviterpén-alkohol viridiflorolt is az öt fő komponens között említik (Tóth 2005, Santos-Gomes és Fernandes-Fereira 2001). A 9909:1997 ISO szabvány szerint az illóolaj összetétel: α-tujon: 18.0-43.0%, ß-tujon: 3.0-8.5%, kámfor: 4.5-24.5%, 1,8-cineol: 5.5-13.0%, α-humulén: 0-12%, α-pinén: 1.0-6.5%, kamfén: 1.5-7.0%, limonén: 0.5-3.0%, linalool és észterei: <1% valamint bornil-acetát <2.5% (www.iso.org). A díszváltozatok (*S. officinalis* cv. *purpurascens, tricolor* és *Kew Gold*) főbb illóolaj komponensei azonosak a bemutatottakkal.



α-tujon β-tujon eukaliptol kámfor borneol α-pinén β-pinén limonén α-humulén β-kariofillén viridiflorol

6. ábra. A *Salvia officinalis* fő illóolaj komponensei (Tóth 2005)

Kamatou és mtsai. (2006, 2007) a *Salvia africana-caerulea* illóolajában főként oxigéntartalmú szeszkviterpéneket (58,7 %) azonosítottak, fő komponens a spatulenol volt (29,1%), további jelentős komponensek a kariofillén-oxid (4,6%), ledol (6,5%), τ-kadinol (3%). A monoterpének közül fontosabb komponensek az α-pinén (4,1%), a β-pinén (1,3%), a p-cimol (1,5%), és a limonén (1,5%) voltak (7. ábra).



spatulenol kariofillén-oxid ledol τ-kadinol p-cimol

7. ábra. A *Salvia africana-caerulea* fő illóolaj komponensei (Kamatou 2007)

Az illóolajok analízisére többnyire gázkromatográfiás és tömegspektrometriás módszert alkalmaznak. A 8. Magyar Gyógyszerkönyv előiratában szereplő körülmények: 30-60 m x 0,25-0,53mm kapilláris kolonna, Macrogol 20.000 (polietilénglikol) állófázis, 70 – 270 ˚C lineárisan programozott kolonna hőmérséklet; a százalékos értékelés lángionizációs detektálással (FID), területnormalizáció alapján történik. Mockuté és mtsai (1990) a tömegspektrometriás méréseit CP-Sil 8CB, 5% fenil csoportot tartalmazó dimetil-polisziloxán (50m x 0,32 mm) kapilláris kolonnán 60 – 250 ˚C szakaszosan programozott kolonnahőmérsékleten, a komponensek azonosítását irodalmi adatok és számítógépes spektrumkönyvtár adatai alapján végezték.

2.1.4.2. Di- és triterpének

A *Salvia officinalis* levele karnoszolsav diterpént tartalmaz, ami állás hatására keserűízű karnoszollá (pikroszalvin, keserű érték =14000) alakul át (Tóth 2005, List – Hörhammer 1976, Hänsel 1994). Kamatou és mtsai (2010) 10 – 20 % karnoszolsavat írtak le a *Salvia africana-caerulea* metanolos kloroformos kivonatából, de karnoszolt nem mutattak ki. Tada és mtsai (1997) a *Salvia officinalis* etilacetátos kivonatából egy kinon-metid típusú vegyületet (sagekinonmetid) azonosítottak, ami a karnoszolsav autooxidációjakor keletkező közti termék. Esquivel és mtsai (1999) egy új cis-langvidulán típusú diterpenoidot azonosítottak a *Salvia mexicana* herbájából, amit salvimexikanolidnak neveztek.

A *Salvia officinalis* tartalmaz lupán, oleán és urzán típusú triterpén-származékokat: urzolsavat, oleanolsavat, kratégolsavat, pomolsavat, α-amirint, β-amirint és betulint (Tóth 2005, Hänsel 1994). Miura és mtsai (2001) három további apián-vázas triterpenoidot azonosítottak.

2.1.4.3. Egyéb hatóanyag csoportok

A *Salvia officinalis*, a *Salvia africana-caerulea* és a *Salvia mexicana* herbájában fenoloidok közül flavonoidokat (Esquivel és munkatársai 1999, Lu és Foo 2000, 2002), depszid típusú cserzőanyagot (Petersen és Simmonds 2003, Hohmann és mtsai 2003, Lu és Foo 1999, 2000, 2001, 2002) és fenolkarbonsav-származékokat (Kamatou és mtsai 2010); a heteropoliszaharidok közül arabinogalaktánokat és glukomannánokat (Capek 2008, 2009) írtak le.

2.1.5. *Salvia* taxonok fitoterápiás jellemzése

Antidiabetikus hatás:

Eidi és mtsai. (2005, 2009) a *Salvia officinalis* etanolos kivonatának vércukorszint csökkentő hatását vizsgálta, sztreptozocin indukált diabéteszes patkányokban csökkentette a vércukorszintet, az egészséges patkányok szérum értékei nem változtak. Az illóolaj a vércukorszintre hatástalan volt, ezért feltételezték, hogy a hatásért a felelős komponensek flavonoidok, karbonsavak, rozmaringsav és karnoszolsav.

Gasztroprotektív hatás:

Mayer és mtsai. (2009) *Salvia officinalis* etanolos-vizes kivonatának akut és krónikus gyomor léziókra gyakorolt hatását vizsgálta in vivo és in vitro patkánygyomron. A léziókat alkohol adásával indukálták, ami növelte a szabadgyökök termelődését a gyomorban, ez a folyamat fokozott sósavtermeléshez vezetett. A zsályakivonat egyrészt gyökfogó aktivitásának köszönhetően csökkentette a szabadgyökök mennyiségét, másrészt a sósav termeléséért felelős H^+,K^+-ATPáz aktivitását gátolta. A hatásért felelős vegyület a diterpén karnoszol.

Karcinogenezist befolyásoló hatás:

Lima és mtsai. (2007) HepG2 sejteken tert-butil-hidroperoxid indukált toxicitásban vizsgálta a *Salvia officinalis* fenoloid-tartalmú kivonatait. A kivonatokkal együtt inkubálva kivédhető volt az oxidatív károsodás, megelőzhető volt a sejthalál, csökkenthető a DNS károsodás. Kamatou és mtsai (2006, 2007, 2008, 2010) több Afrikában őshonos zsályafaj citotoxikus hatását foglalta össze, és tanulmányozta in vitro vizsgálatokban. A *Salvia africana-caerulea* kivonata hatékonynak bizonyult emlő adenokarcinóma MCF-7 és glioblastoma SF-268 sejtvonalon, in vitro kísérletekben.

Központi idegrendszerre gyakorolt hatás:

Kettős vak, randomizált, placebo-kontrollal végzett vizsgálatban az orvosi zsálya kivonata *enyhe és középsúlyos Alzheimer-kórban* szignifikánsan javította a kognitív funkciókat (Szendrei és Csupor 2009).

Fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatás:

Kamatou és mtsai. (2010), és Baricevic és mtsai. (2001) leírják a *S. offiicinalis* kloroformos kivonatának *gyulladáscsökkentő hatását* krotonolaj indukált egérfül-ödémában.

Antimikróbás hatás:

Antibakteriális és antifungális hatás: Bouaziz és mtsai. (2009) *Salvia officinalis* vízgőzdesztillált illóolajának antibakteriális és antifungális hatását vizsgálták. 24 órás párologtatás során a vizsgált mikroorganizmusokon jelentős szaporodást gátló és ölő hatást tapasztaltak. Kamatou és mtsai (2006, 2007, 2008, 2010) több Afrikában őshonos zsályafaj antimikrobás hatását foglalta össze, és tanulmányozta in vitro vizsgálatokban. A *Salvia africana-caerulea* metanolos kivonata gátolta a Gram-pozitív baktériumok szapordását, míg a gram negatív baktériumok rezisztensek voltak a kivonatra. Az illóolaj hatékonyabbnak bizonyult a metanolos kivonatnál.

Antivirális hatás: Schnitzler és mtsai. (2008) *Salvia officinalis* vizes és vizes-alkoholos kivonatok HSV vírusok in vitro plakképzésére gyakorolt hatását vizsgálták. A hatásért főként a fenolos komponensek voltak felelősek, melyek blokkolták a befogadó sejtek felületén a vírus megkötődéséhez szükséges ligandokat.

2.1.6. *Salvia* taxonok készítményei és terápiás alkalmazása

Az orvosi zsálya összetevője számos *többkomponensű terméknek és táplálékkiegészítőnek*: teáknak, tinktúráknak, folyékony kivonatoknak, reumatapaszoknak és kozmetikumoknak (www.cfsan.fda.gov. US Food and Drug Administration). *Belsőleges* per os zsálya tartalmú készítményekre jó példa az étrend kiegészítő Salvia kapszula, amely vércukorszint csökkentő, vérnyomáscsökkentő, véralvadásgátló, roboráló hatású. *Külsőlegesen alkalmazható* a Clear skin hidratáló folyadék, és az apotheker zsálya gél, melyek zsálya kivonat-tartalmuknak köszönhető antibakteriális, adsztringens és faggyútermelést csökkentő hatásukkal gátolják az acneképződést. *Szájápolási készítmények* (pl. Dr. Theiss Lacalut herbal formula fogkrém) aktív összetevőjeként, antimikróbás és tannin tartalmának köszönhető adsztringens hatása gátolja a fogkőképződést, megszünteti az ínygyulladást, és jelentős szerepe van a fogszuvasodás megelőzésében. A zsályalevél teáját adsztringensként, dezinficiensként, diszpepszia és túlzott verejtékezés esetén alkalmazzák.

A zsályalevél alkoholos kivonata, és illóolaja neurotoxikus tujon tartalma miatt belsőleg fokozott körültekintéssel, terhességben egyáltalán nem alkalmazható. A készítmények tujon tartalmát szabályozzák, nem lehet több, mint 0,5 mg/kg. Belsőleges alkalmazáskor epileptiform görcsök, mérgezés esetén hányás, zavartság, szédülés, hasi görcsök jelentkezhetnek. Vizes kivonatoknál mellékhatásokat nem tapasztaltak Külsőleg alkoholos kivonata is alkalmazható (Szendrei és Csupor 2009).

Népgyógyászatban az orvosi zsályalevelet vérzéscsillapítóként, vizelethajtóként, vérnyomás-csökkentőként, étvágyjavítóként, epeelválasztás-fokozóként, simaizom-görcsoldóként, menopauzában hőhullámok kezelésére használják. Gyakran használják fűszerként is, szerepel az Európai Tanács természetes ételízesítőket tartalmazó listáján (Willershausen és mtsai. 1991). Az afrikai zsályát *fűszernövényként* és az orvosi zsálya helyettesítésére használják, emésztési problémák ellen citromlével keverve, hasmenés ellen, teáját köhögésre, megfázásra torokfáásra. Külsőleg a levelét kiütésekre, teáját fertőtlenítő lemosásra alkalmazzák (Kamatou és mtsai, 2010).

2.2. *Lavandula* taxonok bemutatása

2.2.1. Rendszertani besorolás

A levendula taxonok a *Salvia* taxonokhoz hasonlóan a Lamiaceae család Nepetoidae alcsaládjába tartoznak. A *Lavandula officinalis* L.. *Lavandula vera* DC., *Lavandula angustifolia* Mill. szinonim nevek, a faj a magyar nyelvű irodalomban francia levendula, illatos/szagos levendula, keskenylevelű levendula, orvosi levendula, valódi levendula néven ismert (Bernáth 1993), angol nyelvű irodalmakban, és ezek magyarra fordított változataiban az angol levendulaként is szerepel (Vermeulen, 2005). Irodalmi források a *Lavandula spica* All. és a *L. vulgaris* Lam. szinonim neveket is említik, de ezek valójában a *Lavandula latifolia* Medic. (syn. *Lavandula fragrans* Salisb. széleslevelű, vagy spanyol levendula) fajjal egyeznek meg (Boros 1968, Hänsel 1994). *Lavandula x intermedia* Emeric. a *L. angustifolia* és a *L. latifolia* spontán fajhibridje, gyakori magyar neve az angol levendula, angol nyelvű irodalomban francia típusként is említik, ezért helyesebb a hibrid levendula elnevezés (www.iso.org). *Lavandula angustifolia* Mill. ssp *pyrenaica* DC. (pireneusi levendula) alfajt ritkán külön fajként (*Lavandula pyrenaica* DC.) sorolják be. Vizsgáltuk még a *Lavandula stoechas* L., spanyol vagy füzéres levendulát, valamint a *Lavandula dentata* L. fogazott, vagy francia levendulát is.

2.2.2. Farmakobotanikai jellemzés

A levendula fajok első sorban a Földközi- és a Fekete-tenger partvidékén őshonosak. Európában és Angliában a XIV. századtól termesztik. Részletes jellemzésüket monográfia tárgyalja (Boros 1968).

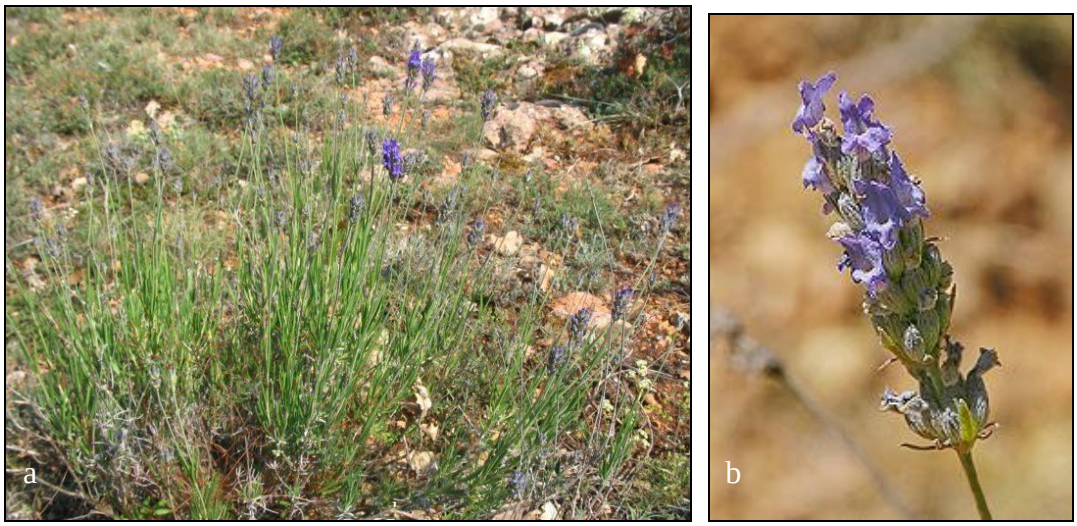
2.2.2.1 *Lavandula vera* DC. (syn. *L. angustifolia* Mill., *L. officinalis*L.)

A valódi, vagy keskenylevelű levendula a Mediterrán területek szárazságtűrő növénye. Köves, száraz, nagy mésztartalmű kopár talajokat kedveli, tengerszint felett 1700 m–ig megtalálható, a fagyokat is jól tűri. Egész Európában ültetik. Szára zömök, a tőlevéltől dúsan elágazó. A levendulabokor természetes körülmények között félgömb alakú (8.a. ábra). Levelei szálasak, vagy keskeny lándzsásak, keresztben átellenesek, szürkészöld

szőrözöttek. Június – júliusban virágzik. Virágzata szaggatott álörvökből álló hengeres álfüzér, virágai zigomorfok, ibolyáskékek (8.b. ábra) (Bernáth 1993).

8. ábra. *Lavandula angustifolia* félgömb alakú bokra (a) és virágzata (b)
(www.plantpol.com.pl, www.etnofarmakologia.hu)

Lavandula angustifolia Mill. ssp. *pyrenaica* DC. a valódi levendula Pireneusokban őshonos alfaja. Habitusa és virágzata a 9. ábrán látható.



9. ábra. A *Lavandula angustifolia* ssp. *pyrenaica* habitusa (a) és virágzata (b)
(www.tribes.eresmas.net)

2.2.2.2. *Lavandula intermedia* Emeric.

A *Lavandula angustifolia x Lavandula latifolia* spontán hibridje Dél-Franciaországban és Spanyolországban őshonos. Fagytűrő képessége rosszabb, mint a valódi levenduláé.

Levelei szálasak, vagy keskeny lándzsásak, keresztben átellenesek, szürkészüld szőrözöttek (10.a. ábra). Főként július utolsó hetében virágzik. Virágzata szorosan elhelyezkedő álörvökből álló hengeres álfüzér (10.b. ábra). Virágai zigomorfok, szürkéskékek. Csírázóképes makkocskát nem érlel (Bernáth 1993).

10. ábra. A *Lavandula intermedia* habitusa (a) és virágzata (b)
(www.riverbendnursery.com, www.ubcbotanicalgarden.org)

2.2.2.3. *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* L.

A *L. stoechas* a legrégebben, az ókortól ismert levendula faj (Boros 1968). A bokor (11.a. ábra) szürkésen szőrözött. Tőlevelei egyenesek, hosszúkás megnyúlt ovális csúccsal, rózsaszínes színűek. Virágai színe a kéktől a liláspirosig változik, de létezik fehér virágú díszváltozat is. A csúcson álló virágok meddők, bóbitaként állnak a murvalevelek felett (11.b. ábra). Kora tavasztól ősz közepéig virágzik (Hänsel 1994, Lis-Balchin 2002, Vermeulen 2005).

11. ábra. A *Lavandula stoechas* habitusa (a) és virágzata (b)
(www.muenster.de, www.prideofplaceplants.com)

2.2.2.4. *Lavandula dentata* L.

A *Lavandula dentata* az Atlanti-óceáni szigetekről, az Ibériai-félszigeten és Észak-Afrika nyugati mediterrán vidékein, valamint az Arab félszigeten őshonos. Keskeny levelei szürkészöldek, tompán fogazottak, csipkézettek, szára finoman molyhos. Halványbíbor virágai álfüzért alkotnak, hosszú kocsányon a lomb fölé emelkednek (12.a,b. ábra). A cserje nem télálló, a keményebb teleket csak a partok mentén éli túl (Vermeulen 2005, Parker – Malone 2006).

12. ábra. A *Lavandula dentata* habitusa (a) csipkézett levelei és virágzata (b)
(www.henriettesherbal.com)

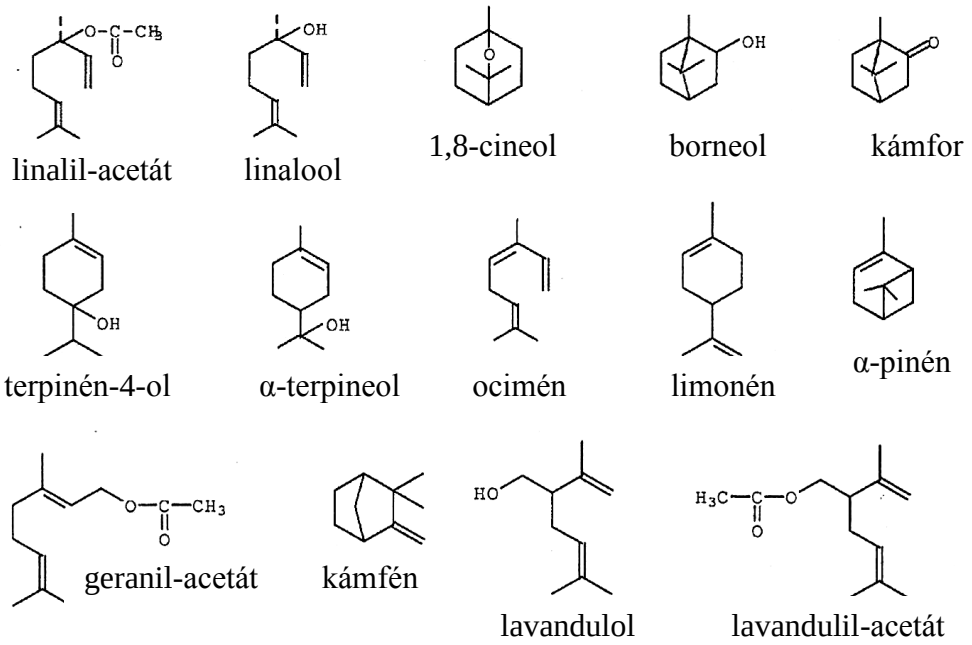
2.2.3. *Lavandula* taxonok drogjai

A *Lavandula angustifolia* Mill. virágja szolgáltatja a Lavandulae flos drogot, valamint illóolaja a Lavandulae aetheroleum hivatalosak a VIII. Magyar és a 6. Európai Gyógyszerkönyvben. Ritkán alkalmazzák virágzó hajtását is, amely nem hivatalos drog. A hibrid levendula a gyógyszerkönyvekben nem hivatalos (Bernáth 1993., Szabó 2004, 2005). ISO szabvánnyal a keskenylevelű levendula (ISO 3515:2002 Oil of lavender (*Lavandula angustifolia Mill.*), a széleslevelű, vagy spanyol levendula (ISO 4719:1999 Oil of spike lavender (*Lavandula latifolia* Medik.), Spanish type), valamint két féle hibrid levendula (ISO 8902:2009 Oil of lavandin Grosso (*Lavandula angustifolia* Mill. x *Lavandula latifolia* Medik.), French type, ISO 3054:2001 Oil of lavandin Abrial (*Lavandula angustifolia* Mill. x *Lavandula latifolia* Medik.), French type) illóolaja rendelkezik (www.iso.org).

2.2.4. *Lavandula* taxonokra jellemző hatóanyag csoporok

2.2.4.1. Illóolaj, és vizsgálatára alkalmazott extrakciós, analítikai módszerek

A *Lavandula angustifolia* virágzata 1-3% illóolajat, ebben 35-60% linalil-acetátban kifejezett észtert tartalmaz. Fő komponenseit a 13. ábra mutatja (Tóth 2005).



13. ábra *Lavandula officinalis* fő illóolaj komponensei (Tóth 2005)

Az érvényben lévő Európai Gyógyszerkönyv, és a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv szerint a szárított virágzat legalább 13 ml/ kg illóolajat tartalmaz. A vízgőzdesztillációval előállított illóolajban - a 3.1.4.1. fejezetben ismertetett paraméterek mellett végzett mérések alapján - a fontosabb illó komponensek százalékos arányát az alábbiak szerint szabályozza:

- limonén: kevesebb, mint 1,0%
- cineol: kevesebb, mint 2,5%
- 3-oktanon: 0,1 – 2,5%
- kámfor: kevesebb, mint 1,2%
- linalool: 20,0 – 45,0%
- linalil-acetát: 25,0 – 46,0%
- terpinén-4-ol: 0,1 – 6,0%
- lavandulil-acetát: több, mint 0,2%
- lavandulol: több, mint 0,1%
- α-terpineol: kevesebb, mint 2,0%

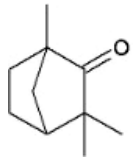
A linalool és a linalil-acetát királis tisztaságának ellenőrzéséhez a Ph.Hg. VIII. és a Ph.Eur.5. megadja az S és R enantiomerek arányát (25 – 30 m x 0,25 mm kapilláris

kolonna, 30 % β-ciklodextrin tartalmú állófázis, 50 – 170 ˚C lineárisan programozott kolonnahőmérséklet): a (S)-linalool legfeljebb 12%, a (S)-linalil-acetát legfeljebb 1%-a lehet az össz-linalool, illetve linalil-acetát – tartalomnak. Idegen fajok kizárására is gázkromatográfiás vizsgálatot ír elő, a kámfor csúcs alatti területe az összes csúcs alatti területnek legfeljebb 1%-a lehet. Larkov (2008) is az R-linalool-szintáz jelenlétét mutatta ki *L. angustifolia* mintákon.

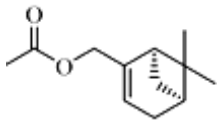
Kim és Lee (2002) *Lavandula angustifolia* Hidcote változatának illó komponenseit vizsgálta különböző kivonási módszerekkel. Az SPME kivonást öt féle (100-µm PDMS, 30-µm PDMS, 7-µm PDMS, 85-µm PA és 65 µm CW–DVB) abszorbenssel bevont szállal végeztek. Megállapították, hogy a kivonatokban a komponensek aránya függ az abszorbenstől, a fő komponensként azonosított linalool aránya 3,3 – 26,7 %, a linalil-acetát aránya 30,8 – 64,0 % között változott. Az észterek legmagasabb arányban a 30-µm PDMS szállal, az alkoholok legnagyobb arányban a 85-mm PA szállal dúsított kivonatokban voltak jelen. Az azonosított komponensek száma is eltért, a minor komponensek kimutatására a 100 µm PDMS abszorbens volt a legalkalmasabb, amivel 25 komponenst mutattak ki, a fő komponensek dúsítására a 7µm PDMS adszorbenst találták alkalmasnak, az ezzel előállított kivonatokban 9 komponenst azonosítottak. An és mtsai (2001) *Lavandula angustifolia* virágok SPME kivonatának (100 µm PDMS) és tazmániai kereskedelmi illóolajának összetételét hasonlították össze. Érdekes módon az SPME kivonatban alacsonyabb linalool és magasabb linalil-acetát tartalmat kaptak, de nem volt szignifikáns különbség a kivonatok között.

A *Lavandula intermedia* (*L. angustifolia* x *L. latifolia* hibrid) illóolajtartalma magasabb, (0,9-5%), de kevesebb linalil-acetátban kifejezett észtert tartalmaz, mint a *L. angustifolia*. Fő komponensek a linalil-acetát (7 – 30%), linalool (25 – 40%), 1,8-cineol (3 – 8%), kámfor (5 – 10%), kariofillén, terpinen-4-ol, α-terpineol (együtt 2 – 4%), lavandulil-acetát (1 – 3%), lavandulol, cis- és transz-β-ocimén (együtt 1 – 2%), borneol (1 – 1,5%), limonén, α-, β-pinén (0,5 – 1%) (Hänsel 1994, Bernáth 1993).

A *Lavandula stoechas* olajának fő komponense a fenkon (14. ábra) és a kámfor, észter tartalma 39%. A *Lavandula dentata* illóolajának fő komponense a cineol (50%), ezen kívül 10% β-pinént és 6,8% észtert tartalmaz (Boros 1968, List–Hörhammer 1994).



fenkon



mirtenil-acetát

14. ábra A *Lavandula stoechas* fő illóolaj komponensei (Boros 1968)

Skoula és mtsai (1996) 4 Görögországban és Krétán növő *L. stoechas* levelének és virágának illóolaját vizsgálta virágzó és nem virágzó állapotban GC-MS és GC-FID módszerrel (50 m x0,2 mm HP-FFAP ftálsav tartalmú poláris polietilén-glikol kapilláris kolonna, 60 – 230˚C, 3˚C/perc, komponensek azonosítása: Wiley Library spektrumkönyvtár). A fő illó komponensek a β-pinén, az 1,8-cineol, a fenkon, a kámfor, és a mirtenil-acetát voltak, ezen belül a minták két, fenkon (30,0 – 53,2%) -kámfor (18,2 – 28,3%) és 1,8-cineol (0,3 – 52,7%) –fenkon (23,6 – 68,2%) kemotípusba voltak sorolhatók. A nem virágzáskor gyűjtött levél illóolaj tartalma, és az olaj fenkon, mirtenil-acetát és β-pinén tartalma magasabb volt, míg a virágzáskor gyűjtött levél főleg 1,8-cineolt és kámfort tartalmazott. Giray és mtsai (2008) a *L. stoechas* illóolaját vizsgálták (Zebron ZB-5 kapilláris kolonna: 5% fenil 95% dimetilsziloxán, 0,25mm×60m; kolonnahőmérséklet: 50 - 240˚C, 3˚C/perc): főkomponensként fenkont és kámfort azonosítottak.

2.2.4.2. Triterpének

Fitoszterolok: Hänsel és mtsai (1994) a *Lavandula angustifolia* virágzatából koleszterolt, kampeszterolt, sztigmaszterolt és β-szitoszterolt, List és Hörhammer (1976) ezeken kívül a *Lavadula stoechas* herbájában lavandula-szterin A, B, C-t ír le.

Pentaciklusos triterpének: a *L. angustifolia* és a *L. dentata* urzolsavat, oleanolsavat, és betulint tartalmaz. A *L. stoechas* herbájában ezek mellett α-amirint és acetátját, valamint lupeolt írtak le (Tóth 2005, List – Hörhammer 1976, Hänsel 1994).

A *Lavandula* fajok herbájában továbbá leírtak flavonoidokat, fahéjsav származékokat és aromás karbonsavakat (Tóth 2005, Hänsel 1994, Upson és mtsai 2000).

2.2.5. *Lavandula* taxonok fitoterápiás jellemzése

Központi idegrendszerre gyakorolt hatás

Anxiolítikus, nyugtató, alvást elősegítő hatás: Preklinikai vizsgálatokban (Aoshima és Hamamoto 1999) a növény nyugtató, altató hatásának vizsgálata során kiderült, hogy az illó komponensek, első sorban a linalool, a benzodiazepinekkel hasonló módon fejtik ki hatásukat, a receptoraffinitás serkentésével fokozzák a γ-aminovajsav hatását. A linalool, vagy linalil-acetát az illóolajhoz hasonló mértékű hatást váltott ki. Shaw és mtsai (2007) és Bradley és mtsai (2004) a belélegzett levendula illóolaj anxiolítikus hatását hasonlították össze klórdiazepoxid hatásával. A motoros gátlás mértéke hasonló volt a klórdiazepoxid hatásához, bár nagy dózisoknál központi idegrendszert gátló hatást is tapasztaltak.

Humán klinikai vizsgálatokban a levendula aromaterápiásan alkalmazott illóolaja javítja a hangulatot, nyugtató hatású, segíti az elalvást (Graham ás mtsai 2003, Lehrner és mtsai 2005). Központi idegrendszeri hatását elektro-enkefalográfiás vizsgálatát igazolták (Manley 1993). A levendulaolaj emeli a relaxációhoz kapcsolódó α–hullám aktivitást, a linalool csökkenti az ébredésért felelős β-hullám aktivitást (Balacs 1992, Sugawara és mtsai. 1998). A nyugtató hatás ellenére a levendulaolaj nem rontotta a motoros teljesítményt, a kognitív funkciókat javította is. Aromaterápiásan alkalmazva néhány esetben központi depresszióról számoltak be (Szendrei és Csupor 2009).

Woelk és Schläfke (2010) vízgőzdesztillált levendulaolajat tartalmazó perorális kapszula (Silexan) és lorazepam anxiolítikus hatását hasonlította össze kettős vak, randomizált, több-centrumú vizsgálatban. Megállapították, hogy a Silexán csoport és a lorazepam csoport testi és pszichés szorongásos tünetei azonos mértékben javultak, bebizonyosodott a levendulaolaj és a benzodiazepinek azonos hatékonysága generalizált szorongásban. A Silexan emellett az alvásminőséget is javította, viszont a lorazepammal ellentétben nem okozott nappali fáradtságot és függőséget, a Silexánt szedő csoportban főként gasztrointesztinális mellékhatásokat tapasztaltak.

Antidepresszáns hatás: Akhndzadeh és mtsai. (2003) a *Lavandula angustifolia* tinktúra antidepresszáns hatását tanulmányozták imipraminnal összehasonlítva, korábban végezett kisebb esetszámú vizsgálatok eredményeinek megerősítésére (Diego és mtsai. 1998; Vernet- Maury és mtsai. 1999). A kettős vak, randomizált placebokontrolos

kísérletben major depressziós betegeket vizsgáltak. A levendula tinktúra önállóan adva az imipraminnál kevésbé bizonyult hatásosnak, míg az imipramin mellett adott levendula tinktúra fokozta az antidepresszáns hatást. Az imipramin csoportra jellemző antikolinerg mellékhatások (szájszárazság és vizeletretenció) a levendula csoportban ritkábban fordultak elő, viszont fejfájást gyakrabban tapasztaltak. A kapott eredmények alapján a levendula tinktúrát alkalmasnak találták az enyhe és középsúlyos depresszió adjuváns terápiájára.

Neuroprotektív hatás: Büyükokuroglu és mtsai. (2003) a *Lavandula angustifolia* vizes kivonatának neuroprotektív hatását vizsgálták cerebelláris sejtkultúrákon, glutamát-indukált neurotoxicitásban. A levendula kivonat blokkolta a neurotoxicitást, de nagyobb dózisok növelték az elhalt sejtek arányát. A neuroprotektív hatásért az a levendula antioxidáns hatású fenoloidjai lehetnek felelősek (Hohmann és mtsai. 1999).

Fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő hatás

Hajhashemi és mtsai (2003) a *Lavanduls angustifolia* fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatását vizsgálta patkányoknál. A levendula herbájából készített etanolos vizes kivonatot, vízgőzdesztillált illóolajat és tisztított polifenolos frakciót vizsgáltak. Az eredményeik szerint az illóolaj és a tisztított polifenolos frakció gátolta a gyulladás minden fázisát.

Simaizomgörcsoldó hatás

A *L. officinalis* és a *L. stoechas* simaizomgörcsoldó hatását igazolták állatkísérletekben, ennek hátterében különböző mechanizmusok állhatnak: Szendrei és Csupor (2009) a simaizom cAMP-mediált relaxációját emeli ki; Lis-Balchin és Hart (1997, 1999) és Gilani és mtsai. (2000) a simaizom membrán kalcium csatornáinak gátlására vezetik vissza: az alacsonyabb sejten belüli kálciumszint csökkenti az acetilkolin indukált izomösszehúzódásokat.

Antibakteriális hatás

A *L. officinalis* illóolaja a *B. subtilis, a P. aeruginosa* és a *P. vulgaris* ellen bizonyult hatásosnak (Prabuseenivasan és mtsai 2006). A *L. dentata* illóolaja gátoljaja a *Salmonella sp., Neisseria meningitidis, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae,*

Heamophilus influezae, Pantoea sp., Escherichia coli, Proteus mirabilis, Staphylococcus aureus, Streptococcus sp., Streptococcus pneumoniae, Listeria monocytogenes szaporodását, de antivirális hatást nem tapasztaltak (Imelouane és mtsai 2009).

2.2.6. *Lavandula* taxonok terápiás és tradícionális felhasználása

A levendula kivonat, vagy illóolaj szinte megszámlálhatatlan nyugtató, gyulladáscsökkentő hatású külsőleges és belsőleges készítmény alkotója. A Silexan perorális kapszula kiemelkedő jelentőségű, anxiolítikus hatását a 3.2.5.1. fejezetben ismertett klinikai vizsgálat bizonyítja. Németországban gyógyszerként forgalmazzák, hazánkan egyelőre nincs forgalomban.

A levendulavirágot a *tradícionális gyógyászatban* epetermelést fokozó, görcsoldó, emésztést javító, vizelethajtó, de főleg elalvást elősegítő hatása miatt alkalmazzák. Ismert a levendulapárna, amibe a levendula hajtását töltötték az elalvás elősegítésére. Virágát ruhák közé tették, mert a molyokat távol tartja. Az illóolajat aromaterápiás szerként is használják.

A levendula nagy jelentőségű az *illatszeriparban* is, fontos illatalapanyag, erre a célra a magasabb illóolaj tartalmú hibrid levendulát használják. Bőrnyugtató, antibakteriális hatása miatt kozmetikumokba keverik (Szendrei és Csupor 2009).

2.3. *Morus alba* L. bemutatása

2.3.1. Rendszertani besorolás

A *Morus alba* L. (syn. *M. tartarica* L., magyar név: fehér eperfa, fehér szederfa, selyem eperfa) a kétszikűek osztályába (Dicotyledonopsida), a Dilleniidae alosztályba, az Urticales (csalánvirágúak) rendbe, a Moraceae (eperfafélék) családba, Moroideae alcsaládba, a Morus nemzetségbe tartoznak. A pontos fajmeghatározást nehezíti, hogy az ültetett eperfák a *M. alba* és a *M. nigra* hibrid változatai, a fehér eperfa termése is gyakran sötétvörös, vagy fekete, ezért az egyes egyedeket morfológiai jegyek alapján nem lehet egyértelműen besorolni (Szendrei és mtsai 2006).

2.3.2. Farmakobotanikai jellemzés

Moraceae – eperfafélék családja a világon mintegy 1500 fajjal képviselteti magát, hazánkban 53 fajuk ismeretes. Tejnedves fás növények, tagolatlan tejcsövekkel. Morus – eperfa nemzetség 10-12 faját tartják számon. Lombhullató, egylaki cserjék és fák tartoznak ide (Dános 2002).

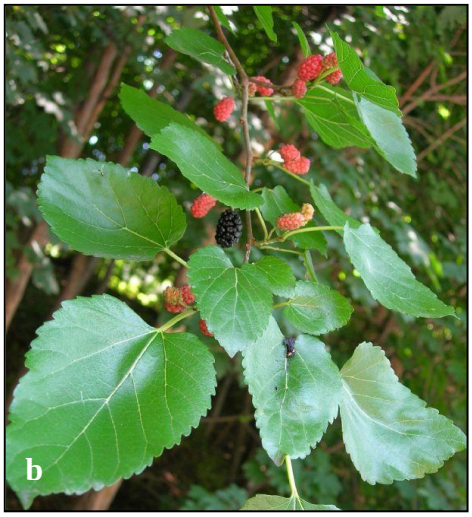
A fehér eperfa dél-kínai, észak-indiai származású. A *Morus alba* a középkorban elterjedő selyemtermesztéssel jelent meg kultúránkban, mivel levele a selyemhernyó kizárólagos tápláléka. Magyarországon a selyemtenyésztés meghonosításával párhuzamosan a 17. században a fehér eperfákat tömegesen ültették (Jeszenszky, 1972, Rácz és mtsai 1984). 1969-ben Minisztériumi Rendelet intézkedett a gazdaságtalan és korszerűtlen selyemtenyésztés megszűntetéséről, azóta díszfaként ültetik hibrid változatait (Simon és Csapody, 1986).

A fehér eperfa (15.a ábra) kb. 15 m magas, koronája kerek, terpedt állású. Élőhelyével szemben különösebb igényeket nem támaszt. Fagytűrő, bírja a szárazságot és a hőséget, a sovány földet (Alberts és mtsai, 2005). A levél (15.b ábra) ferde-tojásdad, osztatlan, vagy gyakran karéjos, hasadt, ill. szeldelt, válla gyengén szíves, levágott, részaránytalan, csúcsa hegyes vagy tompa, széle csipkés vagy fűrészes. A levél színén kopasz, sima, néha kissé érdes, fonákán az erek mentén gyéren szőrös, az érzugokban szakállas szőrzetű. (List és Hörhammer, 1976).

A porzós barkavirágzat hengeres-hosszúkás, lefelé csüngő, termős barkája levélhónaljban ülő, rövidebb a porzós virágzatnál. A termés (15.b. ábra) július - augusztusban érik, fehér, rózsaszín, lilás, esetleg egészen fekete színű, alakja hengeres, tojásdad-hengeres vagy megnyúlt-hengeres, megnyúlt kocsánnyal. Íze éretten édes, alig savas. Megtermékenyítés nélkül „magtalan” termések alakulnak ki, a termések málnára illetve szederre hasonlítanak (Jeszenszky, 1972).

Hazánkban gyakran a *M. nigrá*t *M. alba* törzsre oltották, a hibrid fajok megjelenése nehezíti a fajok elkülönítését (Jeszenszky, 1972). A fekete eperfa levélfonáka pelyhes, szinte érdes, a fehér eperfánál csak az erek mentén pelyhes, korántsem érdes sokkal inkább sima felszínű levélfonák jellemző. A levél a színén sötétzöld, nagyobb és vastagabb lemezzel rendelkezik, mint fehér rokona. A fekete eperfa levélválla mélyen szíves, míg a fehér eperfa levélválla gyengén szíves vagy levágott. A fekete eperfa levélnyele rövidebb, mint a *M. alba* esetén. A fekete eperfa epertermése majdnem ülő,

sötétbíbor; előbbi jellegtelen ízű gyümölcséhez képest a fekete eperfa gyümölcse sokkal ízletesebb. (Alberts és mtsai, 2005).



15. ábra. A fehér eperfa habitusa (a), levele és terméságazata (b)
(www.plantsystematics.org)

2.3.3. *Morus alba* drogjai

Az eperfadrogokkal kapcsolatban bizonytalanság forrása, hogy az irodalom gyakran nem tesz különbséget a fehér és fekete eperfa között. A két fajt Európában gyakran együtt telepítik és a levéldrogot vegyesen gyűjtik, ezért pontos megjelölés nélkül nem lehetünk biztosak a drog fajazonosságában (Szendrei, 2006).

Hazánkban csak a fekete eperfa levele (*Mori nigri folium*) szerepel a szabadon forgalmazható drogok között. Az ázsiai irodalomban viszont az eperfalevél és gyökérkéreg alatt legtöbbször a fehér eperfa részeit értik, a Kínai Gyógyszerkönyvben ma is hivatalos drog a levél (Sang-Ye, Mori folium), az ágvég (Sang-Zhi, Mori ramulus), a gyökérkéreg (Sang-Bai-Pi, Mori radicis cortex) és a termés (Sang-Shen, Mori fructus) (Rollinger és mtsai, 2004). Szabó (2004, 2005) a *Morus alba* levelét említi.

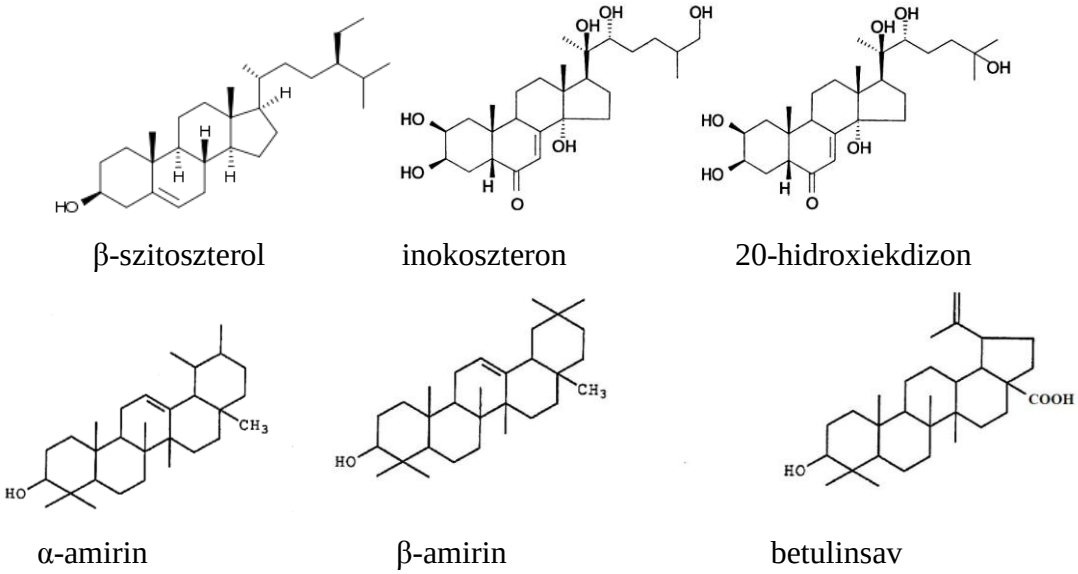
2.3.4. *Morus alba* jellemző hatóanyag csoportjai

2.3.4.1. Triterpének és gázkromatográfiás vizsgálati módszerek

Fitoszterolok: a fehér eperfa leveléből a β-szitoszterolt valamint kapronsavval, és palmitinsavval alkotott észtereit említi Hegnauer (1969).

Ekdiszteroidok: Takemoto és mtsai (1967) a fehér eperfa leveléből polihidroxilált ekdiszteroidokat, többek közt 20-hidroxi-ekdizont és inokoszteront izoláltak.

Pentaciklusos triterpének: a *Morus alba* leveléből és gyökérkérgéből α-, β-amirint, és betulinsavat azonosítottak (Hegnauer 1969) (16. ábra).



16. ábra. A *Morus alba leveléből* izolált triterpén komponensek (Hegnauer 1969, Takemoto és mtsai 1967)

A szterolok és triterpének gázkromatográfiás vizsgálatát gyakran trimetilszililes származékképzés után végezik (Janicsák és mtsai 2003). Johnsson és mtsai (2005) két kolonna (DB35-MS és DB5-MS 25m×0,2 mm) egymás után kapcsolásával (tandem) ért el pontosabb eredményt (65 - 290˚C 90˚C/perc, 290 - 305˚C 0,3˚C/perc. Gutirrez és mtsai (1998) gyors, gázkromatográfiás és tömegspektrometriás módszert dolgoztak ki a szterolok tanulmányozására (DB5-HT 15m x 0,25mm kolonna, GC-FID: 100-350˚C, 15˚C/perc, GC-MS: 120 – 380˚C, 10C˚/perc), mely lehetővé tette a szterolok származékképzés nélküli meghatározását.

2.3.4.2. Egyéb hatóanyag csoportok

A *Morus alba* leveléből és gyökérkérgéből a fenoloidok közül egyszerű flavonoidokat (Karrer 1958, Szendrei 2006), prenilált flavonoidokat (Deshpande és mtsai 1968, Oh és mtsai 2002, Singab és mtsai 2005), aromás karbonsavakat, depszid típusú cserzőanyagokat, kalkonokat, fahéjsav- és stilbén-származékokat, benzofenonokat azonosítottak (Hegnauer 1969). Nitrogén tartalmú vegyületek közül aminosav (ornitin és lizin) – származékokat (Hegnauer 1969, Vágújfalvi 1971), iminocukrokat (polihidroxi piperidin-alkaloidok) (Yagi és mtsai 1976, Asano és mtsai 2001, Kimura 2007) és fajspecifikus glikoproteineket (Hikino és mtsai, 1985). (Kim és mtsai 1999) írtak le.

2.3.5. *Morus alba* fitoterápiás jellemzése

Antidiabetikus hatás

Az eperfalevél vércukorszint csökkentő hatása flavonoidok és rokon szerkezetű anyagok, ekdiszteroidok, iminocukrok (polihidroxi-alkaloidok) és fajspecifikus glikoproteinek jelenlétének köszönhető. A komplex hatást több, párhuzamos hatásmechanizmus eredményezi (Szendrei 2006, Funke és Melzig 2005).

Inzulinszint növelés és glukózmembrántranszport fokozás: Singab és mtsai (2005) és Naowaboot és mtsai (2008) a fehér eperfa levél prenilflavon-tartalmú kivonatainak hatását vizsgálták diabeteses patkányokban. A kivonat nagyobb dózisú alkalmazása csökkentette a vérglükózszintet és növelte az inzulin koncentrációját a vérben

Szöveti inzulinérzékenység fokozás: Lafont és Dinan (2003) ekdiszteroidok vércukorszint csökkentő hatását igazolták, klinikai vizsgálatokban. Eredményeik szerint az ekdiszteroidok fokozzák a glükóz beépülését a glikogénbe, és a szöveti inzulinérzékenység javítása révén növelik a szöveti cukorfelvételt.

Inzulinszerű hatás: A fehér eperfa leveléből leírt glikoproteinek szerkezeti hasonlóságot mutatnak az inzulinnal, inzulinszerű hatásuk bizonyított: hiperglikémiás egerekben csökkentették a vércukorszintet (Hikino és mtsai 1985, Kim és mtsai 1999).

α-Glikozidáz gátlás: Az eperfalevélben több vércukorszint csökkentő iminocukor-származékot találtak (Hunyadi és mtsai, 2006). Az 1-deoxinojirimicin α-glikozidáz gátló hatású vegyület. A vegyület hatásosságát tanulmányozták Kimura és mtsai (2007),

humán klinikai kísérletekben a drogpor perorális alkalmazása csökkentette az étkezés utáni vércukorszintet és az inzulinkiválasztást. A tanulmány szerint a drogpor diabetes mellitus megelőzésére használható étrendkiegészítőként. A 1-deoxinojirimicin szintetikus származékai: a voglibóz, a miglitol és az akarbóz α-glikozidáz gátló gyógyszerekként vannak forgalomban hazánkban is.

Antiatheroscletotikus hatás: A fehér eperfalevél a diabéteszhez társult metabolikus szindróma további tüneteit is javítani tudja, metanolos kivonatának prenilflavonoidokat tartalmazó frakciója, antiperoxidatív hatásának köszönhetően csökkentette a diabéteszes patkányok lipidperoxid szintjét (Singab és mtsai., 2005, Beshbishy és mtsai., 2006).

Teljesítményfokozó hatás

Az ekdiszteroidok anabolikus, fizikai és szellemi teljesítményfokozó hatásmechanizmusa eltér az anabolikus szteroidokétól: úgy növelik az izomszövet tömegét, fokozzák az izomerőt, hogy eközben nem jelentkeznek az anabolikus szteroidok káros mellékhatásai (Hunyadi és mtsai, 2006). Állatkísérletes vizsgálatok bizonyították, az ekdiszteroidok a koleszterolszintézist lassító, metabolizmusát fokozó hatását (Hunyadi és mtsai 2006).

Fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő hatás

Rollinger és mtsai. (2004) kísérletében az eperfa gyökérkérgének etanolos kivonata in vitro kísérletekben gátló hatást mutatott a ciklooxigenáz-1,2 izoenzimekre. De Souza és mtsai (2000) *Morus* fajok gyökérkérgéből fájdalomcsillapító hatású prenilflavonoidot (moruzin) azonosítottak, a hatást feltehetően az opioid rendszeren váltják ki.

Karcinogenezisre gyakorolt hatás

A *Morus alba* metanolos kivonata gátolja a kémiai karcinogenezist: egereken és in vitro kísérletekben a *Morus* kivonat csökkentte a tumoros gócok számát, kialakulási gyakoriságát, és a tumor lappangási idejét is elnyújtotta (Prasad és mtsai 2004, Oh és mtsai 2002).

Antimokróbás hatás

Baktériumellenes hatás: Fukai és mtsai (2005) kísérletében egy *Morus* fajokból izolált 2-arilbenzofurán származék gátolta a meticillin érzékeny és rezisztens *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* valamint a *Bacillus subtilis* szaporodását.

Vírusellenes hatás: A *Morus* nemzetség flavonoidjainak egy csoportja Herpes simplex vírus ellen antivirális hatást mutatott (Du és mtsai 2002).

2.3.6. *Morus alba* készítményei és népgyógyászati alkalmazása

Az eperfalevél több vércukorszint csökkentő mono- és többkomponensű készítmény összetevője. A Zuccarin® (NewNordic) étrendkiegészítő tabletta már Magyarországon is forgalomban van, szárított fehér eperfa levelet és fehér eperfa levél kivonatot tartalmaz. Klinikai kísérletekkel igazoltan segít megelőzni a vércukorszint kiugrásokat. Szedését fogyókúrázóknak, 2. típusú cukorbetegség kiegészítő kezelésére és megelőzésére ajánlják (www.newnordic.hu).

A fehér eperfa drogjait *népgyógyászatban* elsősorban cukorbetegség és magas vérnyomás esetén használják; ezen kívül számos indikációval: pl. gyulladáscsökkentő, összehúzó, köptető, hashajtó, nyugtató, antimikróbás hatása alapján, asztma, meghülés, csökkent fizikai erőnlét, emésztési panaszok, láz, fejfájás, álmatlanság, szédülés, kígyómarás, rovarcsípés és sebek kezelésére alkalmazták (Hartwell, 1971).

A tradícionális távolkeleti medicinban a levelet megfázás, köhögés, szájüregi betegségek, szemgyulladás esetén, tejelválasztás fokozására; az ágakat reumára, a gyökérkérget köhögés ellen, oedéma- és gyulladáscsökkentőként, lázcsillapításra, diabétesz kezelésére, hashajtóként, féregírtóként; a termést székrekedés esetén alkalmazzák (Reed 1976, Hikino 1985, Alberts és mtsai 2005).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérletes munkánk célja *Salvia, Lavandula* taxonok és a *Morus alba* terpén vegyületeinek tanulmányozása volt, gázkromatográfiás metodikák alkalmazásával.

Célunk volt néhány, megfelelően kiválasztott levendula és zsálya taxon (*Salvia officinalis* fehér és lila virágú-, 3 díszváltozat: cv. *tricolor, purpurascens, Kew Gold, Salvia judaica, S. africana-caerulea* és *S. mexicana* levél, valamint négy helyen gyűjtött *Lavandula vera,* továbbá *L. vera* ssp. *pyrenaica, L.intermedia, L. stoechas* virág és *L.dentata* levél és virág) illóolaj analízisét elvégezni, majd az irodalomban korábban leírt taxonok illóolaj összetételét összehasonlítani korábban nem vizsgált változataikkal, tanulmányozni az azonos fajhoz tartozó, de eltérő fenotípusú, illetve azonos körülmények között termesztett különböző egyedek illóolaj összetételét. Érdekesnek találtuk továbbá különbözö földrajzi helyről, sőt különböző földrészekről származó fajok kemotaxonómiai vizsgálatát is.

A *Salvia* és *Lavandula* illóolaj vizsgálat elsődleges célja a komponensek azonosítása gázkromatogtáfiával kombinált tömegspektrometriával, a százalékos összetétel GC-FID meghatározása, és a kivonási módszerek, mint vízgőzdesztilláció és szilárd fázisú mikroextrakció illóolaj összetételre gyakorolt hatásának tanulmányozása volt. Célunk volt továbbá a ’*purpurascens*’, ’*tricolor*’ és ’*Kew Gold*’ orvosi zsálya taxonok levélolajának virágzási stádiumok szerinti tanulmányozása, valamint a *Salvia africana-caerulea* in vitro szaporítása, hazai honosítás céljából, szabadföldbe kiültetve életképes növények létrehozása és azok illóolajának vizsgálata.

Terveink közt szerepelt az illóolaj összetétel genetikai hátterének tanulmányozása RAPD markerek és az illóolaj százalékos összetétele alapján, majd a rokonság vizsgálat kiterjesztése további zsálya és levendula fajokra az illóolaj kvalitatív és kvantitatív öszetételén alapuló Principal Component Analízissel. A RAPD fragmentumokon alapuló taxonómiai vizsgálat egyik célja az illóolajösszetétel genetikai meghatározottságának vizsgálata volt; RAPD fragmentumok és az illóolaj összetétel alapján végzett klaszter analízis eredményeit összehasonlítva tanulmányozni kívántuk a két módszer alkalmazhatóságát taxonómiai vizsgálatokban. A PCA vizsgálat a módszer pontosítására szolgált. Vizsgálatainkkal a gázkromatográfia és a tömegspekrtometria egy újabb célú alkalmazási lehetőségét kívántuk bemutatni.

A *Morus alba* levél és ágkéreg szterol és triterpén vegyületeinek vizsgálatának célja az SFE kivonatok léptéknövelésének és körülményeinek optimalizálása volt. Célunk volt a hexános és etanolos, valamint analítikai és félüzemi léptékű szuperkritikus széndioxiddal előállított, elszappanosítással tisztított kivonatainak vizsgálata; a különböző kivonási módszerek hozamának, a nyers kivonatok el nem szappanosítható anyag és β-szitoszterol tartalmának és összetételének összehasonlítása. A fitoszterol és triterpén komponensek minőségi vizsgálatát vékonyrétegkromatográfiás elővizsgálat után, származékképzés nélküli GC-MS módszerrel terveztük. Céljaink közt szerepelt végül egy gázkromatográfiás eljárás kidolgozása a β-szitoszterol tartalom mennyiségi meghatározására.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Vizsgálati anyagok

4.1.1. Növényanyag

4.1.1.1. Salvia levél és virág

A *Salvia officinalis* lila és fehér virágú változata, a *Salvia officinalis* cv. *purpurascens,* cv. *tricolor,* cv. *Kew Gold,* és a *Salvia judaica* a Pécsi Tudományegyetem Botanikus Kertjének Európai Mediterráneum Gyűjteményéből származnak. A Botanikus Kert földrajzi jellemzői: tengerszint feletti magasság: 171m, évi átlagos csapadékmennyiség: 683mm, évi átlaghőmérséklet: +11,2˚C, a növények löszös termőtalajon nőttek. A növényanyagot 2007. szeptemberben, 2008. májusban, júniusban és szeptemberben gyűjtöttük virágzás elötti, teljes virágzás és virágzás utáni állapotban. A *Salvia mexicana* hajtásrendszert 2009. áprilisban kaptuk Los Angelesből (Kalifornia, USA).

A *Salvia africana-caerulea* hajtásrendszert 2008. októberben szereztük be a Kirstenbosch National Botanical Garden (Dél-Afrikai Köztársaság) gyűjteményéből. A *Salvia africana caerulea* növényt in vitro szaporítottuk: két levélpáras dugványokat fertőtlenítettünk: desztillált vizes mosás után 15 percig 60 mg/ml N-cetilpiridinium-klorid és 30 mg/ml etanolos merkuri-klorid oldatban tartottuk, majd 3-szor 15 percig bidesztillált vízzel öblítettük. A steril növényeket 0,5% benzil-adenil-purint és 2% cukrot tartalmazó Murashige-Skoog táptalajon tenyésztettük és oltottuk. A klimaszoba hőmérséklete 22 ˚C volt, a minták napi 12 óra megvilágítást kaptak. A növényeket 5 – 6 cm-es állapotban földbe ültettük, 3 hétig klimaszobában, a korábbiakkal azonos körülmények között neveltük, majd szabad földbe ültettük ki. Az illóolaj tanulmányozásához az in vitro steril kultúrák, és a kiültetett, 25 – 30 cm-es növények levelét használtuk.

4.1.1.2. *Lavandula* virág és levél

A *Lavandula vera, Lavandula intermedia, Lavandula pyrenaica, Lavandula stoechas ssp. stoechas* virágzatot a Pécsi Tudományegyetem Botanikus Kertjének Európai Mediterráneum gyűjteményében gyűjtöttük. A *L. vera-1* és a *L. intermedia* a

sziklakertben, mészköves talajon, a többi levendula löszös termőtalajon nőtt. A mintákat 2008 és 2009 júniusában gyűjtöttük, teljes virágzáskor. A *Lavandula dentata* hajtásrendszert 2009. áprilisban egy Los Angelesi kertből kaptuk (Kalifornia, USA). A vizsgálatokhoz a növények virágait, illetve a *L. dentata* virágain kívül a leveleit is felhasználtuk.

4.1.1.3. *Morus alba* levél és ágkéreg

A *Morus alba* levelet és ágkérget 2005. októberben, valamint 2006. májusban, júniusban és szeptemberben gyűjtöttük három egyedfejlődési szakaszban, termésérés előtt, során és után; Budapesten (Dél-Budán és a Gellért-hegyen) és Solton (Kiskunság).

A vizsgálati növényanyag herbáriumi mintái (*Morus alba, Salvia africana-caerulea, Salvia mexicana, Lavandula viridis*) a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézetében, illetve a Pécsi Tudományegyetem Farmakognózia Intézetében (*Salvia officinalis, S. officinalis* '*purpurascens*', '*tricolor*', '*Kew Gold*', *Salvia judaica, Lavandula angustifolia, Lavandula intermedia, Lavandula pyrenaica, Lavandula stoechas ssp. stoechas*) találhatók meg.

4.1.2. Vegyszerek

A β-szitoszterol, α-,β-amyrin, lupeol, és az 5α-kolesztán-3-on standardok a Sigma-Aldrich (St. Louis. MO. USA), a fitol standard Merck Analytics & Reagents (Darmstadt, Germany) terméke. Az oldószerek HP-3D-CE minőségűek, a gázkromatográfiához használt kloroform spektroszkópiás tisztaságú (Reanal, Budapest, Merck Analytics & Reagents). A szuperkritikus kivonáshoz használt CO_2-t és a gázkromatográfiás vizsgálathoz használt nitrogént, oxigént, hidrogént és héliumot a Messer Griesheim Hungária Kft. szállította. A vékonyrétegkromatográfiás vizsgálatokhoz Kieselgel 60 F_{254} (Merck) réteget használtunk, cérium-szulfát előhívó a Reanal Budapest terméke.

A RAPD reakcióhoz felhasznált anyagok és oldatok:

- *T-puffer*: 360 µl 25 mM $MgCl_2$, 625 µl 10x reakció puffer, 4 x 12,5 µl 100 mM dNPT, 1965 µl MQ

- *5 x TBE*: törzsoldat (54 g TRIS, 27,5 g bórsav, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) 1000 ml oldathoz), melyből hígítással állítjuk elő az elektroforézis puffert. Az elektroforézisnél 0,5 x TBE puffert használtunk.
- *5 x STOP*: 10 % ficoll-400, 0,25 M EDTA (pH 8,0), 0,2 % brómfenolkék (BFB), 20 ml 5 x STOP oldat készítéséhez szükséges: 2 g ficoll (nagysűrűségű folyékony hidrofil poliszaharid) , 10 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 10-40 mg BFB és kiegészítjük 20,0 ml-re. Az elektroforézisnél 2 x STOP-ot (160 µl 5 x - -STOP + 240 µl trideszt. víz) használtunk.
- *Etidium bromid*: mutagén! Az oldat készítésekor kimérése kesztyűben, fehér papírlap felett történt. 100 µg/ml törzsoldatot alkalmaztunk gélfestéshez (10 mg/100 ml H_2O, hűtőben tároljuk).

A további felhasznált anyagokat a módszer leírásánál ismertetem.

4.2. Vizsgálati módszerek

4.2.1. Minták előkészítése, szárítás, szárítási veszteség meghatározása

Az illóolaj vizsgálatához a *Salvia* és *Lavandula* növényanyagot szobahőmérsékleten, napsütéstől védve szárítottuk. A DNS kivonást friss levélből végeztük. A szterol és triterpén tartalom vizsgálatához a Mori folium és cortex mintákat a szerves oldószeres kivonás előtt szárítószekrényben szárítottuk 50˚C-on tömegállandóságig.

A szárítási veszteség (% m/m) meghatározását a Ph.Hg.VIII. előirata szerint végeztük, 2 g növényanyagból kiindulva.

4.2.2. Extrakciós és tisztítási módszerek

4.2.2.1. Illóolajok vízgőzdesztillációja

Az illóolajtartalom meghatározását a VII. Magyar Gyógyszerkönyv (1986.) illóolaj kivonó készülékben végeztük. Az extrakciós idő 3 óra volt. Alacsony illóolajtartalom esetén segédfázisként 30-50˚C forráspontú petrolétert használtunk. Az illóolajtartalmat térfogatos, vagy gravimetriás méréssel határoztuk meg.

4.2.2.2. Szilárd fázisú mikroextrakció (SPME)

A kivonást GERSTEL MPS SPME készülékkel végeztük Intézetünkben. A minta előkészítése inkubátorban történt (Agitator). Az inkubátor hőmérséklete 60 ˚C, az inkubálás ideje 5,00 perc volt, a mintákat 250 rpm sebességgel rázattuk. A növényi minta tömege: 0,3 g volt. A mintavételhez 65 µm vastag PDMS/DVB (polidimetilsiloxan-divinilbenzén; hordozó: fused silica, STABLE FLEX/SS) adszorbens szálat használtunk, mélysége 22,00 mm, az extrakciós idő 10,00 perc. Az injektorban a szál mélysége 44,00 mm, a deszorpciós idő 60s. Az injektélást split módban végeztük, a split idő: 0,02 perc, a split arány 50:1, az áramlási seb.: 49.7ml/perc. Injektálás után a szálat kifűtöttük, 250,0 ˚C hőmérsékleten, 43,0 mm mélységben.

4.2.2.3. DNS extrakció

A molekuláris genetikai vizsgálatokat a PTE Növényélettani Tanszékén végeztük. A PCR és RAPD vizsgálatokhoz szükséges növényi DNS-t friss zsályalevélből izoláltuk, DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen) segítségével, a következő protokol szerint:

1. 0,1 g friss levelet elporítottunk folyékony nitrogénben. A port Eppendorf csövekbe helyeztük.
2. A mintákhoz hozzáadtunk 400 µl AP1 puffert, majd 4 µl RNase A enzimet (sejtfeltáró szerepű a puffer, az enzim RNS-t „emészt”).
3. Megkevertük a mintákat vortex segítségével, majd 10 percre 65 ˚C-ra tettük a csöveket. Közben 2-3-szor megforgattuk a mintákat.
4. Ezután 130 µl AP2 puffert mértünk a csövekbe, összeráztuk őket és 5 percre jégbe tettük. Majd lecentrifugáltuk a mintákat (12000 fordulat/5 perc) és a felülúszót vittük tovább (kb. 450 µl) (a puffer kicsapja a fehérjéket és poliszacharidokat).
5. A felülúszót „DNAse mini spin column” centrifugacsőbe pipettáztuk, melyet ismét lecentrifugáltunk (12000 ford./2 perc).
6. Az átfolyót új centrifugacsőbe mértük.
7. Hozzáadtunk 600 µl AP3/E oldatot, majd pipettával összekevertük a mintákat (az oldat etanolos, mely kicsapja a DNS-t).
8. Ebből 650 µl-t pipettáztunk egy új „DNase mini spin column” centrifugacsőbe és lecentrifugáltuk (12000 ford./1 perc). Az alul megjelenő folyadékot kiöntöttük.
9. A maradék oldattal megismételtük az előző lépést.

10. A DNS-t tartalmazó felső részt áthelyeztük a kitben található fedél nélküli Eppendorf csőbe és hozzámértünk 500 µl AW puffert. 1 percig 12000 fordulaton centrifugáltunk, az alul megjelenő folyadékot kiöntöttük (a puffer kimossa az etanolt).
11. Megismételtük az előző lépést, de most 2 percig centrifugáltunk 12000-es fordulatszámon.
12. Az oszlopot új Eppendorf csőbe helyeztük.
13. 100 µl 65 ˚C-os AE puffert mértünk a membránra, 5 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten, majd centrifugáltunk (12000 ford./1 perc) (a puffer segíti a DNS leválását a membránról).
14. Az előző pontot megismételtük, így 200 µl lett a végtérfogat. Az átfolyó folyadék tartalmazta a DNS-t.

A DNS mintákat az izolálás után tisztítottuk: az izolált DNS mintákból 100 µl-t vettünk ki Eppendorf csőbe, hozzáadtunk 60 µl 2-propanolt és 10 µl 3 M nátrium-acetátot. A csöveket mélyhűtőbe tettük 24 órára. Majd 5 percig 12000 fordulatszámon centrifugáltunk, a felülúszót leöntöttük. Az alul maradt DNS-hez 200 µl 70 %-os etanolt mértünk. Újra lecentrifugáltuk az oldatot (12000 ford./5 perc), a felülúszót leöntöttük. A csöveket nyitott fedővel 37 ˚C-os termosztátba tettük. Az alkohol teljes elpárolgása után a mintákhoz 50 µl tridesztillált vizet (MQ) adtunk. Az így elkészített mintákat használtuk a további vizsgálatokhoz.

4.2.2.4. Oldószeres extrakció Soxhlet készülékben

- Hexános kivonat: 5 g porított növényanyagot szűrőpapír hüvelyben a Soxhlet készülékbe helyezve 100 ml n-hexánnal vontunk ki, az oldószer forráspontján. Az extrakciót a cirkuláló oldószer elszíntelenedéséig folytattuk. A kivonatról az oldószert vákuumbepárlón eltávolítottuk, a szárazanyagtartalmat analitikai pontossággal mértük.
- Etanolos kivonat: a kivonást 96 V/V%-os etanollal végeztük a hexános kivonatnál ismertetett módon.
- Hexános extrakciót követő etanolos kivonat: a hexános extrakció után visszamaradt drogot levegőn oldószermentesítettük, majd kivontuk 96 V/V%-os etanollal a hexános kivonásnál ismertetett módon.
- A félüzemi SFE-t követő etanolos kivonat: a félüzemi SFE után visszamaradt drogot 96V/V%-os etanollal vontuk ki, az előzőekkel megegyező módon.
- A félüzemi SFE-t követő pentános kivonat: a félüzemi SFE után visszamaradt drogot n-pentánnal vontuk ki, az előzőekkel megegyező módon.

4.2.2.5. Szuperkritikus Fluid Extrakció (SFE)

4.2.2.5.1. Laboratóriumi (analitikai) szuperkritikus extrakció

5 g szárított, porított drogot ISCO 2-10 típusú kísérleti laboratóriumi szuperkritikus extraktorban fluid állapotú szén-dioxid segítségével extraháltunk állandó hőmérsékleten (40 °C), változó nyomáson (100, 150, 200, 300 és 400 bar). A szén-dioxid áramlási sebessége 0,280 - 0,300 ml/perc volt. A CO_2 extraktumokat abszolút etanolban nyelettük el. Az extrakciós idő 60 perc (30 perc statikus és 30 perc dinamikus extrakció), illetve 90 perc (30 perc statikus és 60 perc dinamikus extrakció) volt. A kivonást az ELTE Növényszervezettani Tanszékén végeztük.

4.2.2.5.2. Félüzemi szuperkritikus extrakció

A félüzemi szuperkritikus kivonó készüléket a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyipari Műveletek Tanszékén fejlesztették ki (Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék) (Rónyai és mtsai 1996, Oszagyán és mtsai 1996). A kivonást a BME Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszékén végeztük. A készülék töltettartójába 1kg porított drogot helyeztünk. A hőmérséklet 40 ˚C, a CO_2 áramlási sebessége 7 kg/óra, nyomása 450 bar volt. Az extraktum kinyerése kétlépcsős nyomáscsökkentéssel történt: az első szeparátorban a nyomás 40 bar, a másodikban 20 bar volt. Az első szeparátorban kapott kivonatot használtuk fel további vizsgálatokhoz. A hozamot 4 palack CO_2 után mértük, a teljes extrakciós idő 510 perc volt, amikor már az 1 óra alatt gyűjtött extraktum mennyisége nem haladta meg a a nyers szárazanyag 0,15%-át.

A porított növényanyag szemcseméret eloszlását szitaanalízissel határoztuk meg, Rosin-Rammler-Bennet eloszlás alapján. Az adott szitaméretnél (d) nagyobb szemcseméretet (R) Allen (1981) a következőképpen írja le: $R=100\exp[-(d/d_0)^n]$, ahol a jellemző szemcseméret $d_0=0.335\pm0.006$ mm, $n=2.80\pm0.06$ (STATISTICA 7.1 software; Nagy és mtsai, 2008).

4.2.2.6. Tisztítás elszappanosítással

A szerves oldószerrel és szuperkritikus fluid állapotú szén-dioxiddal kapott, bepárolt kivonatokat elszappanosítással tisztítottuk meg zsírosolaj tartalmától a Ph.Hg.VIII. módosított előírata szerint. A kivonatokat, 96%-os alkohollal és KOH-dal forraltuk. Az elszappanosított kivonatot vízzel hígíttottuk, az el nem szappanosodott apoláris anyagokat pertoléterbe átráztuk, majd a petroléteres kivonatot vízzel lúgmentesre mostuk, vízmentesítettük, szárazra pároltuk. A maradék „tisztított kivonat" tömegét analítikai pontossággal mértük.

4.2.3. Analitikai módszerek

4.2.3.1. Vékonyrétegkromatográfia (fitoszterolok, triterpének elővizsgálata)

A VRK vizsgálathoz a bepárolt tisztított kivonatot hexánban felvettük (15 mg/ml). Szilikagél (Kieselgel 60 F254) rétegre felcseppentettük a drog nyers kivonatát is: 1 g drogot 15 ml hexánnal ultrahangfürdőn rázattunk 30 percig, a kivonat szűrletét használtuk. Tesztként ß-szitoszterol 1 mg/ml hexános oldatát vittük fel. A kifejlesztést hexán - etil-acetát 3:1 arányú elegyével, 2 órán át telített kamrában végeztük, fronttávolság: 10 cm. Szárítás után a réteget 0,5 %-os kénsavas cérium szulfát oldattal bepermeteztük, 100 °C-on 10 percig hevítettük, majd látható fényben, vizuálisan értékeltük.

4.2.3.2. Gázkromatográfiás vizsgálatok

4.2.3.2.1. Illóolajösszetétel gázkromatográfiás (GC-FID) vizsgálata

A vizsgálatokat lángionizációs detektorral kapcsolt Fisons 8000 gázkromatográffal végeztük. 30 m hosszú, 0,25 mm belső átmérőjű Rt-β-DEXm (filmvastagság: 0.25µm) királis kolonnát használtunk. A nitrogén vivőgáz áramlási sebessége 6,86 ml/perc volt. 0,2 – 0,4 µl kloroformmal hígított illóolajat (2µl/ml) injektáltunk splitless módban, 10 s-ig. Az injektor hőmérséklete 210 ˚C, a detektor 230 ˚C volt. A kolonnahőmérséklet 8 ˚C/perc sebességgel emelkedett 60 – 230 ˚C-ig, végül a hőmérsékletet 5 pecig 230 ˚C-on tartottuk.

A csúcsokat retenciós idők alapján és standard addícióval azonosítottuk. A komponensek százalékos értékelését területnormalizációval végeztük, 3 párhuzamos mérés alapján a relatív standard deviáció (RSD%) 4,5 % alatt volt.

4.2.3.2.2. Szterolok és triterpének gázkromatográfiás (GC-FID) kvantitatív meghatározása belső standard alkalmazásával

A GC-FID vizsgálatokat Agilent lángionizációs detektorral kapcsolt Agilent 6890 N készüléken végeztük, 25 m hosszú, 0,2 mm belső átmérőjű kapilláris kolonnával. Az állófázis 0,33 µm vastagságú DB-5MS, vivőgáz 99,9999 % tisztaságú helium (pHe 0.20 MPa), az áramlási sebesség 1mg/ml volt. Az Agilent 7683 automata injector 1µl 2 – 10 µl/ml 96 m/m%-os etanollal, vagy kloroformmal hígított elszappanosítással tisztított kivonatot injektált splitless módban, 0,7 mg/ml sebességgel. Az injektor hőmérséklete 280 ˚C, a transfer line 275 ˚C, a detektor 330 ˚C volt.

Hőmérsékleti program: 120°C 1 perc, 10 °C/perc 120 - 300°C, 14 perc 300˚C, 10°C/perc 300 – 310 °C, 10 perc 310˚C.

A komponenseket retenciós adatok és standard addíció alapján azonosítottuk. A százalékos értékelést a csúcs alatti területek alapján végeztük. A β-szitoszterol tartalom kvantitatív meghatározását 5-α-koleszt́án-3-on belső standarddal mértük.

A kvantitatív gázkromatográfiás módszer validációja:

A β-szitoszterol standard oldat linearitási tartományának meghatározása hat koncentrációban történt, 1 és 100 µg/ml között. Az 5 α-koleszt́án-3-on belső standard koncentrációja állandó, 12,65 µg/ml, determinációs koefficiens (R^2) 0,9998. A kimutathatóság alsó határa (LOD; S/N=3) 0,1 µg/ml, a mérési határ (LOQ; S/N=10) 0,3 µg/ml injektált β-szitoszterol volt.

A GC-FID módszer ismételhetőségét három párhuzamos mérés alapján határoztuk meg, a relative csúcs alatti területek relative standard deviációja 1,94% volt.

A csúcstisztaságot tömegspektroszkópiával vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a tiszta kloroform oldószerben, a tanulmányozott komponensekkel megegyező retenciós idővel, és a belső standardot nem tartalmazó növényi kivonatokban a belső standarddal azonos retenciós idővel nem eluálódik csúcs. Minden csúcs kizárólag az azonosított

komponenst tartalmazta, kivéve az α-amirint és a lupeolt, amelyeknek az elválasztása az adott körülmények között nem volt megoldható.

4.2.3.2.3. Gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás vizsgálatok

A GC-MS vizsgálatokat 5973N tömegszelektív detektorral kapcsolt Agilent 6890 N készüléken végeztük, Chrom Card Server Ver. 1.2. programmal. 30 m hosszú, 0,25 mm belső átmérőjű kapilláris kolonnával. Az állófázis 0,25 µm vastagságú HP-5MS, vivőgáz 99,9999 % tisztaságú helium (pHe = 0.20 MPa), az áramlási sebesség 1mg/ml. Az Agilent 7683 automata injektor 1µl 2 – 10 µl/ml 96 m/m%-os etanollal, vagy kloroformmal hígított illóolajat, illetve elszappanosítással tisztított kivonatot injektált splitless módban, 0,7 mg/ml sebességgel. Az injektor hőmérséklete 280 ˚C, a transfer line 275 ˚C volt.

Az *illóolaj* összetétel tanulmányozására a következő hőmérsékleti programokat alkalmaztuk:

- 60˚C 3 perc, 8˚C/perc 60–230˚C, 5 perc 230˚C
- 60˚C 3 perc, 8˚C/perc 60-200˚C, 200ºC 2 perc, 10˚C/perc 200-250˚C, 250˚C 15 perc.

A *szterolok és triterpének* azonosításához használt hőmérséklet program:

- 140°C 1perc, 10°C/perc 140–270°C, 20perc 270˚C, 10°C/perc 270–300°C, 6perc 300˚C

MS körülmények: az ionizációs energia 70eV, a tömeg tartomány 40-500m/z, percenként 1 analízis készült. A csúcsok azonosításához a retenciós időket és a tömegspektrumokat összehasonlítottuk a standard vegyületek és a NIST spektrumtár adataival. A százalékos értékelés relatív standard deviációja (RSD%) 4 mérés alapján 7,25% alatt volt.

4.2.3.3. Molekuláris taxonómiai vizsgálatok

4.2.3.3.1. PCR reakció

A kivont DNS termék mennyiségét 1 %-os agaróz gélen futtattuk és a minták sáverősségéből következtettünk a bennük lévő DNS koncentrációjára. Első lépésben a PCR reakcióhoz optimális DNS mennyiség tesztelésére a RAPD reakciókat különböző DNS hígításokkal végeztük. A megfelelő DNS templát hígítás kiválasztása után a

RAPD-PCR-hoz szükséges reakcióelegyet mértük össze. A reakciókat a megbízható eredményesség érdekében háromszoros ismétlésben végeztük. Egy PCR-reakcióhoz a következő komponenseket mértük össze PCR csövekbe:

Steril tridesztillált víz (MQ)	5,75 µl
T-puffer	3,25 µl
Primer	1,0 µl
Minta (templát DNS)	2,0 µl
Taq polimeráz enzim (ZenonBio Kft)	0,2 µl
Összesen:	12,2 µl

A RAPD analízist 62 dekamer primerrel (Operon Technologies, Alameda, CA.) végeztük: OPA-(1-20), OPB-(2-20), OPN-(4), OPO-(1-19). A negatív kontroll esetében minden komponenst összemértünk a PCR csövekbe, kivéve a templát DNS-t, helyette 2 µl MQ-t. A PCR csöveket egy PTC-200-as típusú Termocyclerbe (Perkin Elmer, USA) helyeztük és elindítottuk a programot. Az alkalmazott program (RAPD 2) a következő volt:

1. ciklus: 94 ˚C 2 perc
2. ciklus: 94 ˚C 10 másodperc
3. ciklus: 36 ˚C 30 másodperc
4. ciklus: 72 ˚C 1 perc
5. ciklus: 35-ször 2-3-4-es lépések
6. ciklus: 72 ˚C 2 perc

A program végén az elegyhez 5 µl 2 x STOP oldatot mértünk, majd 1,5 %-os agaróz gélen futtattuk a mintákat 110 V-on 2 órán át.

4.2.3.3.2. Gél elektroforézis

A géltálca (18 x 15 cm) végeit szigetelőszalaggal lezártuk. A minták felvitelét szolgáló „zsebek” kialakítására használt „fésűt” úgy helyeztük el, hogy az alja kb. 1 mm-re volt a tálcától. Kimértünk 3,0 g agarózt és hozzáadtunk 200,0 ml 0,5 x TBE puffert. Mikrohullámmal (700 W-on) 1-2 percig melegítettük. A homogén oldatot 50-60˚C-osra hűtöttük és hozzáadtunk 200 µl etidium-bromid oldatot. Az etidium-bromid feloldódása után a gélt beleöntöttük az előre elkészített géltálcába. 30 perc dermedési idő után a „fésűt” és a szigetelő szalagokat eltávolítottuk. A megszilárdult gélt belehelyeztük az elektroforézis kádba (20,5 x 27,5 x 8 cm) (Biocenter) úgy, hogy a puffer ellepje.

A minták felvitele (17 µl) automata pipettával történt. A mintákhoz adott 5 µl 2 x STOP oldat sűrűvé tette az oldatot,amely – óvatosan a zsebbe pipettázva – nem keveredett a futtató pufferrel, hanem a zseb aljára süllyedt. A STOP oldat kék színe a brómfenolkék

festéktől ered. Ez egy olyan jelzőfesték, melynek vándorlási sebessége egy kb. 30 bp nagyságú fragmentével egyezik, így mindig a „futtatási front” helyzetét jelzi. A STOP oldatban levő EDTA meggátolja a Mg^{2+} ionokat igénylő DNS-t bomtó enzimek működését.

A minták mellé méretmarkerként 3 µl 100 bp-os DNS Ladder Plus-t (Fermentas) és 17 µl negatív kontrollt is felvittünk összehasonlítás céljából.

A minták, a marker és a kontroll felvitele után beállítottuk a megfelelő feszültséget (110 V) a tápegységen (PSE 300/300, Biocenter). Friss puffer használatakor az áramerősség (mA) értéke (jelen esetben 55 mA) kb. fele a feszültség (V) értékének (110 V). Az elválasztás akkor kész, ha a „front” helyzetét jelző brómfenolkék festék eléri a gél alját.

Az elektroforézis után a géleket azonnal lefényképeztük UV fény alatt BioDoc-It System (UVP Inc., Kalifornia) géldokumentációs berendezéssel, mivel a gélhez hozzáadott etidium-bromid gyorsan bomlik UV fény hatására. Az amplifikációs termékek bázispár hosszúságát a mintákkal együtt futtatott Ladder segítségével tudtuk megállapítani.

4.2.4. Statisztikai módszerek

A molekuláis és kemotaxonómiai vizsgálatok statisztikai elemzése

A gélelektroforézis során a primerekkel kapott polimorf sávokat egy bináris, prezencia-abszencia típusú adatmátrixba rögzítettük [(1) – az adott pozícióban jelenlévő sáv, (0) – az adott pozícióban hiányzó sáv]. A távolság mátrixot az UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) metódussal klaszter-analízisre használtuk a SYN-TAX 5.0 programcsomag (Podani 1993) felhasználásával. Az adatokból a program segítségével kiszámoltuk a taxonok egymáshoz viszonyított genetikai távolságát a Jaccard index alapján. A genetikai távolság értékét úgy kapjuk meg, hogy a genetikai hasonlóság értékét kivonjuk 1-ből: JAC = 1-a/(a+b+c). Podani (1997) megfogalmazásában a Jaccard index annak az eseménynek a becsült valószínűsége, hogy két objektum megegyezik egy, legalább az egyiküket jellemző változóban. A hasonlósági hányados (SR = similarity ratio) prezencia-abszencia adatok esetén megegyezik a Jaccard indexszel: JAC = a/(a+b+c), ahol ’a’ azon változók száma, amelyek mindkét összehasonlítandó objektumban megvannak (közös prezencia), ’b’

azon változók száma, amelyek csak az 1. objektumot jellemzik, a másikból hiányoznak, ’c’ csak a 2. objektumot jellemző, az 1-ből hiányzó változók száma.

Az *illóolajösszetételen* alapuló rokonság meghatározást szintén UPGMA módszerrel végeztük, de a folyamatos változó adatok kiértékeléséhez a Bray-Curtis koefficienst alkalmasabbnak találtuk. Mindkét módszerrel hasonló dendrogramot szerkesztettünk a SYN-TAX 5.0. program segítségével.

Az illóolaj komponensek és összetétel pontosabb rokonságvizsgálatára PCA (Principal Component Analysis) elemzést végeztünk. A módszer egy többváltozós vektor alapú varianciavizsgálat, lényege, hogy nagyszámú függő változót átalakít át kisebb számú független változó vektorrá, amit főkomponensnek (principal component) nevez. A koordinátarendszerben ábrázolt vektorok elhelyezkedése és nagysága jellemzi az eredeti adatok varianciáját és belső szerkezetét. PCA-t elvégeztük Jaccard index alapján, ami az azonosított komonensek bináris jelenlétét veszi alapul (kvalitatív vizsgálat); Bray-Curtis koefficiens alapján, ami a komponensek százalékos eloszlását is figyelembe veszi (kvantitatív analízis); valamint Biplot analízissel kiegészítve, ami a kemotaxonómiai különbségekért felelős komponenseket is ábrázolja.

Variancia analízis: A szignifikancia meghatározását két különböző adatcsoport között egy utas ANOVA módszerrel végeztük ($p<0,05$). Minden vizsgálatot háromszor ismételtünk.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

5.1. *Salvia* fajok vizsgálati eredményei

5.1.1. Salviae folium összillóolaj tartalma

Salvia officinalis fehér és lila virágú-, 3 díszváltozat (cv. *tricolor, purpurascens, Kew Gold*), továbbá 3 egzotikus zsályafaj: *Salvia judaica, S. africana-caerulea* és *S. mexicana* levél illóolaját vizsgáltuk (1. táblázat). Legmagasabb illóolajtartalmat a *Salvia africana-caerulea* és a *S. officinalis* cv. *Kew Gold* levelének vízgőzdesztillációjakor kaptunk, ezeket a fehér virágú orvosi zsályalevél illóolajtartalma közelítette meg legjobban; a felsorolt minták meghaladták a A Ph.Hg.VIII. tartalmi követelményeit (egész levélre 15 ml/kg, aprított levélre 10 ml/kg). A lila virágú *S. officinalis,* valamint *tricolor* és *purpurascens* változatai közepes illóolajtartalommal rendelkeztek, a *S. judaica* és *mexicana* levele csak nyomokban tartalmazott illóolajat.

1. táblázat. *Salvia* levél összillóolaj tartalma

Levéldrogot szolgáltató taxonok	**Összillóolaj tartalom** (ml/100g)
**Salvia officinalis* fehér virágú	1,0±0,3
**Salvia officinalis* lila virágú	0,9±0,0
**Salvia officinalis* cv. *tricolor*	0,4±0,2
**Salvia officinalis* cv. *purpurascens*	0,5±0,2
**Salvia officinalis* cv. *Kew Gold*	1,2±0,2
**Salvia judaica*	<0,1
Salvia africana-caerulea	1,6
Salvia mexicana	<0,1

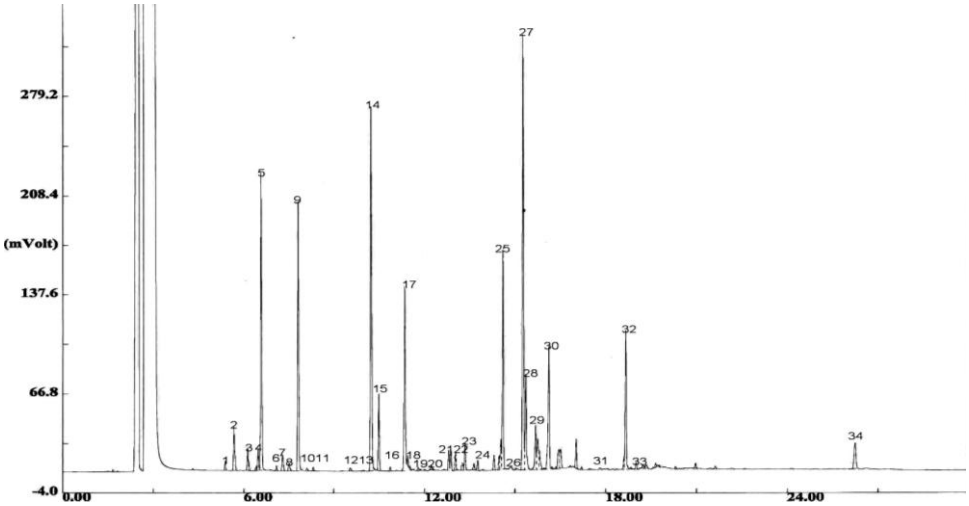
* Az értékek két év (2007, 2008) során gyűjtött levélminták összillóolaj tartamának az átlaga

5.1.2. Salviae folium és flos illóolajok kvalitatív vizsgálata

A zsálya illóolajokban 56 illó komponenst azonosítottunk. A *S. officinalis* változatainak levéldrogjai azonos illóolaj komponenseket tartalmaztak, különbséget csak az arányukban kaptunk (17-18, 20-22. ábra). A fő illókomponens a fehér virágú *Salvia officinalis* levelében az ISO standardnak megfelelően (ISO 11165:1995) az α-tujon (14), a lila viragú, és a termesztett változatok levelében α-humulén (27), további jelentős komponensek a β-pinén (5), 1,8-cineol (9) és a kámfor (17). A többi faj illóolajösszetétele jelentősen eltért, a főbb komponensek szeszkviterpének voltak. Megállapítottuk, hogy a júdeai zsályalevél fő illókomponensei a β-kubebén (36), β-kariofillén (25) és a ledol (32) szintén szeszkviterpének (23. ábra). Az afrikai zsályalevél illó komponensei közül legjelentősebbnek a piperitont (43) és a β-kopaént (47) találtuk, nagyobb mennyiségben ezeken kívül még β-kariofillén (25), δ-kadinén (30) és spatulenol (52) szeszkviterpéneket mutattunk ki (24. ábra). A fő komponensek a piperiton kivételével megegyeztek Kamatou és mtsai. (2006, 2007) által vizsgált afrikai zsályaolaj összetételével, de arányukban jelentős eltérést kaptunk. A mexikói zsálya fő illó komponensei a szeszkviterpén β-kariofillén (25), az izoledén (45), a β-kopaén (47) és a β-farnezén (46) voltak (25. ábra).

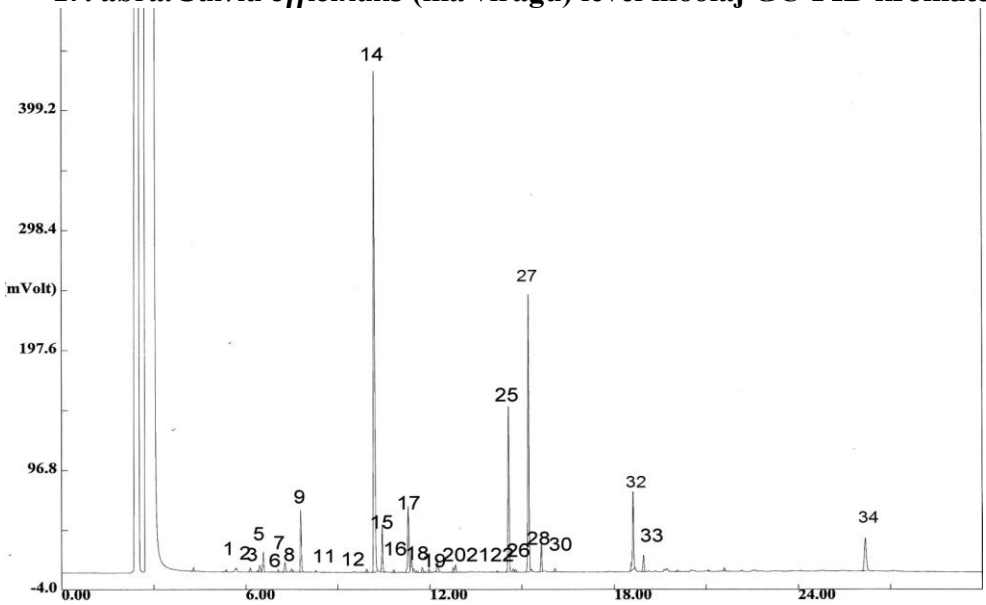
A fehér viragú *S. officinalis* virágának illóolajösszetételét is vizsgáltuk, a levélhez hasonlóan jelentős komponens volt az α-tujon (14), de több szeszkviterpént: β-kariofillént (25), α-humulént (27), ledolt (32), viridiflorolt (34) és az aromás szeszkviterpén ar-turmeront (55), is fő komponensként azonosítottunk (19. ábra).

A fontosabb illó komponensek tömegspektrumai a 26. ábrán láthatóak.



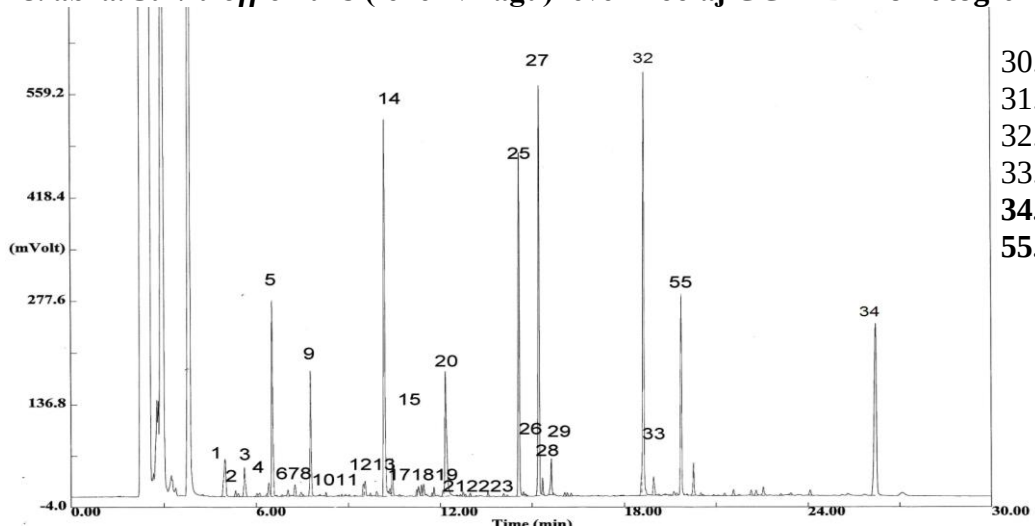
1. α-tujén
2. α-pinén
3. kámfén
4. szabinén
5. **β-pinén**
6. β-mircén
7. m-cimol
8. limonén
9. **1,8-cineol**
10. trans-β-ocimén
11. γ-terpinén
12. terpinolén
13. β-terpinén

17. ábra. *Salvia officinalis* (lila virágú) levél illóolaj GC-FID kromatogramja



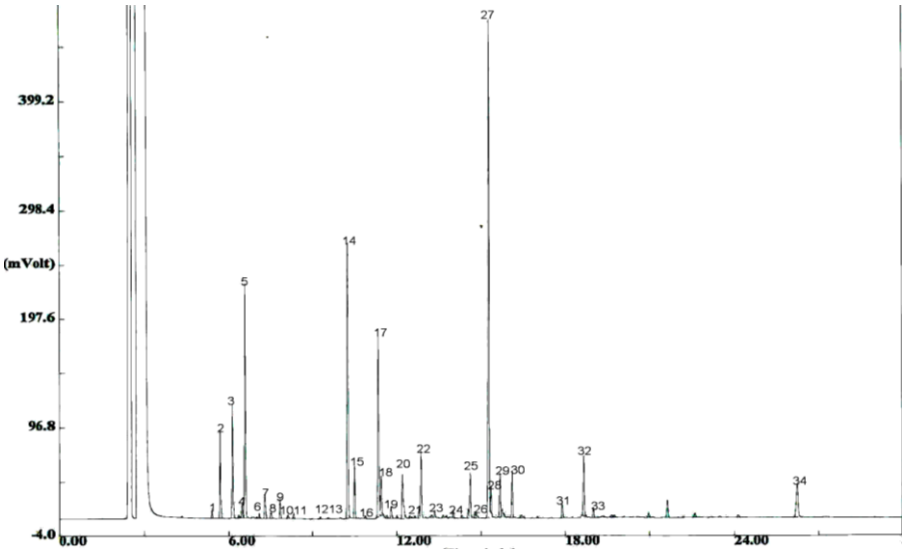
14. α-tujon
15. β-tujon
16. cis-szabinol
17. kámfor
18. pinokámfon
19. izopinokámfon
20. borneol
21. bornil-acetát
22. mirtenil-acetát
23. α-kubebén
24. α-kopaén
25. β-kariofillén
26. (+)-aromadendrén
27. α-humulén
28. γ-muurolén
29. (+)-ledén

18. ábra. *Salvia officinalis* (fehér virágú) levél illóolaj GC-FID kromatogramja



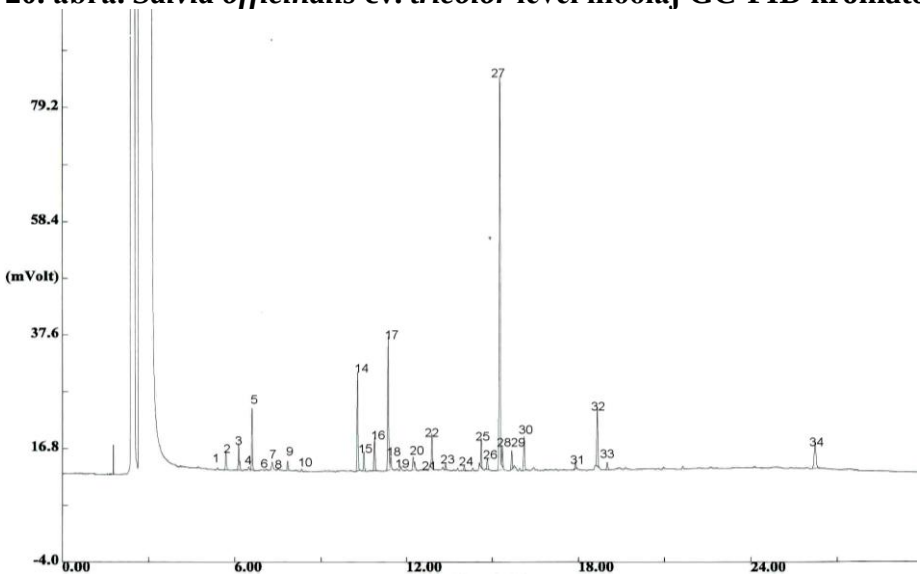
30. δ- kadinén
31. palustrol
32. ledol
33. kariofillén-oxid
34. viridiflorol
55. ar-turmeron

19. ábra. *Salvia officinalis* (fehér virágú) virág illóolaj GC-FID kromatogramja



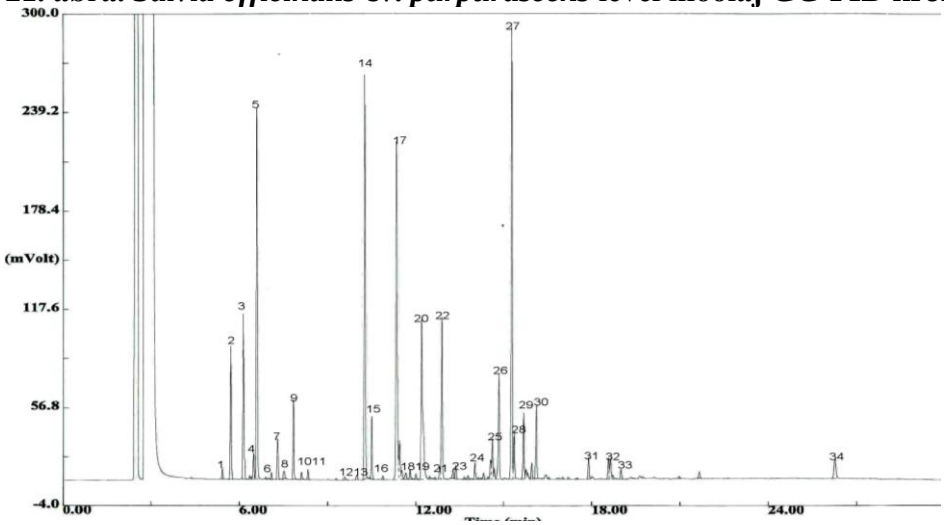
1. α-tujén
2. **α-pinén**
3. **kámfén**
4. szabinén
5. **β-pinén**
6. β-mircén
7. m-cimol
8. limonén
9. 1,8-cineol
10. trans-β-ocimén
11. γ-terpinén
12. terpinolén
13. α -terpinén
14. **α-tujon**
15. **β-tujon**

20. ábra. *Salvia officinalis* cv. *tricolor* levél illóolaj GC-FID kromatogramja



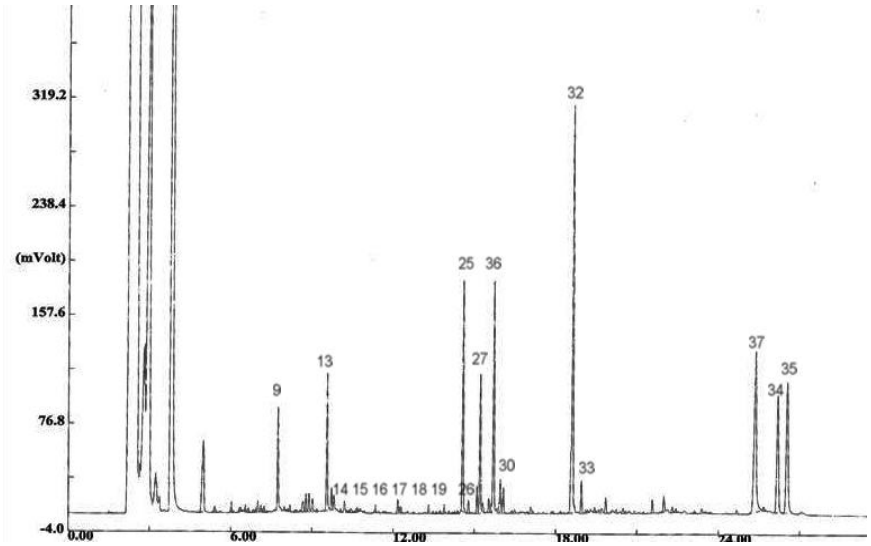
16. cis-szabinol
17. **kámfor**
18. pinokámfon
19. izopinokámfon
20. **borneol**
21. bornil-acetát
22. **mirtenil-acetát**
23. α-kubebén
24. α-kopaén
25. β-kariofillén
26. (+)-aromadendrén
27. **α-humulén**
28. γ-muurolén
29. (+)-ledén
30. δ- kadinén

21. ábra. *Salvia officinalis* cv. *purpurascens* levél illóolaj GC-FID kromatogramja

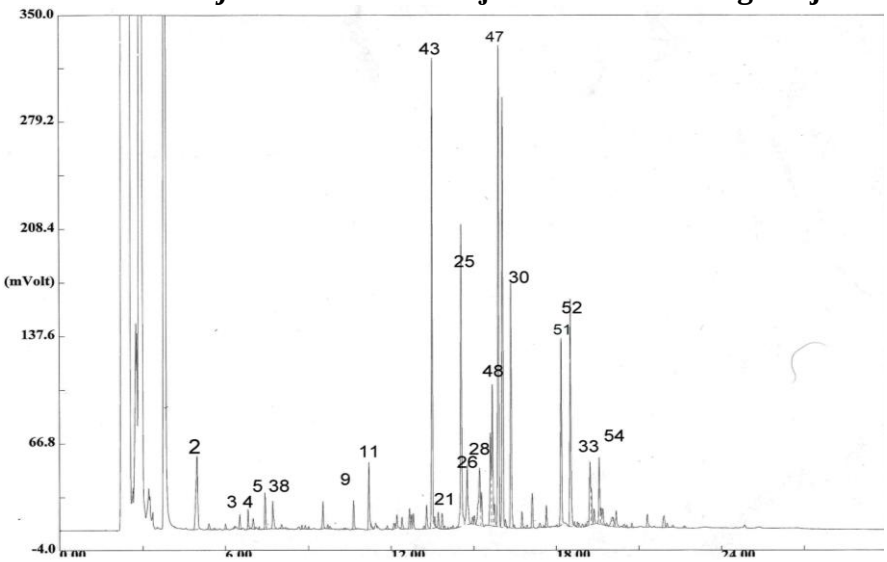


31. palustrol
32. ledol
33. kariofillén-oxid
34. viridiflorol

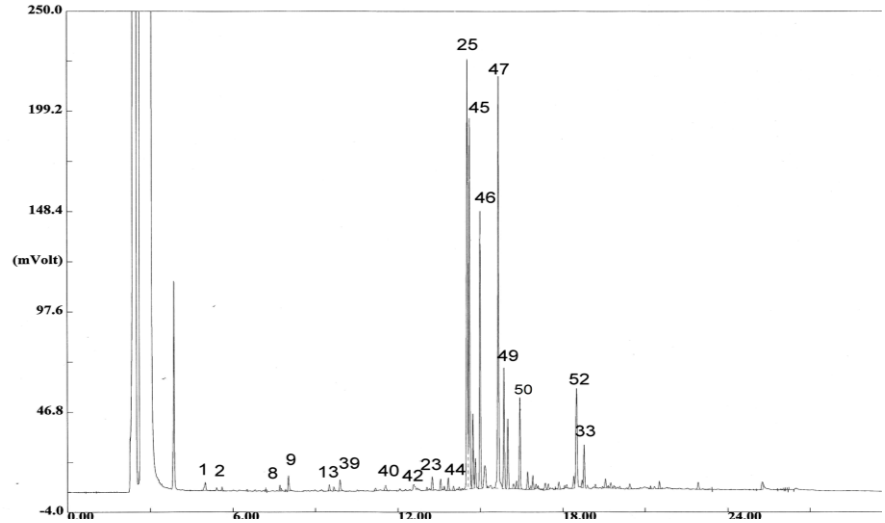
22. ábra. *Salvia officinalis* cv. *Kew Gold* levél illóolaj GC-FID kromatogramja



23. ábra. ***Salvia judaica*** **levél illóolaj GC-FID kromatogramja**



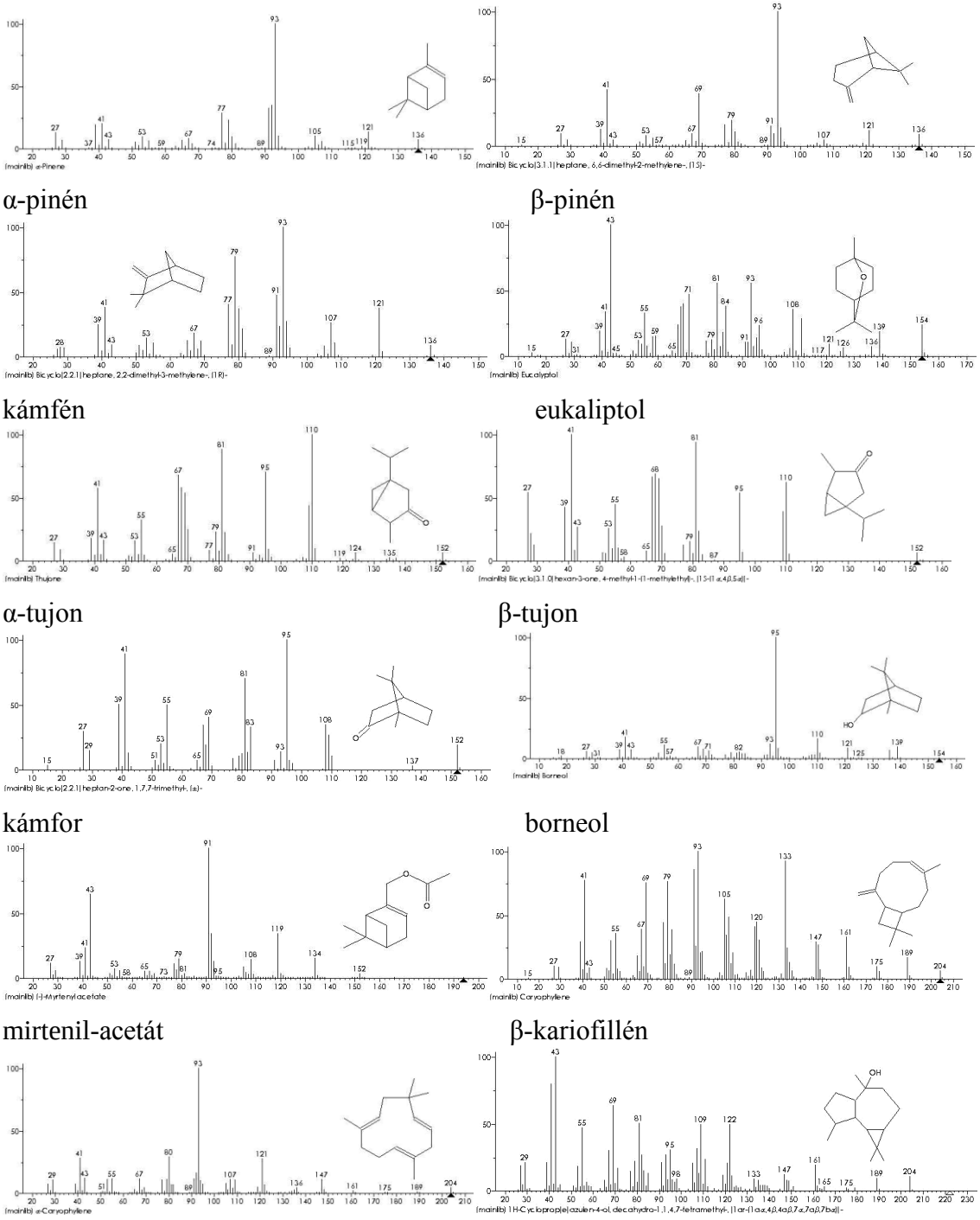
24. ábra. ***Salvia africana-caerulea*** **levél illóolaj GC-FID kromatogramja**



25. ábra. ***Salvia mexicana*** **levél illóolaj GC-FID kromatogramja**

1. α-tujén
2. α-pinén
3. kámfén
4. szabinén
5. β-pinén
8. limonene
9. 1,8-cineol
11. γ-terpinén
13. β-terpinén
14. α-tujon
15. β-tujon
16. cis-szabinol
17. kámfor
18. pinokámfon
19. izopinokámfon
21. bornil-acetát
23. α-kubebén
25. β-kariofillén
26. (+)-aromadendrén
27. α-humulén
28. γ-muurolén
30. δ- kadinén
32. ledol
33. kariofillén-oxid
34. viridiflorol
35. epimanool
36. β-kubebén
37. palmitinsav
38. β-fellandrén
40. trans-pinokarveol
42. mirtenal

43. piperiton
44. burbonén
45. izoledén
46. β-farnezén
47. β-kopaén
48. germakén-D
49. γ-elemén
50. kalamenén
51. germakrén-D-4-ol
52. spatulenol
53. δ-kadinol
54. α-kadinol



26. ábra. Zsályalevél illóolajokban azonosított fő komponensek tömegspektrumai

5.1.3. *Salvia* levél illóolajok kvantitatív (összetétel) vizsgálata

A zsályalevél illókomponenseinek azonosítása után az illóolaj százalékos összetételét vizsgáltuk GC-FID mérések alapján. A komponensek százalékos megoszlását a

2. táblázat, szerkezet szerinti megoszlásukat a 3. táblázat szemlélteti. A táblázatban feltűntetett *Salvia officinalis* és *S. judaica* levél minták illókomponenseinek százalékos értékeit két év (2007, 2008) során gyűjtött növényanyag mérési eredményeinek átlaga alapján adtuk meg.

Monoterpéneket legmagasabb arányban a *Salvia officinalis* fehér virágú változatában találtunk (67,1%), főként α-tujon tartalmának köszönhetően, a lila virágú változatra valamivel alacsonyabb százalékos arány volt jellemző (62,1%). A 3.1.4.1. fejezetben ismertetett csoportosítás szerint az orvosi zsálya minták az 5. csoporthoz álltak legközelebb (α-tujon >kámfor > ß-tujon > 1,8-cineol), de magas szeszkviterpén arányuk miatt (β-kariofillén, α-humulén) szorosan egyik csoportba se voltak sorolhatóak (Tucker és mtsai 1990, Mockuté és mtsai 1990). A 9909:1997 ISO szabvány előírásaihoz a fehér és lila virágú *S. officinalis* minták illóolaj összetétele közel állt, legfeljebb határérték körüli minimális eltérést tapasztaltunk.

Az orvosi zsálya díszváltozataiban hasonló arányban voltak mono- és szeszkviterpének, ezen belül a *purpurascens* változat elsősorban szeszkviterpéneket, a *tricolor* és *Kew Gold* változatok inkább monoterpéneket tartalmaztak, fő komponens mindegyik olajban az α-humulén volt.

A júdeai, afrikai és mexikói zsályára a szeszkviterpének túlsúlya volt jellemző, legjelentősebb különbséget a mexikói zsálya esetében találtunk, illóolaja 86,7%-át alkották szeszkviterpének, ezen belül fontosabb komponensei az izoledén (15,2%), β-kariofillén (18,1%) és a δ-kadinén (11,1%). Diterpén epimanoolt csak a *S. judaica* illóolajában találtunk, a zsálya fajokban 3.1.4.2. fejezetben ismertetett diterpének vízgőzdesztillációval nem voltak kinyerhetők.

A különböző minták illóolajának terpén-szénhidrogén és oxigén tartalmú terpén tartalma is jelentősen eltért. Legmagasabb szénhidrogén arányt a mexikói zsályában mértünk (80%), de az afrikai zsályában és a *S. officinalis* díszváltozatok közül a *purpurascens* és *tricolor* változatokban is a szénhidrogének voltak túlsúlyban, főként α-humulén tartalmuknak köszönhetően. Az oxigenált terpének legmagasabb arányát a fehér virágú orvosi zsályában mértük (80%), ezek főként alkoholok és ketonok voltak, de étereket és észtereket is tartalmazott. A lila virágú változat közel 50% oxigén tartalmú terpént tartalmazott. A díszváltozatok valamint a júdeai és afrikai zsálya 40% körül tartalmazott oxigenált terpéneket, a mexikói zsálya csak 6%-ot tartalmazott.

2. táblázat. Zsálya vízgőzdesztillált levél illóolajok összetétele (mérés: GC-FID)

Komponensek	Retenciós idő t_R (perc)	*Vízgőzdesztillált illóolaj komponensek százalékos megoszlása (%)*							
		S. officinalis (fehér)	*S. officinalis* (lila)	*S off* cv. *purpurascens*	*S off* cv. *tricolor*	*S off* cv. *Kew Gold*	*Salvia judaica*	*S. africana-caerulea*	*Salvia mexicana*
α-tujén	5,38	0,1	0,4	0,1	0,4	2,8			
α-pinén	5,74	0,2	2,4	1,3	3,5	2,6		3,2	0,2
kámfén	6,18	0,7	1,6	1,7	4,6	2,6		0,2	
szabinén	6,46	0,5	0,8	0,5	0,7	0,6		0,1	
β-pinén	6,63	1,0	11,4	4,6	11,3	8,5		0,8	
β-mircén	7,06	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1			
β-cimol	7,29	0,8	0,8	1,2	1,1	1,1			
limonén	7,58	0,4	0,8	0,3	0,4	0,2			0,1
β-fellandrén	7,71							0,82	
linalool	7,77								0,5
eukaliptol	7,88	4,4	10,2	1,3	0,7	1,4	2,9	0,7	0,7
trans-β-ocimén	8,18		0,2	0,7	0,1	0,2			
γ-terpinén	8,29	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2			
trans-pinokarveol	8,65								0,3
terpinolén	9,26		0,1	0,1	0,1	0,1	4,6		
β-terpinén	9,75	0,2		0,1	0,1		3,1		
α-tujon	**10,30**	**34,8**	**16,1**	**8,6**	**12,4**	**10,3**	**0,3**		
β-tujon	10,56	3,0	4,7	1,7	1,8	1,4	0,2		
cis-sabinol	10,84	0,1	0,1	2,9	0,1	0,1	0,1		
2-ciklohexen-1-ol	11,20							1,7	
kámfor	11,41	11,1	10,3	11,0	7,3	9,2	0,2		
pinokámfon	11,60	0,8	0,3	1,4	2,0	1,1			
izopinokámfon	11,48	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3			
borneol	12,32	6,6	0,6	2,7	2,7	7,7		0,4	
piperiton	12,49							11,4	
bornil-acetát	12,77	0,2	0,6	0,6	0,5	0,4			
mirtenil-acetát	12,84	1,6	0,5	2,8	3,0	3,7			
α-kubebén	13,04	0,1	0,7	0,6	0,4	0,7			0,5
α/β-burbonén	13,10								0,5
izoledén	13,80								15,2
β-farnezén	13,86								3,7
α-kopaén	14,13	0,1	0,7	0,5	0,4	0,9			
β-kariofillén	**14,69**	**11,9**	**5,2**	**2,6**	**2,0**	**3,5**	**6,6**	**8,4**	**18,1**
(+)aromadendrén	14,81	0,2	0,1	1,5	0,3	1,8	1,2	2,2	
α-humulén	**15,34**	**13,5**	**11,2**	**33,2**	**23,4**	**14,5**	**8,5**		
γ-muurolén	15,43	1,9	2,9	1,5	1,2	2,0		2,2	1,2
(+)-ledén	15,66		0,6	2,0	0,5	2,5			
β-kubebén	15,71						9,4		17,8
germakrénD	15,68							3,7	
γ-elemén	15,90							12,3	5,0
γ-kadinén	16,05							11,6	3,0
δ-kadinén	16,19	0,2	3,6	3,3	2,3	3,2	2,3	6,4	11,1
kalamenén	17,05								3,7
germakrénD-4-ol	18,18							4,9	
palusztrol	18,00			0,6	0,4	0,9			
ledol	18,75	2,8	3,7	4,1	4,2	1,2	18,6		
spatulenol	18,51							6,4	5,3
kariofillén-oxid	18,97	0,8	0,1	0,6	1,2	1,1		1,7	1,8
δ-kadinol	19,27							0,8	
α-kadinol	19,56							1,7	
palmitinsav	25,38						9,4		
viridiflorol	26,19	5,2	0,9	2,9	3,1	2,2	7,0		
epimanool	26,55						6,2		

3. táblázat. Zsályalevél illókomponensek csoportosítása terpén váz és funkciós csoportok szerint (mérés: GC-FID)

Vegyület csoportok	*Vegyületcsoportok aránya (%)*							
	Salvia officinalis (fehér)	*Salvia officinalis* (lila)	*S off* cv, *purpurascens*	*S off* cv, *tricolor*	*S off* cv, *Kew Gold*	*Salvia judaica*	*Salvia africana-caerulea*	*Salvia mexicana*
Terpénváz szerint								
monoterpének	67,1	62,1	44,2	53,2	54,6	11,5	19,7	2,0
szeszkviterpének	32,5	29,7	56,9	39,5	34,4	53,7	62,6	86,7
diterpének						6,2		
Funkciós csoportok szerint								
szénhidrogének	32,1	43,7	56,4	53,2	48,1	35,8	52,2	79,9
oxigén tartalmú terpének	71,6	48,1	41,5	39,5	40,9	35,6	30,1	8,4
alkoholok	19,6	15,6	14,6	11,2	13,5	34,9	16,5	6,6
éterek	0,8	0,1	0,6	1,2	1,1		1,7	1,8
aldehidek								0,1
ketonok	49.5	31,5	22,9	23,6	22,1	0,7	11,4	6,1
észterek	1,1	3,5	3,5	4,2		0,3		

5.1.4. *Salvia officinalis* levél és virág illóolajának összehasonlítása

Összehasonlítottuk a 2008-ban, teljes virágzás stádiumában gyűjtött fehér virágú *Salvia officinalis* levelének és virágának illóolajtartalmát és százalékos összetételét. A virág összillóolajtartalmát alacsonyabbnak találtuk, mint a levélét (4. táblázat).

4.táblázat. Fehér virágú orvosi zsálya levél és virág illóolajtartalmának összehasonlítása

Drog neve	**Összillóolaj tartalom** (ml/100g)
Salvia officinalis fehér virágú - levél	0,7
Salvia officinalis fehér virágú - virág	0,3

A levél és a virág illóolaj összetétele, mint a 5. táblázatban, valamint a 18 - 19. ábrán is látható, jelentősen eltér. A virágban a levélhez hasonlóan jelentős komponens az α-tujon, (37,2% a levélben, 13,5% a virágban) de több szeszkviterpént: β-kariofillént, α-humulént, ledolt és viridiflorolt is fő komponensként azonosítottunk. Monoterpének a levélben, szeszkviterpének a virágban voltak magasabb arányban. Oxigenáltság tekintetében is tapasztaltunk különbséget, bár mindkét szervben az oxigén tartalmú terpének voltak többségben, a virág esetében kisebb volt a különbség a két vegyületcsoport aránya között. Az alkoholok aránya a virágban, a ketonok aránya - a magasabb α-tujon tartalom miatt - a levélben volt magasabb. Az éter és észter tartalomban nem látható jelentős különbség.

5. táblázat. Fehér virágú orvosi zsálya levél és virág illóolaj összetétele (mérés: GC-FID)

Komponensek	**Retenciós idő t_R (perc)**	***Salvia officinalis* illó komponenseinek százalékos megoszlása (%)**	
		levél	*virág*
α-tujén	5,38		0,2
α-pinén	5,74	0,1	1,1
kámfén	6,18	0,3	0,1
szabinén	6,46	0,4	0,5
β-pinén	6,63	1,4	6,3
β-mircén	7,06	0,2	0,2
β-cimol	7,29	0,7	0,4
limonén	7,58	0,7	0,2
eukaliptol	7,88	3,6	3,9
α-tujon	10,30	37,0	13,0
β-tujon	10,56	2,9	1,1
cis-szabinol	10,84	0,2	
kámfor	11,41	4,7	0,3
pinokámfon	11,60	1,3	0,3
izopinokámfon	11,48	0,3	0,1
borneol	12,32	1,0	6,0
bornil-acetát	12,77	0,4	0,2
mirtenil-acetát	12,84	0,5	0,1
α-kubebén	13,04		0,1
α-kopaén	14,13		0,1
β-kariofillén	**14,69**	**10,9**	**10,8**
α-humulén	**15,34**	**18,2**	**13,2**
γ-muurolén	15,43	1,8	0,4
(+)-ledén	15,66		1,2
δ- kadinén	16,19	0,2	0,1
ledol	**18,75**	**5,5**	**13,2**
kariofillén-oxid	18,97	1,2	0,7
viridiflorol	**26,19**	**3,8**	**10,0**
monoterpének		56,2	35,5
szeszkviterpének		41,8	50,0
szénhidrogének		35,5	36,1
oxigén tartalmú terpének		62,5	49,4
alkoholok		10,5	29,3
éterek		4,8	4,6
ketonok		46,4	15,3
észterek		0,9	0,2

5.1.5. *Salvia officinalis* díszváltozatok levél-illóolaj tartalmának és összetételének vizsgálata a virágzás során

Összehasonlítottuk a 2008-ban gyűjtött *Salvia officinalis* díszváltozatok levelének illóolaj tartalmát és összetételét virágzás elött (május), teljes virágzáskor (június) és virágzás után (szeptember) gyüjtött mintákban. Az összillóolaj tartalom változását a 6. táblázat foglalja össze. Várakozásainknak megfelelően legmagasabb illóolajtartalmat minden esetben teljes virágzáskor mértünk, virágzás elött és után az illóolaj tartalom minden esetben alacsonyabb volt.

6. táblázat. Zsálya díszváltozatok levél összillóolaj tartalmának változása virágzás során (2008. év mérései alapján)

Illóolajat szolgáltató taxonok:	**Összillóolaj tartalom** (ml/100g)		
	virágzás elött (2008 május)	teljes virágzáskor (2008 június)	virágzás után (2008 szeptember)
S. officinalis cv. *tricolor*	0,3	0,6	0,2
S. officinalis cv. purpurescens	0,4	0,7	0,4
S. officinalis cv. *Kew Gold*	0,4	1,5	1,3

Az illóolaj összetétel is jelentősen változott a virágzás stádiumaiban (7. táblázat). A monoterpének százalékos aránya, és ezen belül a neurotoxikus α-tujon tartalom egyedfejlődés alatt folyamatosan nőtt, legmagasabb virágzás után, szeptemberben volt. A szeszkviterpének aránya ennek megfelelően csökkent (kivéve a *purpurascens* mintát), de a fő komponens α-humulén aránya virágzáskor volt a legmagasabb.

A terpén szénhidrogének aránya virágzás elött és alatt nem változott jelentősen, ősszel viszont lecsökkent, az oxigén tartalmú terpének aránya ebből következően megnőtt. Ezen belül az alkoholok aránya nem mutatott egyértelmű változást, az étereké közel állandó volt (*Kew Gold*); a ketonoké virágzás után egyértelműen megnőtt, míg az észterarány ősszel csökkent.

7. táblázat. *Salvia officinalis* díszváltozatok levél illóolaj összetételének változása virágzás során

Komponensek	Retenciós idő t_R (perc)	Komponensek százalékos megoszlása (%)								
		cv. purpurescens			cv. *tricolor*			cv. *Kew Gold*		
		virágzás előtt	*virágzás alatt*	*virágzás után*	*virágzás előtt*	*virágzás alatt*	*virágzás után*	*virágzás előtt*	*virágzás alatt*	*virágzás után*
α-tujon	5,38	0,1		0,2	0,40	0,3	0,2	5,4	0,3	0,2
α-pinén	5,74	1,1	1,6	4,4	3,5	3,5	2,7	1,5	3,7	5,6
kámfén	6,18	1,2	2,1	0,4	4,5	4,7	4,1	0,5	4,7	8,0
szabinén	6,46	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	0,6	0,5	0,8	0,8
β-pinén	6,63	4,4	4,7	9,4	12,4	10,3	7,5	6,1	11,0	11,0
β-mircén	7,06	0,2		0,1	0,1		0,1	0,1	0,2	0,2
β-cimol	7,29	1,6	0,7	1,2	1,1	1,1	1,0	0,8	1,4	1,8
limonén	7,58	0,3		0,5	0,4	0,4	0,5	0,2	0,3	0,7
eukaliptol	7,88	1,9	0,7	0,8	0,6	0,8	1,2	0,7	2,1	1,4
trans-β-ocimén	8,18	0,7		0,4	0,1	0,2	0,8	0,1	0,2	0,3
γ-terpinén	8,29	0,3		0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2
terpinolén	9,26	0,1		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		0,2
β-terpinén	9,75	0,1		0,1	0,1	0,2	0,4			
α-tujon	**10,30**	**8,5**	**8,8**	**15,5**	**11,5**	**13,2**	**20,5**	**8,0**	**12,7**	**15,6**
β-thujon	10,56	1,6	1,7	3,1	1,4	2,2	3,4	1,0	1,7	2,2
cis-szabinol	10,84		2,9		0,1	0,1		0,1	0,1	0,0
kámfor	11,41	9,9	12,1	15,7	5,1	9,5	17,8	5,8	12,5	22,4
pinokámfon	11,60	1,6	1,2	2,1	2,1	1,8	2,5	0,9	1,3	0,2
izopinokámfon	11,48	0,2		0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,3	0,1
borneol	12,32	4,2	1,3	1,8	2,6	2,8	3,0	7,6	7,7	6,6
bornil-acetát	12,77	0,5	0,8	0,4	0,5	0,4	0,4	0,6	0,3	0,2
mirtenil-acetát	12,84	2,7	3,0	0,8	3,0	3,1	1,0	2,6	4,9	1,3
α-kubebén	13,04	0,8	0,5	0,4	0,5	0,4	0,3	0,9	0,4	0,3
α-kopaén	14,13	0,6	0,4	0,3	0,4	0,3	0,2	1,2	0,5	0,3
β-kariofillén	14,69	2,9	2,4	1,7	1,9	2,0	1,3	5,8	1,3	0,6
(+)-aromadendrén	14,81	2,1	1,0	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	3,5	2,0
α-humulén	**15,34**	**29,5**	**35,9**	**18,5**	**22,9**	**23,8**	**14,3**	**15,3**	**13,8**	**6,6**
γ-muurolén	15,43	1,5	1,6	0,9	1,5	1,0	0,6	2,6	1,4	0,9
(+)-ledén	15,66	2,4	1,6	0,6	0,8	0,2	0,3	3,0	2,0	0,9
δ- kadinén	16,19	3,5	3,2	1,8	2,6	2,2	1,3	4,1	2,2	1,2
palusztrol	18,00	0,6	0,7	0,5	0,8	0,1	0,5	1,3	0,6	0,5
ledol	18,75	2,9	5,3	3,6	5,5	2,9	3,2	1,7	0,7	0,7
kariofillén-oxid	18,97	0,5	0,7	1,5	2,0	0,5	0,6	1,3	0,8	1,2
viridiflorol	26,19	1,6	4,1	1,4	3,5	2,7	3,2	3,3	1,0	1,2
monoterpének		41,5	42,2	58,1	50,1	55,8	68,2	42,8	66,5	79,0
szeszkviterpének		48,8	57,6	31,7	42,7	36,4	25,9	40,7	28,3	16,5
szénhidrogének		53,6	56,4	42,2	54,0	51,7	36,4	42,8	47,8	41,4
oxigén tartalmú terpének		36,6	43,4	47,4	38,9	40,2	57,5	35,3	46,8	53,8
alkoholok		9,3	14,3	7,2	12,5	8,5	9,8	14,1	10,2	9,0
éterek		2,4	1,5	2,2	2,5	1,3	1,9	2,1	2,8	2,7
ketonok		21,7	23,9	36,7	20,3	26,9	44,5	16,0	28,6	40,6
észterek		3,2	3,7	1,2	3,5	3,5	1,3	3,2	5,2	1,6

5.1.6. In vitro mikroszaporítással előállított *Salvia africana-caerulea* levél illóolaj vizsgálata

A *Salvia africana-caerulea* növényt a Kirstenbosch National Botanical Garden (Dél-Afrikai Köztársaság) gyűjteményéből kaptuk, és hazai honosítás céljából a 4.1.1.1. fejezetben ismertetett in vitro körülmények között szaporítottuk, szabadföldbe kiültetve életképes növényeket neveltünk. Összehasonlítottuk az eredeti gyűjtött növény (intakt), a lombikban laboratóriumi körülmények között nevelt (in vitro kultúrák), és a szabadföldbe kiültetett növények levelének illóolaj tartalmát és összetételét.

Az eredeti gyűjtött növény *illóolaj produkcióját* nem sikerült elérni az in vitro mikroszaporítással előállított növényekben. Az in vitro kultúrák illóolaj tartalma sokkal alacsonyabb volt, a szabadföldbe kiültetett növény is csak az eredeti illóolaj tartalom egyharmadát közelítette meg (8. táblázat).

8. táblázat. *Salvia africana-caerulea* levél összillóolaj tartalma

Illóolajat szolgáltató minták	**Összillóolaj tartalom** (ml/100g)
Intakt növények	1,6
In vitro kultúrák	0,1
Kiültetett növények	0,5

Az *illóolaj összetétel* nem változott jelentősen a laboratóriumi szaporítás alatt (9. táblázat). Minden levélmintában a szeszkviterpén szénhidrogének voltak legnagyobb arányban. A monoterpének aránya a laboratóriumi és a kiültetet növények illóolajában alacsony, 12% körül volt, mintegy fele az intakt növényéhez képest. Az oxigenált terpének közül mindhárom mintában ketonokat, ezen belül piperitont találtunk legnagyobb mennyiségben. A gyűjtött levél 3,2% α-pinént tartalmazott, ami a laboratóriumi és a kiültetett növények levelében nem volt kimutatható. A szeszkviterpének közül a β-kariofillén és a γ-elemén magasabb aránya volt jellemző, a szabadföldbe ültetett növények illóolajában ezek voltak a fő komponensek. A gyűjtött levélben magas, 11,5% γ-kadinén tartalmat mértünk, a laboratóriumi mintában 1% alatti mennyiségben, a kiültetett növényekben 7,3%-ban volt csak kimutatható.

9. táblázat. *Salvia africana-caerulea* intakt és in vitro tenyésztett levélminták illóolaj összetétele.

Komponensek	**Retenciós idő t_R (perc)**	**Komponensek százalékos aránya %**		
		Intakt növények	In vitro kultúrák	Kiültetett növények
α-pinén	4,97	3,3		
kámfén	5,40	0,2		
szabinén	5,60	0,1		
β-pinén	7,43	0,8	0,1	
α-fellandrén	7,71	0,8	0,2	0,2
β-fellandrén	9,52	0,7		0,5
eukaliptol	10,64	0,7	0,8	
2-ciklohexen-1-ol	11,20	1,7	1,1	1,2
δ-terpinén			1,1	
piperiton	**13,49**	**11,4**	**8,8**	**9,3**
bornil-acetát	13,71	0,4	0,3	0,3
mirtenil-acetát	13,85	0,4	0,4	0,7
β-kariofillén	**14,54**	**8,4**	**7,7**	**14,6**
(+)aromadendrén	14,76	2,2	0,9	1,1
(+)muurolén	15,22	2,5	2,1	1,8
germakrénD	15,68	3,7	5,8	7,3
γ-elemén	**15,90**	**12,3**	**19,0**	**24,0**
γ-kadinén	16,05	11,6	0,7	7,3
δ-kadinén	16,35	6,4	1,2	8,3
germakrénD-4-ol	18,18	4,9	3,6	
spatulenol	18,51	6,4	11,8	6,3
kariofillén-oxid	19,23	1,7	1,7	5,2
δ-kadinol	19,27	0,8	2,1	2,0
α-kadinol	19,56	1,7		1,2
monoterpének		20,4	12,9	12,2
szeszkviterpének		62,6	56,6	79,1
szénhidrogének		52,9	38,9	65,0
oxigén tartalmú terpének		14,6	11,4	11,5
alkoholok		1,7	1,1	1,2
éterek		0,7	0,8	
ketonok		11,4	8,8	9,3
észterek		0,8	0,7	1,0

5.1.7. Kivonási módszerek hatása az illó komponensek összetételére

Az illó komponensek eredeti arányának meghatározása nehéz feladatot jelent, mivel az extrakciós módszer és a detektálás módja is befolyásolhatja az összetételt.

Az illóolaj vízgőzdesztillációjakor a magas hőmérséklet és a vizes közeg hatására egyes komponensek (pl. észterek, éterek) hidrolizálhatnak, és egyéb szerkezeti átalakulások is elképzelhetők, viszont kevésbé illékony komponensek is kinyerhetők. A desztillált illóolaj összetétele valójában nem egyezik meg a növényben található, vagy a „levegőben érezhető" illat összetevőkkel, ugyanakkor a gyakorlatban mégis a vízgőzdesztillációs technika a legelterjedtebben alkalmazott extrakciós módszer, minthogy nemcsak analítikai, hanem illóolaj előállításra is alkalmazható.

A növények illatát legjobban megközelítő illóolaj összetételt szilárdfázisú mikroextrakcióval (SPME) határozhatjuk meg (An és mtsai. 2001). A kivonás során 60˚C-on 5 perces inkubálás alatt gyűjtöttük az illóolajat. A kivonás vízmentes, és a hőmérséklet is alacsonyabb a vízgőzdesztillációhoz képest, ezért a komponensek nem bomlanak, vagy alakulnak át, viszont az illékonyabb komponensek aránya megnő, a kevésbé illékony komponensekéhez képest. Az SPME kivonásra általunk alkalmazott szálon a 65 μm PDMS/DVB adszorbens réteg (Deng és mtsai. 2003) közepes vastagságú, a minor és major komponensek, valamint a mono és szeszkviterpének kivonására egyaránt alkalmas, így az illó komponensek arányát nem befolyásolja jelentősen (Kim és Lee, 2002).

A vízgőzdesztillátum és a SPME illó komponenseinek terpéncsoportok szerinti megoszlását a 10. táblázat, részletes összetételét a 11-12. táblázat mutatja. Az összehasonlításhoz mindkét esetben GC-MS módszert alkalmaztunk, így a százalékos kiértékelés total ion kromatogramok (TIC) alapján történt.

Az értékelés során megállapítotttuk, hogy a kisebb molekulatömegű, tehát illékonyabb monoterpének magasabb aránya az SPME kivonatokra volt jellemző, a szeszkviterpének a vízgőzdesztillátumban voltak nagyobb részben. Oxigén tartalmú terpéneket minden esetben a vízgőzdesztillátumban találtunk nagyobb arányban, a szénhidrogénekhez képest; legnagyobb különbséget a vártnak megfelelően az alkoholok esetében tapasztaltunk. Éterek a SPME kivonatokban általában magasabb arányban voltak jelen,

feltételezhetően a vízgőzdesztilláció során egy részük alkoholra bomlott. A ketonok és észterek arányára vonatkozóan nem volt levonható egyértelmű következtetés.

10. táblázat. Vízgőzdesztillációval (VGD) ill. szilárd fázisú mikroextrakcióval (SPME) nyert zsálya illókomponensek megoszlása terpén váz és funkciós csoportok szerint (Mérés: GC-MS)

Vegyület csoportok	Kivonás módja	*Vegyületcsoportok aránya (%)*							
		Salvia officinalis (fehér)	*Salvia officinalis* (lila)	*S off* cv, *purpurascens*	*S off* cv, *tricolor*	*S off* cv, *Kew Gold*	*Salvia judaica*	*Salvia africana-caerulea*	*Salvia mexicana*
Terpénváz szerint									
monoterpének	VGD	71,3	61,7	42,7	48,3	55,3		12,2	9,3
	SPME	72,2	62,0	54,3	78,4	66,8		40,4	2,2
szeszkviterpének	VGD	27,4	37,6	51,1	50,4	44,3	95,3	70,9	87,2
	SPME	27,5	31,8	39,1	20,0	30,0		51,7	96,4
Funkciós csoportok szerint									
szénhidrogének	VGD	30,3	48,4	48,3	56,0	50,0	31,4	42,3	82,8
	SPME	36,1	52,7	61,7	52,8	54,0		67,8	97,1
oxigén tartalmú terpének	VGD	68,4	50,8	45,4	42,7	49,7	63,9	40,9	13,7
	SPME	63,5	41,1	31,6	45,6	42,8		24,3	1,5
alkoholok	VGD	68,4	50,8	45,4	42,7	49,7	63,9	40,9	13,7
	SPME	3,7	5,9	3,0	1,8	5,1		8,1	
éterek	VGD	7,1	12,8	2,9	2,9	3,2	1,6	1,8	7,6
	SPME	17,6	22,3	2,4	4,0	4,1		2,5	1,5
aldehidek	VGD								0,5
ketonok	VGD	54,2	28,1	22,0	31,2	30,9		9,7	
	SPME	40,8	12,3	23,4	36,1	32,2		12,7	
észterek	VGD	0,5	2,1	2,8	6,2	8,7			
	SPME	1,4	0,6	2,7	3,7	1,4		0,9	

11.táblázat. Zsálya vízgőzdesztillált illóolajok összetétele GC-MS mérés alapján

Komponensek	Retenciós idő t_R (perc)	*Vízgőzdesztillált illóolaj komponensek százalékos megoszlása (%)*							
		Salvia officinalis (fehér)	*Salvia officinalis* (lila)	*S off* cv. *purpurascens*	*S off* cv, *tricolor*	*S off* cv, *Kew Gold*	*Salvia judaica*	*Salvia africana-caerulea*	*Salvia mexicana*
α-tujén	4,76		0,4						
α-pinén	4,91	1,2	2,1	3,0	4,6	1,2			1,0
kámfén	5,21	1,6	2,9	2,4	0,9	1,9			
β-pinén	5,68	0,9	10,0	5,6	3,3	4,6			1,9
β-mircén	5,78	0,4							
β-cimén	6,46		0,6						
limonén	6,56	1,4			0,9	1,2			0,4
linalool	9,90								0,9
eukaliptol	6,64	6,6	12,8	1,5	1,1	2,1			3,7
γ-terpinén	7,07	0,3							
trans-pinokarveol	7,56								0,8
terpinolén	7,58	0,4							
α-tujon	**8,03**	**33,9**	**14,9**	**9,0**	**13,1**	**13,3**			
β-tujon	8,20	2,8	4,9	2,0	2,9	2,3			
cis-szabinol	8,23		1,9						
2-ciklohexen-1-ol	8,26							2,0	
kámfor	8,78	16,9	7,8	9,5	12,7	13,9			
pinokámfon	9,01	0,5	0,4	1,4	2,5	1,4			
izopinokámfon	9,04	0,2							
mirtenál	9,06								0,
borneol	9,23	3,8	0,7	5,4		4,7		0,5	
piperiton	10,34							9,7	
bornil-acetát	11,17	0,4	1,3	2,8	6,2	8,7			
mirtenil-acetát	11,67	0,1	0,9						
α-kubebén	12,21		1,3						0,4
izoledén	14,60								15,0
β-farnezén	14,73					1,1			2,9
α-kopaén	12,76		1,7	1,1	0,8	0,8			
β-kariofillén	**13,52**	**7,3**	**4,8**	**4,0**	**4,4**	**2,7**	**11,1**	**7,6**	**15,6**
(+)aromadendrén	13,82	0,2		2,1	0,9	5,4		0,6	
germakrén-D	14,07							4,4	
α-humulén	**14,10**	**16,5**	**12,0**	**20,3**	**31,3**	**18,4**	**7,6**		
γ-muurolén	14,34	0,2	4,7	4,3	2,9	2,8		1,3	1,4
γ-elemén	14,35		3,5		1,1			15,0	6,3
γ-kadinén	14,42			1,3		1,1		6,4	2,7
δ- kadinén	14,67		3,3	4,1	3,8	3,7	1,9	6,9	13,0
δ-kadinol	15,44							3,6	
germakrénD-4-ol	15,55		1,4					13,4	
palustrol	15,58					1,5			
ledol	15,59	0,2		3,8			41,9		
spatulenol	15,60							6,1	3,9
kariofillén-oxid	15,91	0,5		1,4	1,8	1,1	1,6	1,8	3,9
(+)-ledén	16,24					4,9			
kalamenén	16,45								5,5
α-kadinol	16,65							3,7	
β-kubebén	15,66		1,1		1,0		10,9		16,6
palmitinsav	17,97						2,6		
viridiflorol	18,11	2,4	3,8	2,7	2,4	0,8	20,4		
epimanool	18,17			5,8					

12.táblázat. Zsálya SPME kivonatok illókomponenseinek összetétele GC-MS mérés alapján

Komponensek	Retenciós idő t_R (perc)	*SPME kivonatok komponenseinek százalékos megoszlása (%)*						
		Salvia officinalis (fehér)	*Salvia officinalis* (lila)	*S off* cv. *purpurascens*	*S off* cv. *tricolor*	*S off* cv. *Kew Gold*	*Salvia africana-caerulea*	*Salvia mexicana*
α-tujén	4,76		0,3		0,6			
α-pinén	4,91	1,1	4,9	3,0	4,9	3,9	1,4	0,7
kámfén	5,21	1,0	5,1	3,7	5,9	5,2		
szabinén	5,61			0,6	0,4	0,4	0,3	
β-pinén	5,68	2,4	6,8	9,3	15,3	10,5	10,7	
β-mircén	5,78	1,7	0,9	0,9	1,4	1,1		
β-cimén	6,46		0,2		0,5	0,7		
limonén	6,56	1,4	1,7	2,0	2,6	1,9		1,5
eucaliptol	6,64	17,6	22,3	2,5	4,0	4,1	1,9	
trans-β-ocimén	6,80		0,8	2,7		0,4		
γ-terpinén	7,07	0,6	0,3		0,7			
terpinolén	7,58	0,5		0,5	0,5			
α-tujon	**8,03**	**30,8**	**4,4**	**10,1**	**16,3**	**14,7**		
β-tujon	8,20	4,2		2,3	3,8	2,5		
2-ciklohexen-1-ol	8,26						1,7	
kámfor	8,78	5,0	8,0	9,5	13,6	14,0		
β-fellandrén	8,82						10,0	
pinokámfon	9,01	0,8		1,6	2,4	1,0		
borneol	9,23	3,7	5,9	3,0	1,8	5,1	0,9	
piperiton	10,34						12,7	
bornil-acetát	11,17	1,4	0,6	2,7	3,7	1,4	0,9	
α-kubebén	12,21		0,6	0,8		0,6		0,5
α-kopaén	12,76		1,8	1,7	0,6	1,2		
β-kariofillén	**13,52**	**11,2**	**10,6**	**3,7**	**1,9**	**1,7**	**13,5**	**34,7**
(+)aromadendrén	13,82		1,0	1,9	0,4	7,8	0,9	
α/β-burbonén	13,83							0,3
germakrén-D	14,07						5,9	
α-humulén	**14,10**	**15,3**	**14,4**	**26,5**	**15,4**	**12,8**		
γ-muurolén	14,34		2,4	2,6	0,9	2,3	0,7	
γ-elemén	14,35						17,3	7,9
γ-kadinén	14,42						3,1	2,0
izoledén	14,60							15,0
δ- kadinén	14,67			0,8	0,8	1,9	4,0	13,5
β-farnezén	14,73							1,2
germakrénD-4-ol	15,55						4,5	
spatulenol	15,60						1,1	
β-kubebén	15,66							17,8
(+)-ledén	16,24	1,0	1,1	1,2		1,8		
kalamenén	16,45							2,0
kariofillén-oxid	17,08						0,6	1,5

5.1.8. *Salvia* taxonok molekuláris- és kemotaxonómiai vizsgálata

5.1.8.1. RAPD markerek és az illókomponensek százalékos megoszlása alapján végzett taxonómiai vizsgálatok összehasonlítása

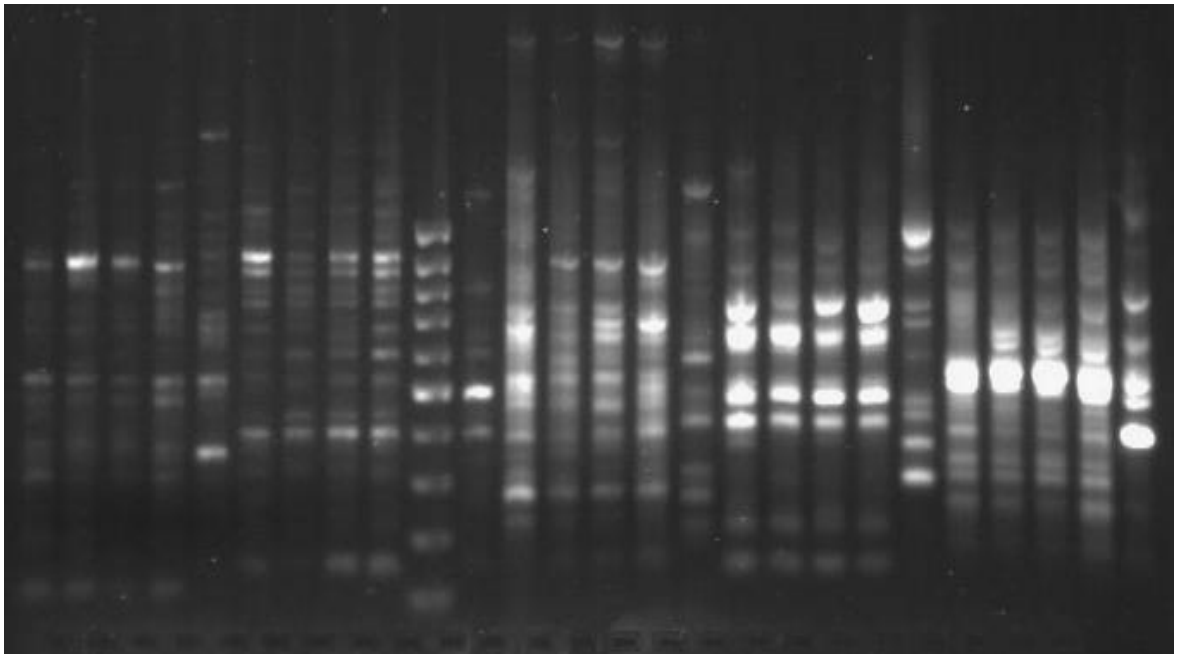
Az illóolaj tartalom és összetétel környezeti és genetikai tényezőktől egyaránt függ. A DNS alapú molekuláris markereket használták fajtaazonosításra, illetve a taxonok közti genetikai rokonság meghatározására. Az illóolaj összetétel és genetikai profil alapján felállított mintázat a kémiai tulajdonságok genetikai meghatározottságára utal, ezért tanulmányoztuk a termesztett díszzsálya taxonok genetikai és a kémiai variabilitását.

A DNS klaszter analízis folyamán 62 A, B, N, O oligonukleotid primerrel 311 RAPD sávot kaptunk 150 és 1500 bp között. A felszaporított termékek primerenként 2 (OPB-16) és 15 (OPB-12) között változott. A sávmintázatra példát láthatunk az 27. ábrán. A polimorf sávok száma az intenzitástól függetlenül 0 – 12 közt változik a primerek közt. A júdeai zsályát is beleértve a sávok 83,6%-a volt polimorf. Ha csak az orvosi zsályát és változatait nézzük, a sávok 57,2%-a volt polimorf.

A genetikai és illóolaj összetétel alapján számított hierarhikus klaszter analízis jellemzésére dendrogramokat szerkesztettünk, ami lehetővé tette a rokonság számszerű jellemzését. Az 28. ábrán látható, hogy a júdeai zsálya (külső faj) különvált az orvosi zsályától és termesztett változataitól (a genetikai távolság: 69.54 %). A *S. officinalis* taxonok szintén két klasztert alkotnak: az elsőbe a *S. officinalis*, a másodikba a termesztett változatok kerültek, a legközelebbi rokonság a '*Purpurascens*' és '*Tricolor*' változatok között volt kimutatható (30.14 %), míg a '*Kew Gold*' változat 36.75 % genetikai távolságot mutatott.

A RAPD fragmentumokon és az illóolaj összetételen alapuló klaszter analízis azonos eredményt adtak, ez a kémiai profil és a genetikai készlet erős kapcsolatára utal, bár további tanulmányokra lenne szükség az aktuális kapcsolat bizonyítására az illóolaj komponensek és a specifikus gének között.

.

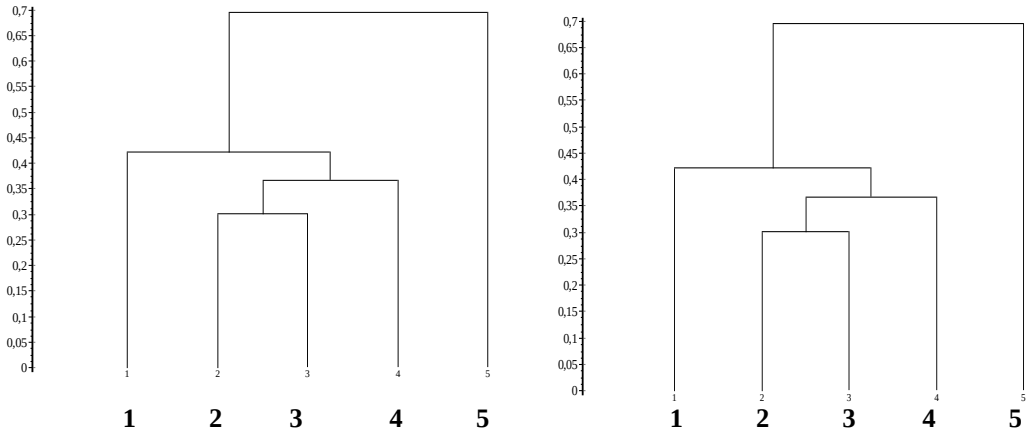


1 2 3 4 5 1 2 3 4 M 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5

OPB-02 OPB-03 OPB-04 OPB-05 OPB-06

27. ábra. Zsálya taxonok RAPD mintázata

1. Salvia officinalis, 2. *S. officinalis* cv. purpurascens, 3. *S. officinalis* cv. tricolor, 4. *S. officinalis* cv. Kew Gold, 5. *Salvia judaica* M: marker (100 bp DNA Ladder Plus**)**



RAPD mintázat alapján számított dendrogram *Illóolaj összetétel* alapján számított dendrogram

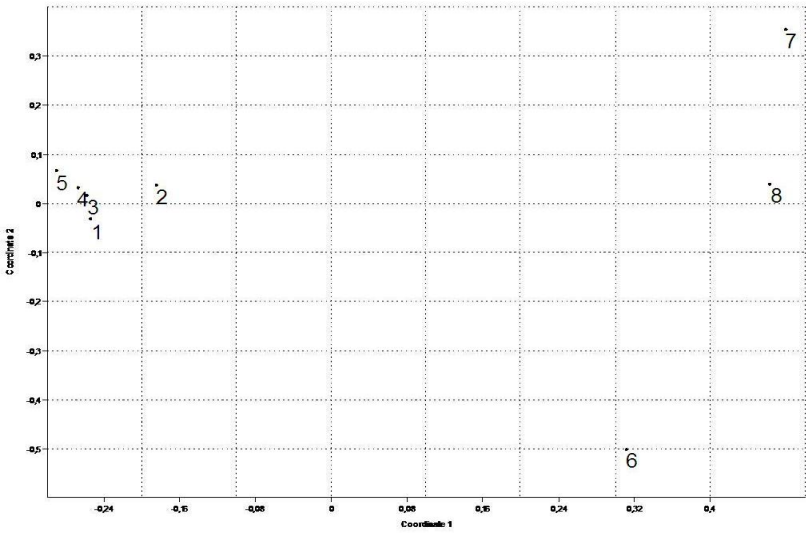
28. ábra. Zsálya taxonok RAPD mintázat és illóolaj összetétel alapján számított dendrogramja

1. Salvia officinalis (fehér virágú) 2. S. officinalis cv. purpurascens 3. *S. officinalis* cv. tricolor 4. *S. officinalis* cv. Kew Gold 5. *Salvia judaica*

5.1.8.2. PCA analízis az illóolaj összetétel (kvalitatív és kvantitatív) alapján

Az előző fejezetben ismertetett taxonómiai vizsgálatot kiterjesztettük mindegyik általunk vizsgált taxonra. A nagyobb számú taxon rokonsági kapcsolatainak ábrázolására PCA (Principal Component Analysis) vizsgálatot végeztük. Az ábrázolás előnye az előző fejezetben bemutatott dendrogram ábrázolással szemben az, hogy vektorok segítségével koordináta rendszerben két dimenzióban tudtuk ábrázolni a rokonsági kapcsolatokat, ami pontosabban mutatja az öszefüggések szerkezetét, viszont számszerű jellemzésre nem alkalmas. A vizsgálatot elvégeztük a vízgőzdesztillátum és a SPME minták összetétele alapján is, a két módszer azonos eredményhez vezetett, ezért csak a desztillált illóolaj FID mérésének eredményeit mutatjuk be.

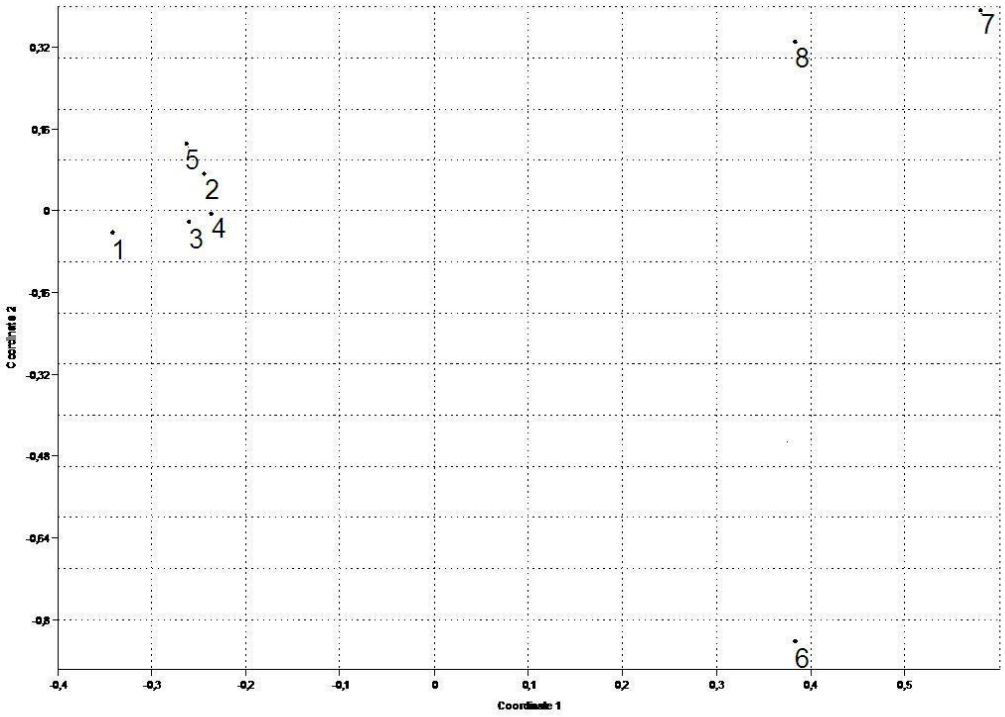
A Jaccard index alapján végzett vizsgálat az azonosított komonensek bináris jelenlétét veszi alapul, az illóolaj összetétel kvalitatív vizsgálatán alapul. A 29. ábrán látható, hogy a *Salvia officinális* minták egy csoportot alkottak, a többi zsályafaj (6,7,8,) elkülönült, ezek közül a legközelebbi rokonságot a *S. mexicana* (8) és a *S. africana-caerulea* (7) illóolaj komponensei mutatnak. A *S. officinalis* minták közül a termesztett változatok (3,4,5), ezen belül a *purpurascens* és *tricolor* minták (3,4) mutatták a legközelebbi rokonságot, a lila virágú minta (2) különült el legjobban. A fehér virágú (1) változat a *purpurascens* változathoz (3) állt legközelebb.



29. ábra. Zsálya taxonok PCA analízise Jaccard index alapján

1. *Salvia officinalis* (fehér viragú) 2. *Salvia officinalis* (lila viragú) 3. *S. officinalis* cv. *purpurascens* 4. *S. officinalis* cv. *tricolor* 5. *S. officinalis* cv. *Kew Gold* 6. *Salvia judaica* 7. *Salvia africana-caerulea* 8. *Salvia mexicana*

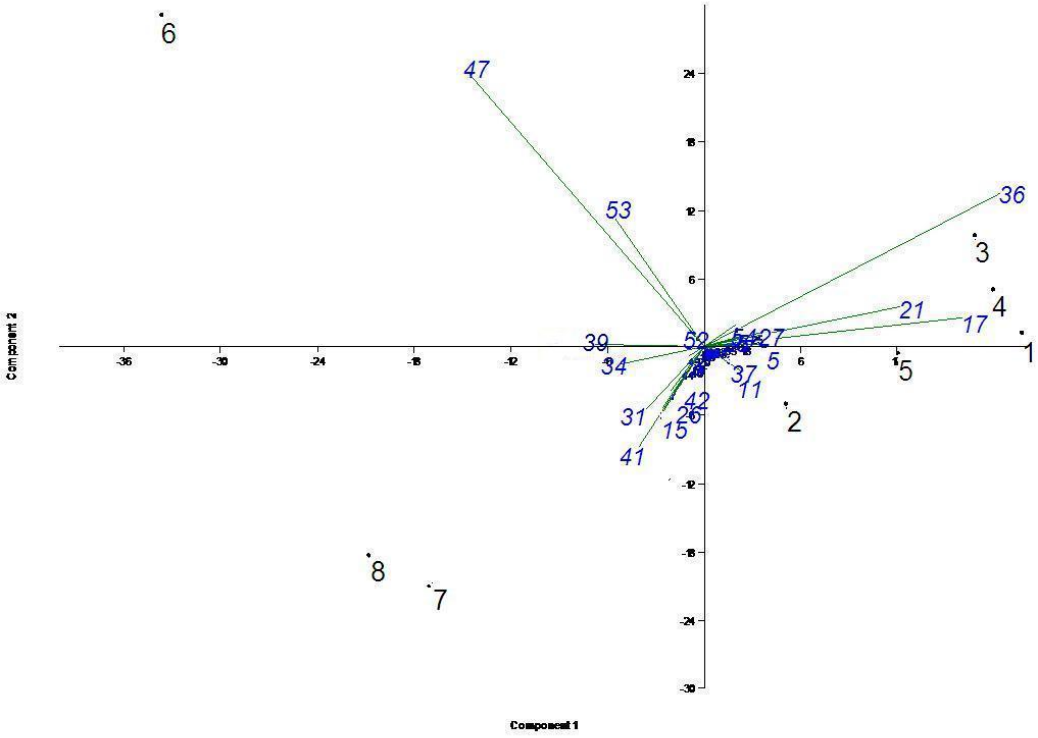
A Bray-Curtis koefficiens alapján végzett vizsgálat a komponensek százalékos eloszlását is figyelembe veszi (kvantitatív analízis), ezért pontosabb eredményt mutat (30. ábra) A lila virágú *S. officinalis* (2) a termesztett változatok (3,4,5) között foglal helyet, mivel a termesztett változatok is lila virágúak, ugyanakkor közelebbi rokonságot mutat a *purpurascens* és *tricolor* változatokhoz (3,4), mint a *Kew Gold* (5) minta. A külső fajok közül az afrikai (7) és a mexikói zsálya (8) közelebbi rokonságot mutatott a *S. officinalis* mintákhoz, mint a *S. judaica* (6).



30. ábra. Zsálya taxonok PCA analízise Bray-Curtis koefficiens alapján
1. *Salvia officinalis* (fehér viragú) 2. *Salvia officinalis* (lila viragú) 3. *S. officinalis* cv. *purpurascens* 4. *S. officinalis* cv. *tricolor* 5. *S. officinalis* cv. *Kew Gold* 6. *Salvia judaica* 7. *Salvia africana-caerulea* 8. *Salvia mexicana*

A rokonság vizsgálatot biplot analízissel kiegészítettük, ami a genetikai különbségekért felelős komponenseket is ábrázolja. Az 31. ábrán az 29. és 30. ábrához viszonyítva az ábrázolás különbségét az okozza, hogy a mintákat és a komponenseket 3 dimenzióban helyeztük el, és az így kapott térbeli távolságokat ábrázoltuk 2 dimenzióban. A rokonsági kapcsolatok hasonlóak voltak az korábban ismertetettekhez. Látható, hogy a júdeai zsálya (6) elkülönüléséért leginkább a ledol (47) és a viridiflorol (53) felelős, az afrikai és a mexikói zsálya (7,8) távolságát több komponens: β-kariofillén (34), izoledén

(31), γ-elemén (41), terpinolén (15), piperiton (26) és γ-kadinén (42) együttes jelenléte okozza. A *S. officinalis* változatokon belül a fehér virágú zsálya (1) távolságát egyértelműen az α-tujon (17), a lila virágú változat távolságát az eukaliptol (11) és kisebb mértékben a γ-muurolén (37) okozza. A díszváltozatok (3,4,5) különbözőségéért az α-humulén (36), kámfor (21) és az α-tujon (17) komponensek felelősek leginkább.



5. β-pinén
11. eukaliptol
15. terpinolén
17. α-tujon
21. kámfor
26. piperiton
27. bornil-acetát
31. izoledén
34. β-kariofillén
36. α-humulén
37. γ-muurolén
39. β-kubebén
41. γ-elemén
42. γ-kadinén
47. ledol
52. palmitinsav
53. viridiflorol
54. epimanool

31. ábra. Zsálya taxonok biplot analízise

Fekete színnel a vizsgált mintákat ábrázoltuk: 1. *Salvia officinalis* (fehér virágú) 2. *Salvia officinalis* (lila virágú) 3. *S. officinalis* cv. *purpurascens* 4. *S. officinalis* cv. *tricolor* 5. *S. officinalis* cv. *Kew Gold* 6. *Salvia judaica* 7. *Salvia africana-caerulea* 8. *Salvia Mexicana.* A kék színű számok a komponenseket jelölik.

5.2. *Lavandula* fajok vizsgálati eredményei

5.2.1. Lavandulae flos összillóolaj tartalma

Négy különböző helyen gyűjtött *Lavandula vera 1-4*, valamint további 4 *Lavandula* taxon: *L. vera* ssp. *pyrenaica, L.intermedia, L. stoechas* ssp. *stoechas* és *L. dentata* virág vízgőzdesztillációval előállított összillóolaj tartalmát hasonlítottuk össze. A vizsgálatokat két egymás utáni évben (2008 és 2009) gyűjtött növényanyagból végeztük el (13. táblázat). Általánosan megállapíthatjuk, hogy a 2008-as minták illóolaj tartalma magasabb volt, mint a 2009-es mintáké. Legmagasabb illóolaj tartalma az irodalmi adatoknak megfelelően (List és Hörhammer 1976., Boros 1968.) a *L. intermedia* virágának volt (4 ml/100g). A *L. vera* virág minták illóolaj tartalma alacsonyabb (1,3 - 3,3 ml/100g) volt, de mindegyik minta illóolaj tartalma meghaladta a Ph.Hg.VIII.-ban előírt határértéket (13 ml/kg). A *L. stoechas* illóolaja alacsonyabb volt (0,8-0,9%), a *L. dentata* virága csak nyomokban tatalmazott illóolajat.

13. táblázat. Levendula virág illóolaj tartalma

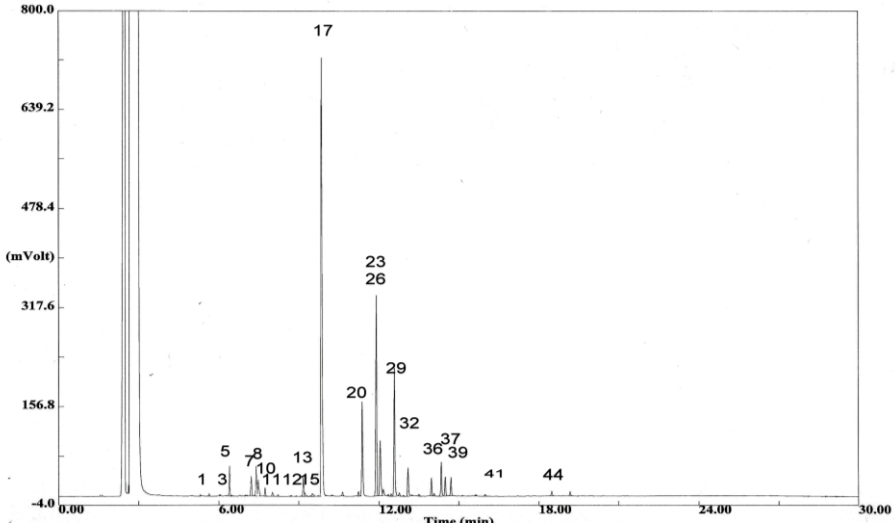
Illóolajat szolgáltató taxonok	**Illóolaj tartalom** (ml/100g)	
	2008	**2009**
Lavandula vera-1	3,3	3,3
Lavandula vera-2	3,0	2,8
Lavandula vera-3	1,8	1,3
Lavandula vera-4	3,7	2,7
Lavandula vera ssp. *pyrenaica*	3,3	2,7
Lavandula intermedia	4,0	4,0
Lavandula stoechas	0,8	0,9
Lavandula dentata	-	<0,1

5.3.2. *Lavandula* virág illóolajok kvalitatív vizsgálata

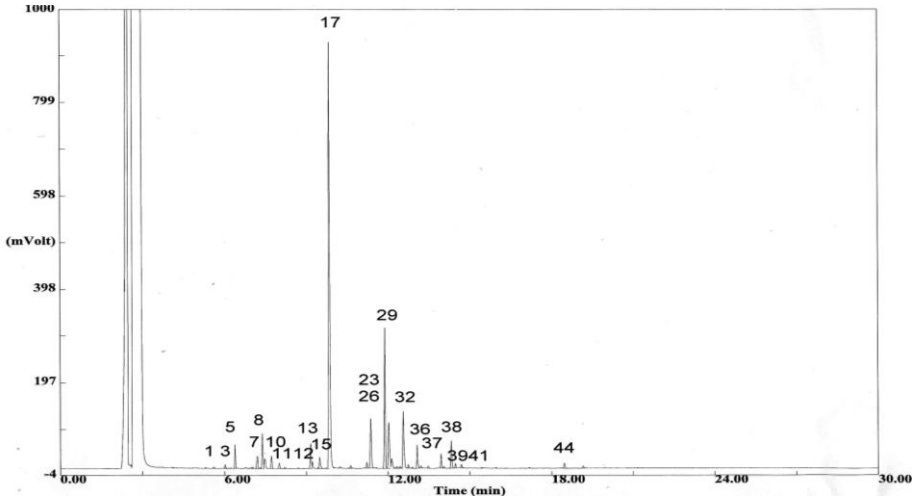
A különböző levendulavirág illóolajokban 46 komponenst azonosítottunk tömegspektrumuk, irodalmi adatok és standard addíció alapján. A FID mérésekben problémát okozott, hogy az általunk alkalmazott körülmények között a kámfor és a terpinén-4-ol nem vált el, a két komponens retenciós idejének egybeesését standard addícióval is igazoltuk.

A *Lavandula vera* és *L. intermedia* virágok illóolajának fő komponense a linalool volt (32-37. ábra.) ez alól kivételt képezett a *Lavandula vera-3*, aminek fő komponense a lavandulil-acetát volt. További fontosabb komponensek a linalil-acetát, a kámfor és terpinén-4-ol, és a *L. intermedia* esetében az eukaliptol volt. A *Lavandula stoechas* virág illóolaj fő komponense a fenkon, és észtere a fenkil-acetát volt (38. ábra). A *L. dentata* virág és levél olaj legjelentősebb komponense az eukaliptol, de a linalool is jellemző alkotója; a virágban ezen kívül α-bizabolol, a levélben β-pinén is előfordult nagyobb mennyiségben (39-40. ábra). A fontosabb azonosított komponensek tömegspektrumait a 41. ábra mutatja.

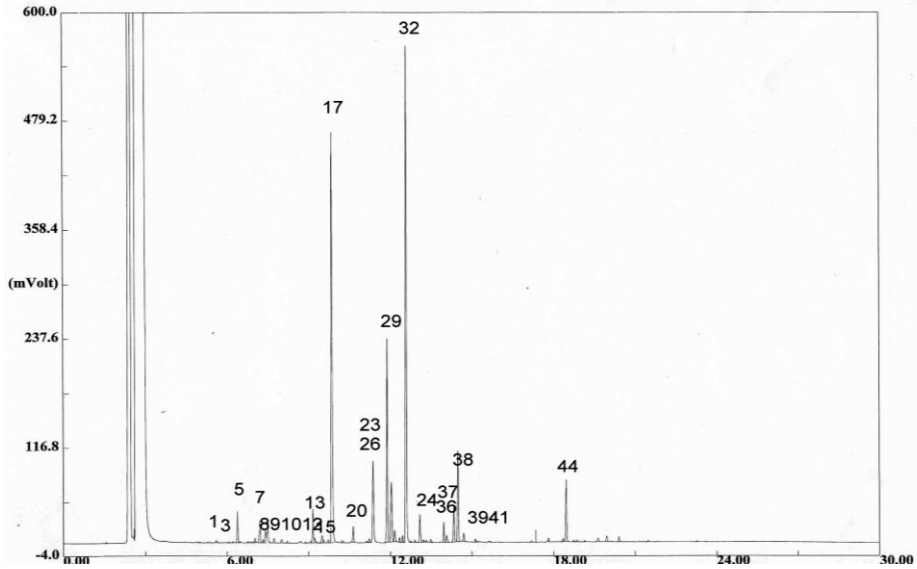
Az általunk alkalmazott Rt-βDEXm sztereospecifikus kolonna a fő komponensek (linalool és linalil-acetát) enantiomer párjainak elválasztására nem volt alkalmas. Elválást csak a limonén enantiomerek esetében tapasztaltunk; a rezolúció azonban nem érte el az ideális 2-es értéket, hasonlóan Tabacchi (1997) és Larkov (2008) által leírt limonén enantiomerek szeparációjához.



32. ábra. ***Lavandula vera-1*** **virág illóóolaj GC-FID kromatogramja**

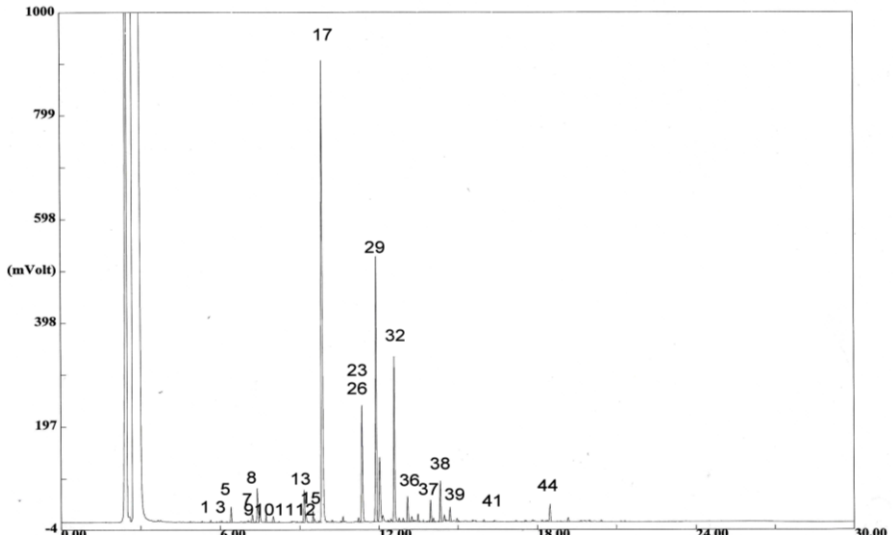


33. ábra. ***Lavandula vera-2*** **virág illóóolaj GC-FID kromatogramja**

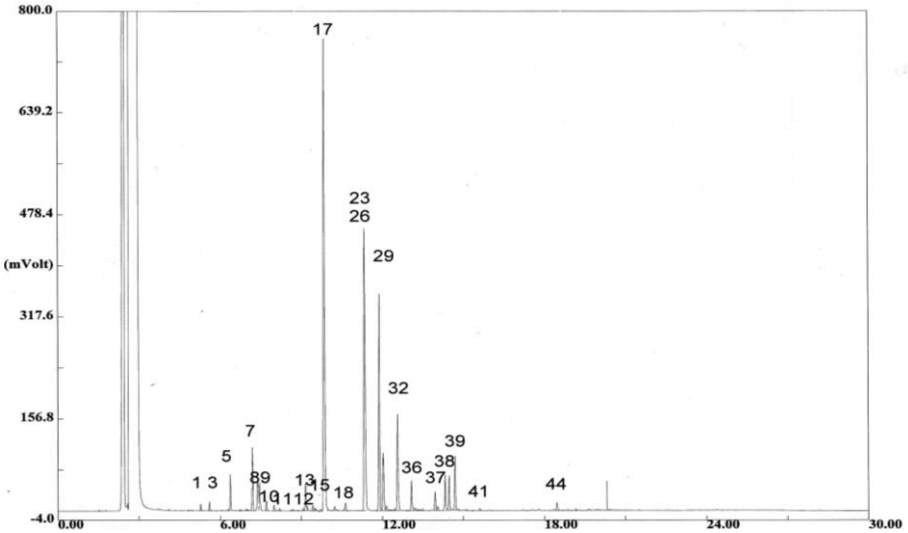


34. ábra. ***Lavandula vera-3*** **virág illóóolaj GC-FID kromatogramja**

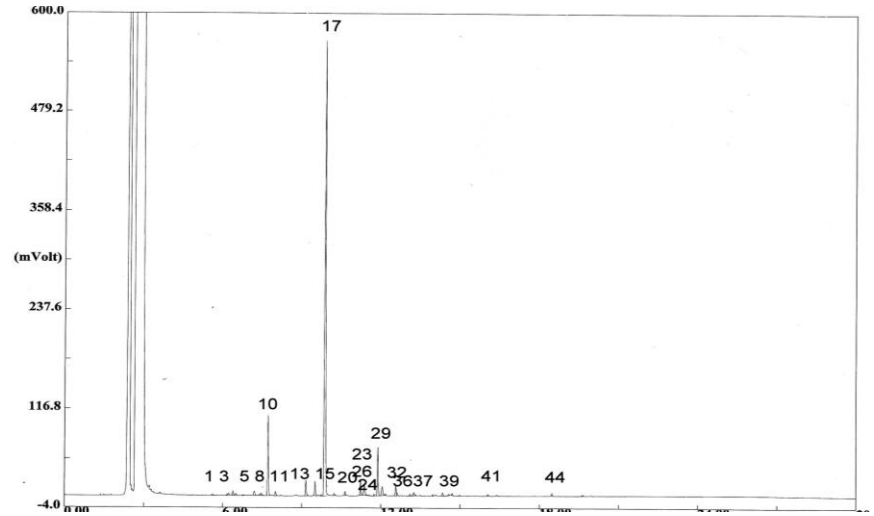
1. α-pinén
2. 3-oktanon
3. kámfén
4. szabinén
5. β-pinén
6. β-mircén
7. m-cimol
8. S-limonén
9. R-limonén
10. eukaliptol
11. trans- β-ocimén
12. cis- β-ocimén
13. trans-linalool-oxid
14. kamfenol
15. cis-linalool-oxid
16. l-fenkon
17. **linalool**
18. 1-oktenil-acetát
19. fenkol
20. n-hexil-butirát
21. transz-pinokarveol
22. verbenol
23. **kámfor**
24. lavandulol
25. borneol
26. **terpinen-4-ol**
27. α-terpineol
28. fenkil-acetát
29. **linalil-acetát**
30. pinen-3-on
31. nerol
32. lavandulil-acetét
33. bornil-acetát
34. mirtenil-acetát
35. limonén-epoxid
36. neril-acetát
37. geranil-acetát
38. szantalén
39. β-kariofillén
40. α-bergamotén
41. β-farnezén
42. β-kubebén
43. γ-muurolén
44. kariofillén-oxid



35. ábra. ***Lavandula vera-4*** **virág illóóolaj GC-FID kromatogramja**

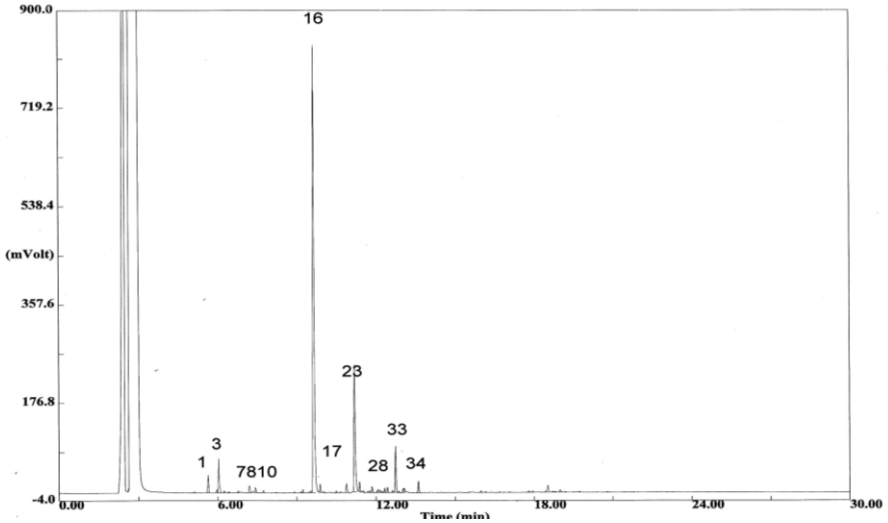


36. ábra. ***Lavandula vera*** **ssp.** ***pyrenaica*** **virág illóóolaj GC-FID kromatogramja**

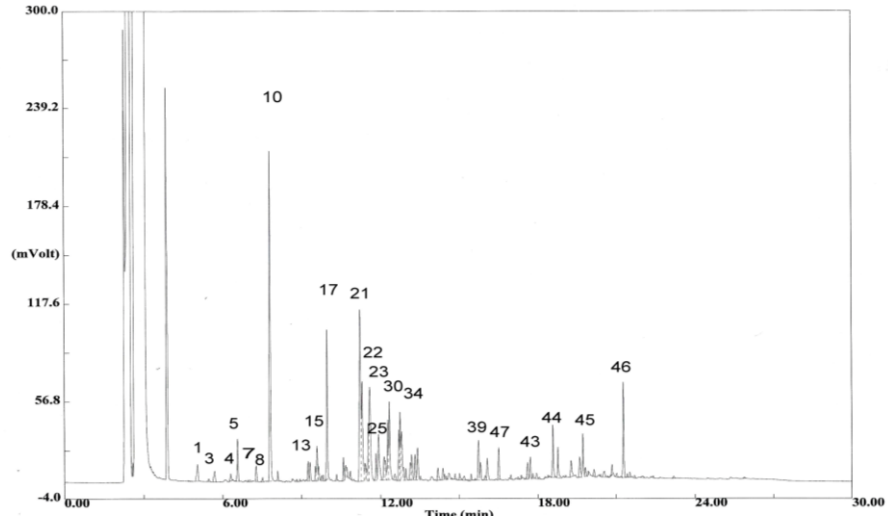


37. ábra. ***Lavandula intermedia*** **virág illóóolaj GC-FID kromatogramja**

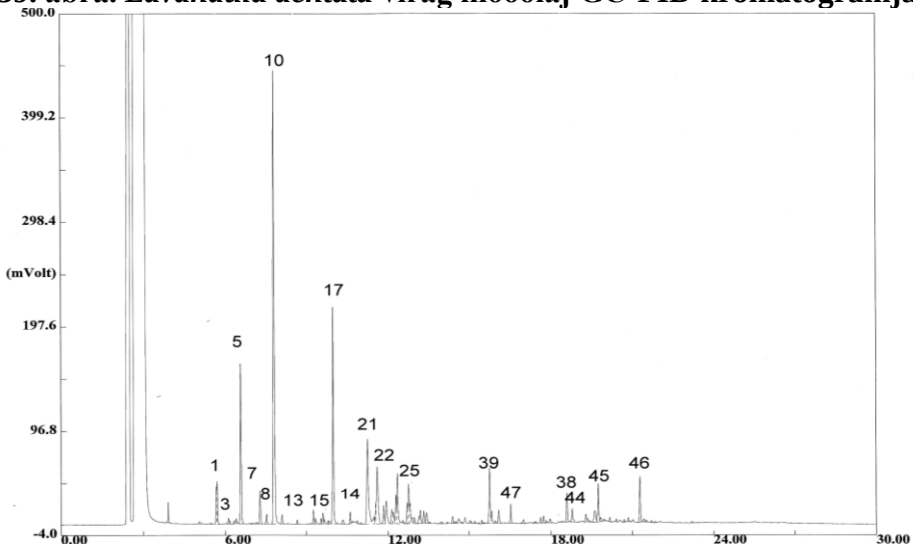
1. α-pinén
2. 3-oktanon
3. kámfén
4. szabinén
5. β-pinén
6. β-mircén
7. m-cimol
8. S-limonén
9. R-limonén
10. **eukaliptol**
11. trans- β-ocimén
12. cis- β-ocimén
13. trans-linalool-oxid
14. kamfenol
15. cis-linalool-oxid
16. l-fenkon
17. **linalool**
18. 1-oktenil-acetát
19. fenkol
20. n-hexil-butirát
21. transz-pinokarveol
22. verbenol
23. **kámfor**
24. lavandulol
25. borneol
26. **terpinen-4-ol**
27. α-terpineol
28. fenkil-acetát
29. **linalil-acetát**
30. pinen-3-on
31. nerol
32. **lavandulil-acetét**
33. bornil-acetát
34. mirtenil-acetát
35. limonén-epoxid
36. neril-acetát
37. geranil-acetát
38. szantalén
39. β-kariofillén
40. α-bergamotén
41. β-farnezén
42. β-kubebén
43. γ-muurolén
44. kariofillén-oxid



38. ábra. ***Lavandula stoechas*** **virág illóóolaj GC-FID kromatogramja**

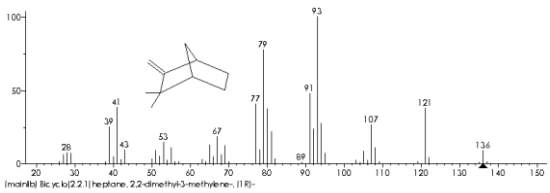


39. ábra. ***Lavandula dentata*** **virág illóóolaj GC-FID kromatogramja**

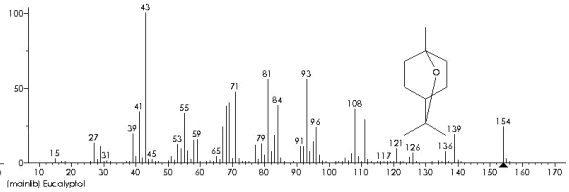


40. ábra. ***Lavandula dentata*** **levél illóóolaj GC-FID kromatogramja**

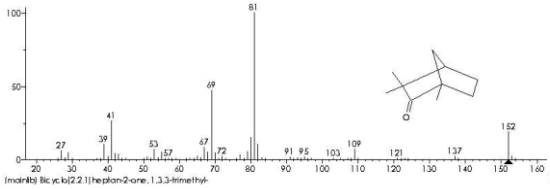
1. α-pinén
2. 3-oktanon
3. kámfén
4. szabinén
5. β-pinén
6. β-mircén
7. m-cimol
8. S-limonén
9. R-limonén
10. **eukaliptol**
11. trans- β-ocimén
12. cis- β-ocimén
13. trans-linalool-oxid
14. kamfenol
15. cis-linalool-oxid
16. **l-fenkon**
17. **linalool**
18. 1-oktenil-acetát
19. fenkol
20. n-hexil-butirát
21. **transz-pinokarveol**
22. verbenol
23. **kámfor**
24. lavandulol
25. borneol
26. terpinen-4-ol
27. α-terpineol
28. fenkil-acetát
29. linalil-acetát
30. pinen-3-on
31. nerol
32. lavandulil-acetét
33. bornil-acetát
34. mirtenil-acetát
35. limonén-epoxid
36. neril-acetát
37. geranil-acetát
38. szantalén
39. β-kariofillén
40. α-bergamotén
41. β-farnezén
42. β-kubebén
43. γ-muurolén
44. kariofillén-oxid
45. β-eudesmol
46. α-bisabolol



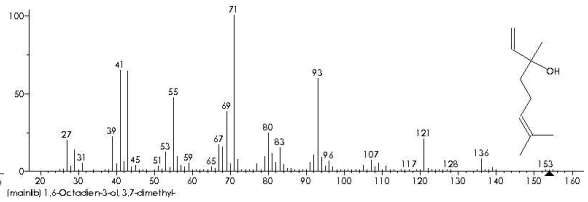
kámfén



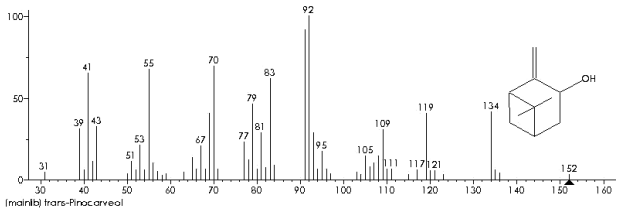
eukaliptol



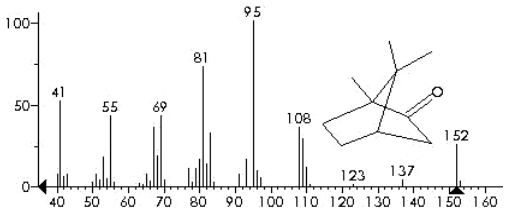
fenkon



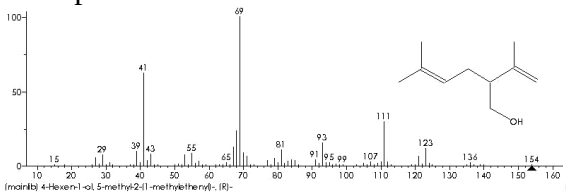
linalool



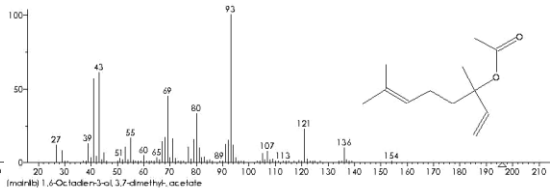
trans-pinokarveol



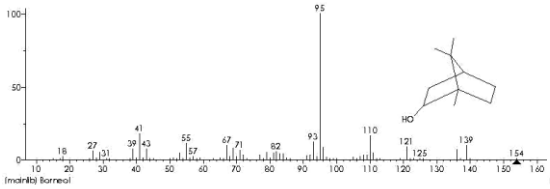
kámfor



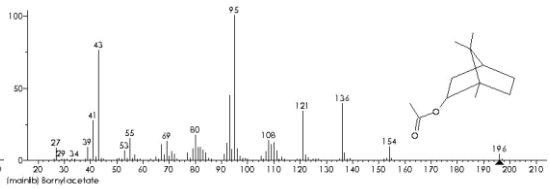
lavandulol



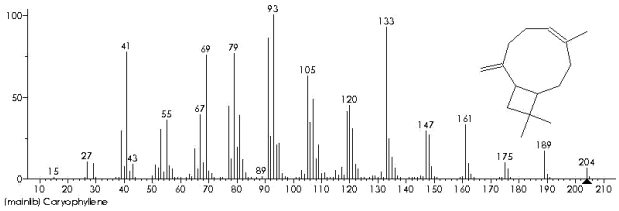
linalil-acetát



borneol



bornil-acetát



β-kariofillén

41. ábra. *Lavandula* virág illóolajokban azonosított fontosabb komponensek tömegspektruma.

5.2.3. *Lavandula* virág illóolajok kvantitatív (összetétel) vizsgálata

A levendula virág illóolajokban minden esetben az oxigén tartalmú monoterpének voltak legnagyobb arányban (14,15. táblázat). A monoterpének aránya 54 – 93% között változott, a legmagasabb mennyiséget a pireneusi levendula virágában mértük. Legnagyobb szeszkviterpén tartalma (12%) a *L. dentata* virágolajának volt.

Az oxigéntartalmú terpének aránya 69,8 - 91,4% között változott, legmagasabb a *L. stoechas* olajában volt, míg a legnagyobb szénhidrogén arányt a *L. vera-3* virágában mértük. Az oxigéntartalmú komponensek főként alkoholok és észterek voltak, kisebb mennyiségben étereket és ketonokat is találtunk. Legmagasabb észterarányt a *L. vera-3,4* virágolajában mértünk, az alkoholok túlsúlya az irodalmi adatoknak megfelelően a *L. intermedia* illóolajára volt jellemző (71,9%).

A linalool és a linalil-acetát aránya is jellemző érték az orvosi levendulavirág illóolajában. A linalool aránya 21,0 – 44,4% között változott, a hibrid levendulaolajban magasabb, 58,05% volt. A linalil-acetát aránya zömében 10 – 14% között volt, legmagasabb értéket a pireneusi levendula olajában mértünk (21,3%). Az észter típusú vegyületek közül kiemelkedett a *L. vera-3* virág lavandulil-acetát tartalma (22,0%) volt, ami meghaladta mind a linalool, mind a linalil-acetát tartalmat. A *L. stoechas* illóolaj fő komponense a fenkon (40,2%), és jellemző komponense a fenkil-acetát (0,5%). A 3.1.4.1. fejezetben ismertetett csoportosítás szerint az általunk vizsgált *L. stoechas* minta a fenkon – kámfor csoportba tartozott, kámfor és terpinén-4-ol tartalma 17,9%, eukaliptol tartalma alacsony, 0,7% (Skoula és mtsai., 1996). A *L. dentata* illóolajának legnagyobb arányú komponense az eukaliptol volt (12,7%), melyet az irodalmi adatokhoz képest (50%) alacsonyabb arányban tartalmazott (List–Hörhammer 1994).

Megvizsgáltuk, hogy a *L. vera* illóolaj komponenseinek aránya megfelt-e a 3.2.4.1. fejezetben ismertetett Ph.Hg.VIII. követelményeknek. Legnagyobb különbség az előírásokhoz képest a linalil-acetát arányában mutatkozott, egyik taxon virágában se érte el a gyógyszerkönyvi határértéket (25,0%), emellett a limonén mennyisége mindegyik illóolajban meghaladta a felső határt (<1,0%), a 3-oktanon mennyisége csak a *L. vera-4* olajában érte el az előírt arányt (0,1%). A többi komponens aránya minden taxonban megfelelt az előírásoknak.

14. táblázat. Levendulavirág vízgőzdesztillált illóolaj összetétele (mérés: GC-FID)

Komponens neve	Retenciós idő t_R (perc)	Komponensek százalékos megoszlása (%)							
		L.vera 1.	*L.vera 2.*	*L.vera 3.*	*L.vera 4.*	*L. vera ssp pyrenaica*	*L. intermedia*	*L. stoechas*	*L. dentata*
α-pinén	5,45	0,1	0,1	0,8	0,9	0,3	0,1	1,4	1,0
3-oktanon	5,77	0,1	0,1		0,1			1,1	
kámfén	6,04	0,1	0,3	0,1	0,1	0,0	0,8	4,6	0,6
szabinén	6,16								0,2
β-pinén	6,40	1,7	1,4	1,2	0,4	1,3	0,5	0,1	1,8
β-mircén	7,05	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4	0,4		
m-cimol	7,22	1,8	1,5	1,6	1,3	3,4	0,2	0,5	0,6
S-limonén	7,40	1,8	2,2	0,5	1,9	2,1	0,3	0,4	0,2
R-limonén	7,49	1,8	1,4	1,2	1,1	1,8			
eukaliptol	**7,73**	**0,6**	**0,9**	**0,2**	**0,5**	**0,6**	**8,3**	**0,7**	**12,7**
trans- β-ocimén	8,01	0,2	0,5	0,1	0,4	0,5	0,3		
cis- β-ocimén	8,22	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5		
trans-linalool-oxid	9,18	0,1	1,3	1,0	1,9	1,1	1,1		0,7
kamfenol	9,36							0,4	0,8
cis-linalool-oxid	9,51	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	1,0		1,3
l-fenkon	9,62							40,2	
linalool	**9,84**	**36,5**	**44,4**	**21,1**	**28,2**	**34,5**	**58,1**	**0,5**	**5,7**
1-oktenil-acetát	10,40	0,1	0,1	0,5	0,2	0,4		0,4	
n-hexil-butirát	10,65	0,3	0,3	0,8	0,3	0,5	0,5	16,3	
transz-pinokarveol	11,25								10,1
verbenol	11,30								4,9
kámfor +terpinen-4-ol	**11,38**	**5,1**	**5,5**	**4,0**	**7,0**	**11,6**	**1,3**	**17,9**	**5,5**
lavandulol	11,48	0,3	0,3	0,1	0,2	0,4	0,5		
borneol	12,04	4,4	3,5	3,5	4,0	5,1	1,4	0,8	1,1
fenkil-acetát	11,85							0,5	
linalil-acetát	**11,90**	**13,7**	**11,7**	**10,3**	**16,6**	**21,3**	**6,0**		
pinen-3-on	12,35								3,3
lavandulil-acetát	**12,58**	**9,7**	**5,0**	**22,0**	**9,3**	**4,9**	**1,1**		
bornil-acetát	12,75							12,1	2,7
mirtenil-acetát	13,62							0,9	0,7
neril-acetát	13,97	1,3	1,2	1,3	7,1	1,1	0,3		
geranil-acetát	14,34	2,5	2,3	1,4	1,7	1,6	0,3		
szantalén	14,48	0,7	0,4	3,3	0,3	0,9	0,2		0,6
β-kariofillén	14,71	1,5	0,8	5,5	2,2	2,3	1,0		0,6
α-bergamotén	14,92	1,6	0,2			0,1			
β-farnezén	15,98	0,4	0,1	0,1	0,4	0,1	0,2		1,7
β-kubebén	16,19	0,2			0,2	0,3		0,5	2,1
kalamenén	17,72								1,2
kariofillén-oxid	18,49	0,3	0,4	2,0	0,7	0,4	0,2		0,8
β-eudezmol	19,75								1,8
α-bisabolol	21,29								3,6

A táblázatban feltűntetett %-os értékek – a *L. dentata* kivételével - két év (2008, 2009) során gyűjtött mintákban mért illókomponensek %-os megoszlásának átlaga

15. táblázat. Levendula vízgőzdesztillált illóolaj komponenseinek csoportosítása terpénváz és funkciós csoportok szerint (mérés: GC-FID)

Vegyületcsoportok	Vegyületcsoportok százalékos megoszlása (%)							
	L.vera 1.	*L.vera 2.*	*L.vera 3.*	*L.vera 4.*	*L. vera ssp pyrenaica*	*L. intermedia*	*L. stoechas*	*L. dentata*
Terpénváz szerint								
monoterpének	82,4	84,1	71,8	83,4	92,9	83,1	98,8	53,7
szeszkviterpének	4,6	2,0	11,0	3,8	4,2	1,6	0,5	12,3
Funkciós csoportok szerint								
szénhidrogének	10,2	7,6	13,0	7,9	10,2	4,5	7,3	9,8
oxigén tartalmú terpének	76,9	78,5	69,8	79,3	86,8	80,2	91,5	56,2
alkoholok	49,0	57,5	31,4	43,4	56,7	71,8	60,2	48,8
éterek	0,7	1,9	3,1	2,8	1,6	2,4	40,7	2,8
ketonok	5,6	4,1	7,0	11,7	1,3	17,9	7,1	3,3
észterek	27,5	20,4	36,4	35,2	29,7	8,2	29,7	3,3

5.2.4. *Lavandula dentata* virág és levél illóolajának összehasonlítása

Vizsgáltuk a 2009-ben gyűjtött *Lavandula dentata* virágának és levelének vízgőzdesztillációval kinyerhető illóolaj tartalmát és összetételét. A 5.2.1. fejezetben említettük, hogy a virág érdekes módon csak nyomokban tartalmaz illóolajat <0,1 ml/100g), a levél illóolajtartalma magasabb: 1,6 ml/100g.

A levél és a virág illóolaj összetétele néhány komponenst kivéve (pl. β-pinén) nem tér el jelentősen (41-42. ábra, 16. táblázat). Mindkét illóolaj fő komponense az eukaliptol, de aránya a levélben magasabb (26,80%). A virágolaj másik fő komponensét, a transz-pinokarveolt (10,24%) a levél alacsonyabb arányban (7,22%) tartalmazta. A levélolaj másik fő komponense a linalool (10,63%), a virágolajban ezt csak 5,69%-ban találtuk. A monoterpének aránya a levélben, a szeszkviterpéneké a virágban volt magasabb. A szénhidrogének magasabb aránya a levélre jellemző. Az oxigén tartalmú terpének közül, az eukaliptol tartalom különbsége miatt, az éter típusú vegyületek aránya tért el legjobban (levél: 28,7%, virág: 16,8%).

16. táblázat. *Levendula dentata* levél és virág illóolaj összetétele

Komponensek neve	Retenciós idő t_R (perc)	Komponensek százalékos aránya (%)	
		levél	*virág*
α-pinén	5,71	1,6	1,0
kámfén	6,12	0,2	0,6
szabinén	6,16	0,1	0,2
β-pinén	**6,57**	**8,4**	**1,8**
o-cimén	7,28	1,6	0,6
limonén	7,53	0,4	0,2
eukaliptol	**7,76**	**26,8**	**12,7**
transz-linalool-oxid	9,26	0,6	0,7
cisz-linalool-oxid	9,60	0,5	1,3
linalool	**9,96**	**10,6**	**5,7**
kamfolenol	10,61	0,5	0,8
transz-pinokarveol	11,25	7,2	10,1
verbenol	11,30		4,9
kámfor + terpinen-4-ol	11,60	4,3	5,5
borneol	12,29	1,2	1,1
pinen-3-on	12,35		3,3
α-terpineol			
bornil-acetát	12,76	1,9	2,7
mirtenil-acetát	13,32	0,5	0,7
β-kariofillén	14,18		0,6
β-farnezén	15,73	2,7	1,7
kalamenén	16,53	0,8	1,2
szantalén	18,60	1,4	0,6
γ-muurolén	17,72		0,8
kariofollén-oxid	18,79	0,8	2,1
β-eudezmol	19,75	1,9	1,8
α-bisabolol	21,29	2,1	3,6
monoterpének		66,6	53,7
szeszkviterpének		9,7	12,3
szénhidrogének		17,2	9,1
oxigén tartalmú terpének		59,0	56,9
alkoholok		24,7	29,9
éterek		28,7	16,8
ketonok		4,3	8,8
észterek		2,5	3,3

5.2.5. Kivonási módszerek hatása a *Lavandula* virág illóolaj-összetételére

Összehasonlítottuk a levendula vízgőzdesztillált illóolaj, és a szilárd fázisú mikroextraktum (SPME) összetételét (17. – 19. táblázat), GC-MS mérések alapján.

Az SPME kivonásra általunk alkalmazott szálon a 65 µm PDMS/DVB adszorbens réteg (Deng és mtsai 2003), nem volt specifikus sem az alkoholok, sem az észterek kivonására, tehát a levendula kivonatokra jellemző alkohol/észter arányt nem befolyásolta jelentősen, ellentétben Kim és Lee (2002) megállapításával, mely szerint az észterek legmagasabb arányban a 30-µm PDMS szállal, az alkoholok legnagyobb arányban a 85µm PA szállal dúsított kivonatokban voltak jelen.

A mono- és szeszkviterpének molekulatömegen alapuló illékonysága alapján az SPME kivonatokban magasabb monoterpén arányt vártunk, de ezt a gyakorlat nem igazolta. A szénhidrogének és az oxigén tartalmú terpének aránya viszont minden mintánál a vártnak megfelelően alakult: az SPME kivonatokban az illékonyabb szénhidrogén arány volt a magasabb.

A levendula illóolajok alkalmasak a vízgőzdesztilláció során történő észter hidrolízis tanulmányozására. Várakozásainknak megfelelően az SPME kivonatokban az észterek aránya (18 - 58%) a desztilláltakéhoz (12 - 47%) képest minden mintánál magasabb volt, kivéve a *L. dentata* levelét. Az alkoholok esetében fordított a helyzet: minden mintánál a vízgőzdesztillált illóolajok tartalmaztak magasabb százalékban alkoholokat az SPME kivonatokban mért értékekhez képest.

Komponensek szintjén a linalool és a linalil-acetát arányát vizsgáltuk. An és mtsai (2001) az SPME kivonatokban magasabb linalool és alacsonyabb linalil-acetát értéket kaptak, bár szignifikáns különbséget nem tapasztaltak. Az általunk végzett vizsgálatok szerint az illóolajban a linalool százalékos értéke (21 - 47%), a linalil-acetátéhoz (12 - 16%) képest minden mintában magasabb volt, míg az SPME kivonatokban (a *L. vera-3*) a linalool dominált a linalil-acetáttal szemben. Eredményeink egyértelműen a desztilláció során bekövetkezett hidrolízisre utalnak.

17. táblázat. Levendula vízgőzdesztillált illóolaj összetétele (mérés: GC-MS)

Komponensek neve	**Retenciós idő t_R (perc)**	**Komponensek százalékos megoszlása (%)**							
		L. vera 1.	*L. vera 2.*	*L. vera 3.*	*Lavandula vera 4.*	*L. vera ssp. pyrenaica*	*L. intermedia*	*L. stoechas*	*L. dentata*
α-pinén	4,91				1,7			1,2	
3-oktanon	5,73		1,7		1,4	1,2			
kámfén	5,21		0,6		2,2			2,5	
β-pinén	5,68	1,5	0,7				0,5		1,9
β-mircén	5,78	1,0	0,7	0,6	0,8	0,6	0,4		
limonén	6,56	0,8	0,7	0,6	3,0	0,9		1,0	6,5
m-cimol	6,64	1,4	0,4	0,4	1,3	0,9		0,5	
eukaliptol	6,67	0,7	1,1		1,6		12,7	1,2	14,3
trans- β-ocimén	6,60	1,9	1,3	1,7	1,6	3,1			
cis- β-ocimén	6,80	2,4	1,4	0,5	1,4	1,6	1,0		
trans-linalool-oxid	7,35		1,4	0,8	1,4		3,2		1,8
kamfenol	7,45							0,5	1,2
cis-linalool-oxid	7,64		1,3	0,7	1,2		2,9		1,3
l-fenkon	7,71							53,7	
linalool	**7,84**	**34,3**	**47,1**	**21,0**	**26,0**	**38,5**	**57,0**	**0,7**	**6,6**
1-oktenil-acetát	7,89	1,1	1,2	1,3	1,7	1,1		0,4	
fenkol	8,25							1,0	
n-hexil-butirát	8,62			1,0			1,5		
transz-pinokarveol	8,67								11,7
verbenol	8,73								3,3
kámfor	8,79						1,2	20,4	4,3
lavandulol	9,02	1,2	1,2	1,6	1,2		1,1		
borneol	9,25	0,9	1,3	0,7	1,1	0,8		1,0	
terpinen-4-ol	9,39	6,3	5,6	3,1	6,7	17,6	1,0		
α-terpineol	9,64	6,5	4,9	4,9	6,1	4,4	1,4		1,0
fenkil-acetát	10,01							1,3	
linalil-acetát	**10,50**	**16,5**	**13,2**	**12,5**	**14,7**	**14,3**	**7,1**		
pinen-3-on	9,04								3,5
nerol	10,54		1,7	1,5	1,5	1,5			
lavandulil-acetát	11,08	12,6	4,4	28,5	9,1	4,6	1,9		
bornil-acetát	11,18							11,7	9,5
mirtenil-acetát	11,80							1,3	2,0
neril-acetát	12,34	1,6	1,3	1,3	1,9	0,9			
geranil-acetát	12,38	3,0	2,2	2,3	3,2	1,8	1,7		
szantalén	13,43			0,4	0,4				2,0
β-kariofillén	13,52	2,0	0,4	7,6	3,7	2,2	1,3		1,1
β-farnezén	13,88	1,7	1,9	0,5	2,1	2,2	1,9		2,0
β-kubebén	14,48				1,0			0,4	2,3
kalamenén	14,94								2,6
kariofillén-oxid	16,10	1,0	0,5	5,6	1,8	1,6	1,3	0,9	
β-eudezmol	17,10								6,3
α-bisabolol	17,56								1,1

A táblázatban feltűntetett %-os értékek – a *L. dentata* kivételével - két év (2008, 2009) során gyűjtött mintákban mért illókomponensek %-os megoszlásának átlaga

18. táblázat. Levendula SPME kivonatok összetétele (mérés: GC-MS)

Komponens neve	Retenciós idő t_R (perc)	Komponenseinek százalékos megoszlása (%)							
		L. vera 1.	*L. vera 2.*	*L. vera 3.*	*L. vera 4.*	*L.vera ssp. pyrenaica*	*L. intermedia*	*L. stoechas*	*L. dentata*
α-pinén	4,91					0,2			3,7
3-oktanon	5,73	1,6	0,9		1,0	1,8			
β-pinén	5,68	1,6	0,4			0,6	0,5		9,7
β-mircén	5,78	0,6	0,6	0,6	0,3		0,3		
limonén	6,56	2,0	1,1	0,2	0,2	0,3		0,6	2,1
m-cimol	6,64	0,2	0,6			0,4			0,9
eukaliptol	6,67	0,5	0,7			0,5	15,7		36,5
trans- β-ocimén	6,60	1,9	0,7	1,3	1,3	1,8			
cis- β-ocimén	6,80	1,7	0,6	0,3	0,8	0,9	0,9		
trans-linalool-oxid	7,35	0,8	2,9	0,9	0,9	2,9	3,1		2,4
kamfenol	7,45								0,9
cis-linalool-oxid	7,64	0,4	2,3	0,7	0,4	1,3	2,3		2,1
l-fenkon	7,71							45,4	
linalool	**7,84**	**11,5**	**25,0**	**11,5**	**17,0**	**29,4**	**40,3**	**3,3**	**3,8**
1-oktenil-acetát	7,89	1,6	1,6	1,4	2,0	0,6			
fenkol	8,25							1,2	
n-hexil-butirát	8,62		0,4	0,9		0,3	0,4		
transz-pinokarveol	8,67								6,1
kámfor	8,79	0,3		1,6	0,2		2,2	9,0	5,7
lavandulol	9,02	1,0	1,9	1,5	1,1	0,7	0,9	0,7	
borneol	9,25	0,5	0,6	0,3	0,5	1,7		1,2	1,3
terpinen-4-ol	9,39	6,5	5,8	2,9	5,6	13,5	1,1	1,7	
α-terpineol	9,64						1,2		1,5
fenkil-acetát	10,01							2,5	
linalil-acetát	**10,50**	**35,0**	**29,3**	**30,6**	**36,4**	**18,3**	**15,4**	**10,6**	
nerol	10,54							5,2	
lavandulil-acetát	11,08	11,6	8,9	25,1	12,5	4,5	2,1	5,3	
bornil-acetát	11,18				0,4			6,4	4,2
mirtenil-acetát	11,80							1,2	1,3
limonén-epoxid	12,10		1,2	0,7	0,3	0,4			
szantalén	13,43	0,8	0,3	0,8	0,9	0,7	1,1		
β-kariofillén	13,52	5,7	4,9	13,3	6,5	7,1	2,6	1,7	2,8
α-bergamotén	13,64		0,4			0,2	0,3		
β-farnezén	13,88	4,8	1,3	1,4	8,7	3,3	3,5	1,8	2,3
β-kubebén	14,48	1,6	1,0	0,7	2,0	0,4			
kalamenén	14,94								1,7
kariofillén-oxid	16,10		0,5	1,8	0,4	1,1		0,9	

A táblázatban feltűntetett %-os értékek – a *L. dentata* kivételével - két év (2008, 2009) során gyűjtött mintákban mért illókomponensek %-os megoszlásának átlaga

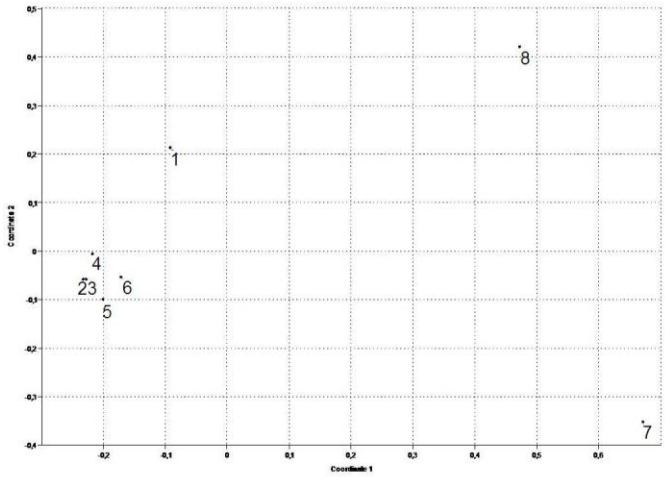
19. táblázat. Vízgőzdesztillációval (VGD) ill. szilárd fázisú mikroextrakcióval (SPME) nyert levendulavirág illókomponensek megoszlása terpén váz és funkciós csoportok szerint (Mérés: GC-MS)

Vegyület csoportok	Detektálás módja	Vegyületcsoportok százalékos megoszlása (%)							
		L. vera 1.	*L. vera 2.*	*L. vera 3.*	*L. vera 4.*	*L. vera ssp. pyrenaica*	*L. intermedia*	*L. stoechas*	*L. dentata*
Terpénváz szerint									
monoterpének	VGD	93,5	95,3	85,1	90,5	93,7	94,4	98,4	69,0
	SPME	79,4	85,4	80,6	81,0	80,1	86,2	94,2	82,1
szeszkviterpének	VGD	4,6	2,8	14,0	8,9	6,0	4,5	1,3	17,5
	SPME	12,8	8,4	18,1	18,4	12,8	7,5	4,5	6,8
Funkciós csoportok szerint									
szénhidrogének	VGD	11,2	7,7	11,9	17,8	10,6	5,2	5,1	18,5
	SPME	20,6	11,3	18,7	20,7	15,6	9,1	4,2	22,2
oxigén tartalmú terpének	VGD	86,9	90,4	87,3	81,6	89,1	93,7	94,6	68,0
	SPME	72,9	87,7	81,4	80,0	81,5	89,9	94,5	71,1
alkoholok	VGD	50,5	64,8	34,7	46,4	63,6	66,5	3,7	34,4
	SPME	21,0	39,0	17,8	25,4	49,9	48,8	13,2	18,9
éterek	VGD	1,6	4,3	7,1	5,9	1,6	20,0	2,1	17,4
	SPME	1,7	7,6	4,1	2,0	6,1	21,1	0,9	40,9
ketonok	VGD		1,7		1,4	1,2	1,2	74,2	7,7
	SPME	1,9	0,9	1,6	1,3	1,8	2,2	54,4	5,7
észterek	VGD	34,8	22,4	47,0	30,5	22,7	12,1	14,7	11,5
	SPME	48,3	40,2	58,0	51,3	23,7	17,9	26,0	5,5

5.2.6. *Lavandula* taxonok kemotaxonómiai vizsgálata az illóolajösszetétel alapján

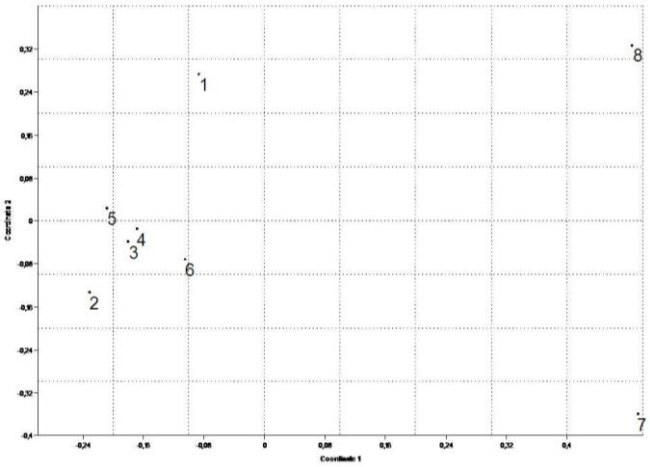
A levendula taxonok rokonság vizsgálatára illóolaj összetételüket jellemző adatok alapján PCA elemzést végeztünk. A vizsgálat a vízgőzdesztillált illóolaj és a SPME kivonatok, valamint két évben, 2008-ban és 2009-ben gyűjtött levendula taxonok illóolaj összetétele alapján történt. Tekintettel arra, hogy a két év SPME kivonataiból és vízgőzdesztillált illóolajából megegyező eredményt kaptunk, csak a 2008-as vízgőzdesztillált illóolaj vizsgálatánál kapott eredményeket mutatjuk be.

A Jaccard indexen, az azonosított komonensek bináris jelenlétén alapuló vizsgálat eredményét a 42. ábra mutatja. A két külső faj, a *Lavandula dentata* (8) és a *Lavandula stoechas* (7) egyértelműen elkülönült, a hibrid levendula természetesen közelebb állt a *L. vera* (2-6) fajokhoz. A *L. vera* taxonok egy klasztert alkottak.



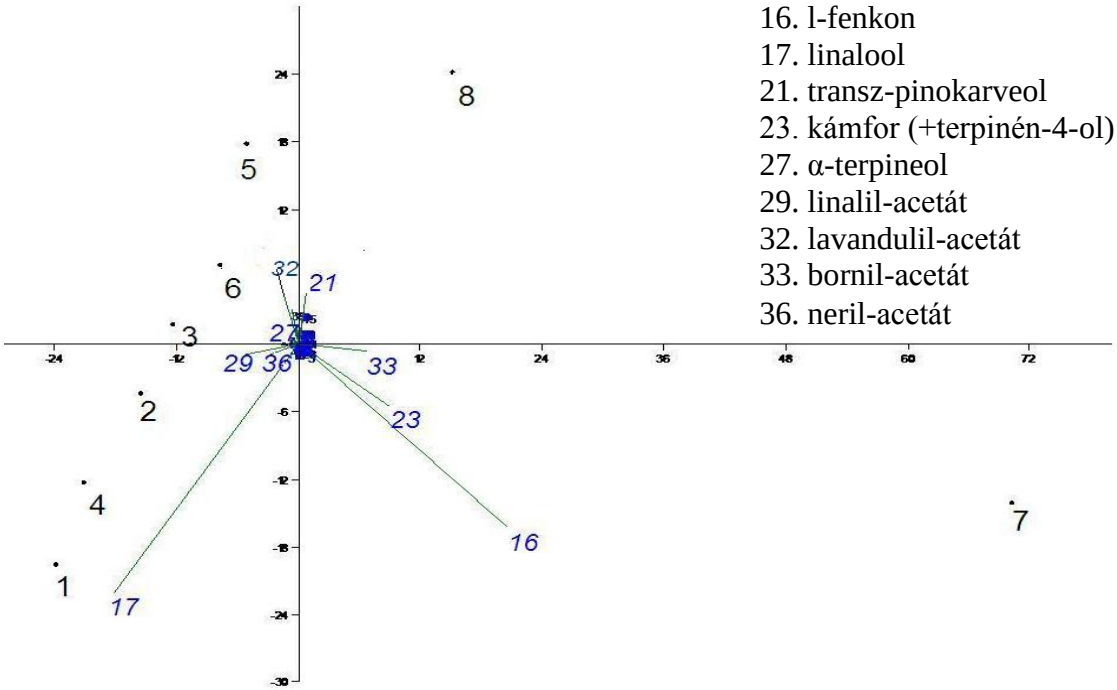
42. ábra. Lavandula taxonok PCA analízise Jaccard index alapján.
1. *L. intermedia* 2. *L. vera ssp. pyrenaica* 3. *L. vera-1.* 4. *L. vera-2.* 5. *L. vera-3.*
6. *L. vera-4.* 7. *L. stoechas* 8. *L. dentata*

A komponensek százalékos eloszlását is figyelembe vevő Bray-Curtis koefficiens alapján (43. ábra) a külső fajok, és a hibrid levendula helyzete nem változott, a *L. vera* taxonok belső struktúrálódását viszont jobban szemlélteti. A pireneusi levendula (2) elkülönült a többi taxontól, a legközebbi rokonság a *L. vera-1* és *L. vera-2* (3,4) taxonok között mutatható ki. A *L. vera-3 és L. vera-4.* (5,6) minta az előző két taxontól, és egymástól is külön vált. A két utóbbi elkülönülésének okául szolgálhat a levendulaolajok egyik jellemző komponensének a lavandulil-acetátnak feltűnően eltérő százalékos előfordulása a két olajban (22,0%, ill 9,3%).



43. ábra. *Lavandula* taxonok PCA analízise Bray-Curtis koefficiens alapján.
1. *L. intermedia* 2. *L. vera ssp. pyrenaica* 3. *L. vera-1.* 4. *L.vera-2.* 5. *L. vera-3.*
6. *L. vera-4.* 7. *L. stoechas* 8. *L. dentata*

A biplot analízis (44. ábra) szerint a *L. stoechas* (7) különbözőségéért elsősorban az 5.3.3. fejezetben is leírt fenkon (16) a felelős, kisebb mértékben a kámfor (és a terpinen-4-ol (23) is okozza. A *L. dentata* (8) különbségéért részben a transz-pinokarveol (10,1%) (21), másrészt az alacsony linalool tartalom (5,7%) (17) és linalil-acetát (29) hiánya felelős. A hibrid levendula (1) felé a linalool (17) vektora mutat, e mellett helyezkedik el a *L. vera-2* (4), és a pireneusi levendula (2) is. Az *L. vera* (2-6) illóolajok linalil-acetát (29) tartalma nem tér el jelentősen, vektora közel vizszintes irányú, hozzá legközelebb a *L. vera-1* (3) és a pireneusi levendula (2) helyezkedik el. A *L. vera-3.* (5). minta rokonsági helyét a magas lavandulil-acetát (32) tartalma határozza meg.



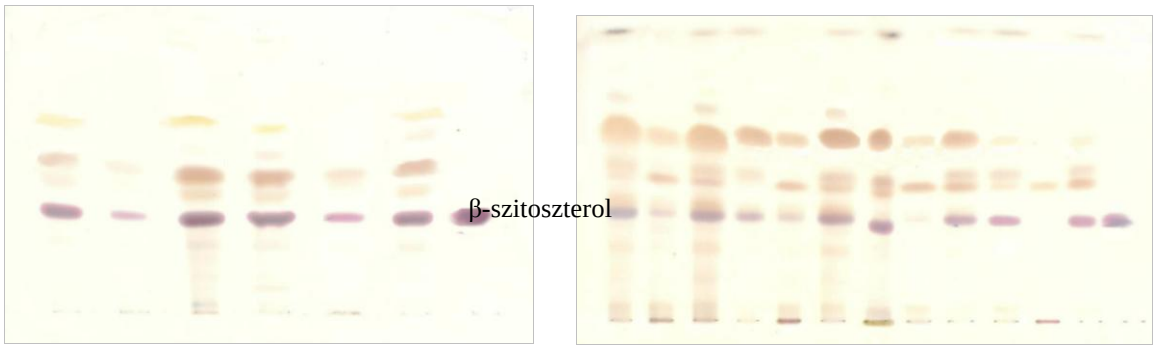
44. ábra. *Lavandula* taxonok biplot analízise.
1. *L. intermedia* 2. *L. vera ssp. pyrenaica* 3. *L. vera-1.* 4. *L. vera-2.* 5. *L. vera-3.*6. *L. vera-4.* 7. *L. stoechas* 8. *L.dentata*
A fekete számok a növényi mintákat, a kék számok a komponenseket jelölik

5.3. *Morus alba* levél és ágkéreg vizsgálata

5.3.1. *Morus alba* levél és ágkéreg oldószeres és szuperkritikus kivonatok terpénjeinek vékonyrétegkromatográfiás vizsgálata

A *Morus alba* elszappanosítással tisztított kivonataiban a szterol és triterpén tartalom elővizsgálatát vékonyrétegkromatográfiával végeztük (45,46. ábra). Kifejlesztőként hexán: etil-acetát 3:1 arányú elegyét használtuk, melyben – előhívás után – a β-szitoszterol kékeslila foltja 0,37 – 0,42 R_f érték között jelentkezett.

A *szerves oldószeres* kivonatokban β-szitoszterol minden esetben kimutatható volt, a hexános kivonást követően kapott 96%-os etanolos kivonatok is tartalmazták kisebb mennyiségben. A β-szitoszterol foltja fölött 3-4 rózsaszín kisebb intenzitású foltot kaptunk, amelyek feltehetően egyéb triterpén komponenseket jeleztek.



a. H HE E H HE E T
1 2

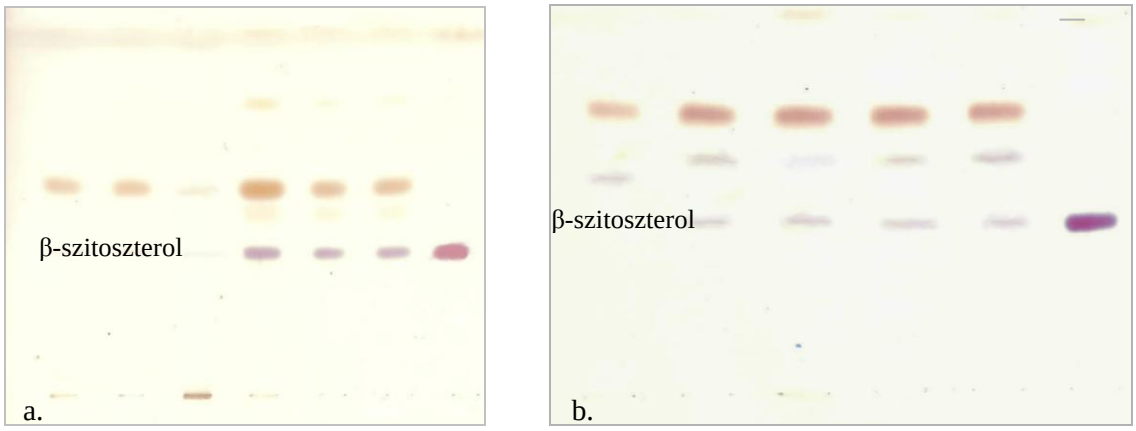
b. H HE E H HE E H HE E H HE E T
3 4 5 6

45. ábra. Különböző reproduktív fázisokban gyűjtött *Morus a* ágkéreg (a. réteg) és levél (b. réteg) Soxhlet készülékben előállított szerves oldószeres tisztított kivonatainak vékonyréteg kromatogramjai.

H: Hexános kivonat
HE: Hexános kivonást követő 96%-os etanolos kivonat
E: 96%-os etanolos kivonat
T: β-szitoszterol teszt R_f = 0.39

1. Mori cortex (termésérés után)
2. Mori cortex (termésérés kor)
3. Mori folium (termésérés után)
4. Mori folium (termésérés után)
5. Mori folium (termésérés kor)
6. Mori folium (termésérés elött)

A laboratóriumi *szuperkritikus kivonatok* közül (46. ábra) a 200 bar nyomáson, illetve a 300 bar nyomáson 60 perc alatt nyert kivonatokban (SFE3, SFE5), valamint a félüzemi kivonás drogmaradékának etanolos kivonatában (SE) nem kaptunk a β-szitoszterollal megegyező retenciós idejű foltot; a többi minta tartalmazott β-szitoszterolt. A laboratóriumi szuperkritikus kivonatokban a β-szitoszterol felett 1 (R_f: 0,6 48. ábra „a" réteg), a félüzemi SFE kivonatban és a drogmaradékban 2 további foltot (R_f: 0,6; 0,77 48. ábra „b" réteg) észleltünk.



46. ábra. *Morus alba* laboratóriumi mértékű szuperkritikus tisztított kivonatának (a. réteg), és félüzemi szuperkritikus, valamint a visszamaradt és kiindulási drog szerves oldószeres tisztított extraktumok (b. réteg) vékonyréteg kromatogramjai.

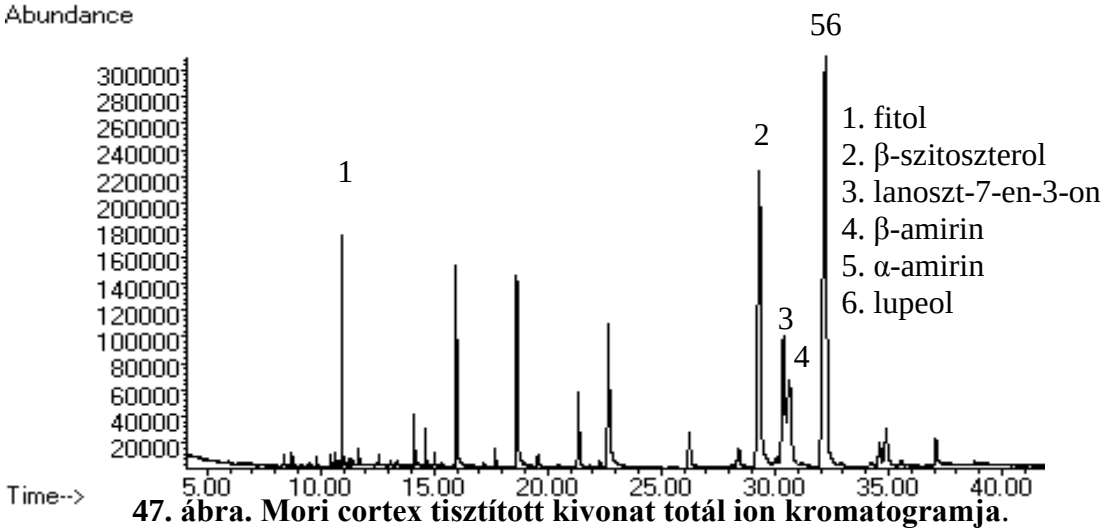
SFE3: Mori folium laboratóriumi SFE (200 bar, 60 perc)
SFE4: Mori folium laboratóriumi SFE (200 bar, 90 perc)
SFE5: Mori folium laboratóriumi SFE (300 bar, 60 perc)
SFE6: Mori folium laboratóriumi SFE (300 bar, 90 perc)
SFE7: Mori folium laboratóriumi SFE (400 bar, 60 perc)
SFE8: Mori folium laboratóriumi SFE (400 bar, 90 perc)
T: ß-szitoszterol teszt R_f =0,42
SE: Mori folium félüzemi SFE után visszamaradt drogból Soxhlet készülékben etanollal előállított tisztított kivonat
E: Mori folium Soxhlet készülékben etanollal előállított tisztított kivonat
SP: Mori folium félüzemi SFE után visszamaradt drogból Soxhlet készülékben pentánnal előállított tisztított kivonat
P: Mori folium Soxhlet készülékben pentánnal előállított tisztított kivonat
F-SFE: Mori folium félüzemi SFE tisztított kivonat
T: ß-szitoszterol teszt R_f =0,42

5.3.2. Terpének azonosítása *Morus alba* kivonatokban GC-MS módszerrel

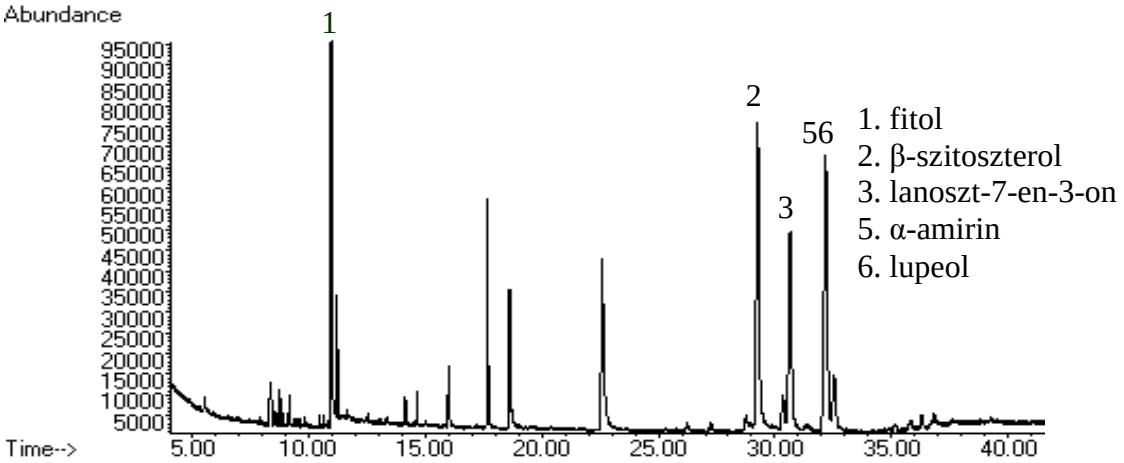
A *Morus* levél tisztított kivonataiban szterolokat: β-szitoszterolt (M^+414) és lanoszt-7-én-3-ont (M^+424); triterpéneket: α-amirint (M^+426) és lupeolt (M^+426); és egy nyílt láncú diterpént, fitolt (M^+278) azonosítottunk, ami részben mint a klorofill oldallánca, bomlástermékként került a kivonatba. A β-szitoszterolt már Hegnauer (1969) is leírta, kapronsavval és palmitinsavval alkotott észterek formájában izolálta a levélből. Az általunk alkalmazott tisztítási eljárás során, feltehetően a glikozidok és észterek elhidrolizáltak, így az alkoholokat szabad formában tudtuk azonosítani.

Az ágkéreg tisztított kivonataiban az említett komponenseken kívül β-amirint (M^+426) is azonosítottunk. A *Morus alba* levél és a kéreg tisztított kivonatok total ion kromatogramjai a 47, 48. ábrán, az azonosított komponensek tömegspektrumai a 49. ábrán láthatók.

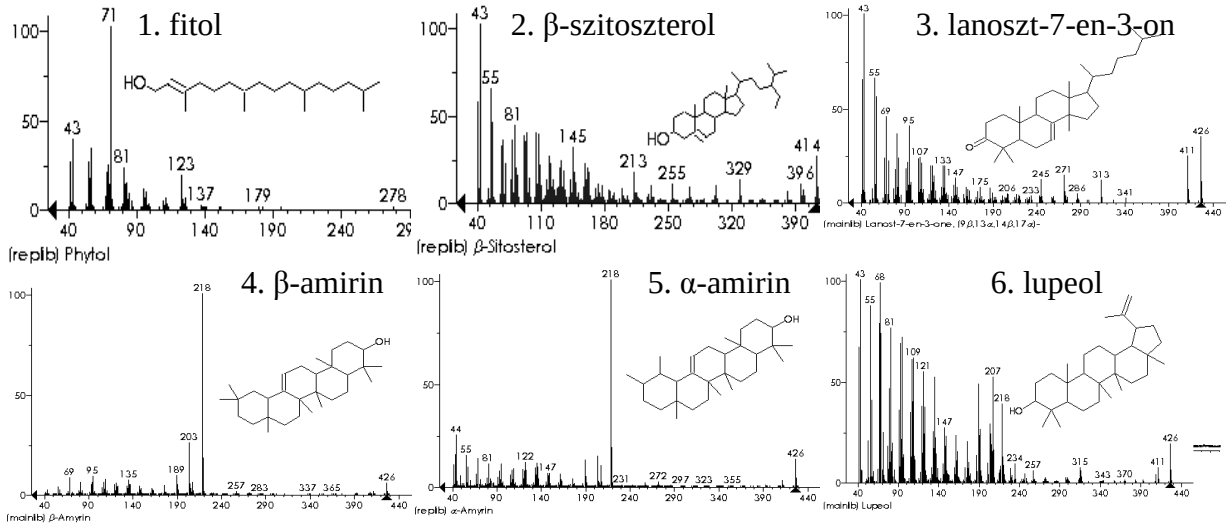
A Takemoto és mtsai (1967) által leírt ekdiszteroidokat az áltaunk alkalmazott vizsgálati körülmények közt nem tudtuk kimutatni, ennek oka az ekdiszterolok polaritása lehetett. Az ekdiszterolok 6 hidroxi csoportot tartalmaznak (16. ábra) az általunk azonosított egy hidroxi csoportot tartalmazó szterolokkal és triterpénekkel szemben (49. ábra), ezért sokkal polárosabb vegyületek. Mivel a származékképzés nélküli gázkromatográfia apoláros vegyületek azonosítására alkalmas, ezek a vegyületek feltehetően nem kerültek detektálásra, illetve a kivonatok részben a vegyületek polaritása alapján végzett tisztítása során is elveszhettek.



47. ábra. Mori cortex tisztított kivonat totál ion kromatogramja.



48. ábra. Mori folium tisztított kivonat totál ion kromatogramja.



49. ábra. *Morus alba* tisztított kivonatokból azonosított di-, triterpén és szterol komponensek tömegspektrumai

5.3.3. Különböző kivonási módszerek β-szitoszterol tartalmat, illetve terpén összetételt befolyásoló hatásának vizsgálata

Összehasonlítottuk különböző kivonási módszerek hozamát (nyers kivonat), a nyers kivonatok el nem szappanosítható anyag tartalmát és az elszappanosítással tisztított kivonatok β-szitoszterol tartalmát. Az értékeket nem csak a kiindulási kivonatokra, hanem a növény jellemzése céljából, a szárított növényre vonatkozóan is feltűntettük (20. táblázat).

A hagyományos kivonatok közül a 96%-os etanolos kivonat hozama magasabb volt, mint a hexános kivonaté, az utóbbi módszer viszont szelektívebb volt a vizsgált vegyületekre. Az analítikai szuperkritikus kivonatok hozama bár rendkívül alacsony volt, de szignifikánsan igazolható volt, hogy a 400 bar nyomáson 90 perc alatt végzett extrakció hozama magasabb volt, mint 200 bar nyomáson 60 perc alatt vézett kivonásé ($p<0,001$; $p<0,013$). A szuperkritikus extrakciót 100 bar nyomáson is elvégeztük, de az extrakció nem eredményezett gravimetriásan mérhető kivonat mennyiséget, a továbbiakban ezeket az oldatokat nem vizsgáltuk. A félüzemi szuperkritikus extrakció hozama magasabb volt, de a hexános kivonás hozamának így is csak a felét érte el.

Az etanolos kivonat el nem szappanosítható része volt a legalacsonyabb (21,8% levél, 3,7% kéreg), amit a kivonás magas hozama és alacsony szelektivitása indokol; az etanol a hexánhoz és a szuperkritikus széndioxidhoz viszonyítva lényegesen polárisabb, így több poláris anyagot old ki, ami a tisztítás során eliminálódik. A hexános és szuperkritikus kivonatok el nem szappanosítható részének tömege bár nem mutatott szignifikáns különbséget, de jól látható, hogy a szuperkritikus kivonatoké a magasabb (58 – 83% levél, ill. 10 – 35% kéreg). A félüzemi kivonás után visszamaradt drogból hexánnal kivonható anyag el nem szappanosítható anyag tartalma gravimetriásan nem volt mérhető, ami a szuperkritikus széndioxid és a hexán hasonló polaritására utal; etanollal viszont még jelentős, az analítikai SFE-hez hasonló mennyiségű anyagot sikerült kivonni (63,8%). Ez arra utal, hogy a triterpének/szterolok részben kötött formában (glikozidok, észterek) voltak jelen, és apoláris oldószerrel nem voltak kinyerhetők.

20.táblázat. Kivonási módszerek hozamot és β-szitoszterol tartalmat befolyásoló hatása

Kivonat neve	A kivonás hozama a szárított növényanyag tömegére vonatkoztatva (g/100g)	Tisztított kivonat tartalom		β-szitoszterol tartalom	
		a szárított növényanyag tömegére vonatkoztatva (g/100g)	a nyers kivonat tömegére vonatkoztatva (g/100g)	a szárított növényanyag tömegére vonatkoztatva (mg/100g)	a tisztított kivonat tömegére vonatkoztatva (g/100g)
Morus levél kivonatok					
Hexános kivonat	8.86±0.09	3.88±0.08	**43.79±0.81**	**128.82±1.61**	3.32±0.24
Etanolos kivonat	16.63±0.11	3.63±0.25	**21.82±0.25**	**27.59±0.99**	0.76±0.12
Hexános kivonást követő etanolos kivonat	12,68+0,21	0,43±0,03	3,39±0,33	0,98±0,77	0,23±0,04
Analítikai SFE 200 bar, 60 perc	0.30±0.01	0.18±0.02	58.67±1.22	7.79±0.67	4.33±0.36
Analítikai SFE 200 bar, 90 perc	0.28±0.01	0.08±0.01	28.57±0.14	4.54±0.09	5.67±0.16
Analítikai SFE 300 bar, 60 perc	0.32±0.03	0.17±0.01	77.22±1.25	9.35±0.09	5.50±0.26
Analítikai SFE 300 bar, 90 perc	0.36±0.02	0.03±0.01	83.33±2.13	1.06±0.01	3.53±0.17
Analítikai SFE 400 bar, 60 perc	0.53±0.03	0.33±0.02	62.26±0.21	5.64±0.02	1.71±0.11
Analítikai SFE 400 bar, 90 perc	0.65±0.04	0.39±0.02	60.01±0.21	8.67±0.07	2.22±0.10
Félüzemi SFE	4.67±0.08	0.29±0.03	61.35±0.39	**26.10±0.09**	9.00±0.15
Félüzemi SFE után visszamaradt drog hexános kivonata	0,10±0,02	-	-	-	5,10±0,08
Félüzemi SFE után visszamaradt drog etanolos kivonata	1,16±0,07	0,74±0,11	63,79±0,35	44,32±1,01	5,99±0,04
Morus ágkéreg kivonatok					
Hexános kivonat	12.60±0.18	0.99±0.07	7.22±0.31	**103.85±1.43**	10.49±1.47
Etanolos kivonat	34.38±0.09	1.27±0.09	**3.70±0.90**	**74.93±1.00**	5.90±0.88
Hexános kivonást követő etanolos kivonat	11,33±0,31	0,62±0,02	5,47±0,27	24,73±2,23	3,99±0,18
Analítikai SFE 200 bar, 60 perc	0.54±0.04	0.05±0.01	10.51±0.19	-	-
Analítikai SFE 200 bar, 90 perc	0.60±0.03	0.21±0.02	34.89±0.25	-	-
Analítikai SFE 300 bar, 60 perc	0.46±0.02	0.09±0.01	25.93±0.16	-	-
Analítikai SFE 300 bar, 90 perc	0.83±0.06	0.11±0.01	13.27±0.18	10.85±1.29	9.86±0.14
Analítikai SFE 400 bar, 60 perc	1.33±0.07	0.31±0.01	23.75±0.45	31.84±1.27	10.27±0.55
Analítikai SFE 400 bar, 90 perc	1.97±0.09	0.33±0.02	16.85±0.28	28.88±1.23	8.75±0.02

5.3.3.1. A kivonási módszerek β-szitoszterol tartalomra gyakorolt hatása

A kivonási módszerek β-szitoszterol tartalomra gyakorolt hatását vizsgálva *Morus* levélen, megállapíthatjuk, hogy a legalkalmasabb kivonási eljárásnak a félüzemi szuperkritikus extrakció bizonyult, a kivonat β-szitoszterol tartalma (9%) megelőzte a hexános kivonat β-szitoszterol tartalmát (3,3%). Az analítikai szuperkritikus extrakciók közül a 200 bar nyomáson 90 perc alatt, és a 300 baron 60 perc alatt előállított kivonatok β-szitoszterol tartalma volt a legmagasabb (5,7 – 5,5%). A kéregkivonatok közül a hexános kivonat (10,5%), és a 400 baron 60 perc alatt előállított analítikai SFE (10,3%) kivonatok β-szitoszterolban a leggazdagabbak. Megjegyezzük azonban, hogy mind a hexános kivonás, mind a félüzemi szuperkritikus széndioxiddal végzett kivonás után visszamaradt drogból nyert tisztított etanolos extraktum is tartalmazott még β-szitoszterolt, ami egyértelműen utal arra, hogy a β-szitoszterol a növényben részben kötött állapotban van jelen.

Összehasonlítva a Mori folium és cortex kivonatok hozamát és β-szitoszterol tartalmát megállapítottuk, hogy a kéregből kiinduló kivonások minden esetben szignifikánsan magasabb hozamot eredményeznek, mint a levél kivonatok ($p<0,04$), de a kéregkivonatok el nem szappanosítható részének aránya a magasabb hozam ellenére alacsonyabb a levél kivonatokéhoz képest ($p<0,05$), ami arra utal, hogy lipofil vegyületekben szegényebbek. Ugyanakkor a kéreg és levél kivonatok β-szitoszterol tartalmát vizsgálva megállapítottuk, hogy a kéreg kivonatok β-szitoszterol tartalma szignifikánsan ($p<0,014$) magasabb (6 – 10%), mint a levél kivonatoké (3 – 9%) (20. táblázat.

5.3.3.2. Kivonási módszerek hatása a di-, és triterpén összetételre

A di-, triterpén/szterol vegyületek százalékos megoszlását GC-FID mérések alapján határoztuk meg (21. táblázat). A *Morus* levél kivonatok fő komponense a fitol (15 – 86%), részben a klorofill bomlástermékeként kerülhetett a kivonatokba. A kéreg kivonatok fitol tartalmát jelentősen alacsonyabbnak találtuk (1 – 8 %), a főkomponens az α-amirin volt, melynek aránya a 300 baron 90 perc alatt előállított kivonatban meghaladta az 50%-ot. A legtöbb levél- és kéregkivonat fitolon és α-amirinen kívül β-szitoszterolt (1 – 10%) és lanoszt-7-en-3-ont is tartalmazott, változó százalékos arányban (levél 1 - 9%, kéreg 20 – 50%). A félüzemi SFE és a hexános kivonás drogmaradékának hexános/pentános és etanolos kivonata már csak fitolt és β-szitoszterolt tartalmazott. Az etanolos kivonatokban a fitol aránya 2-3-szorosa volt a hexános kivonatban mértnek, mind a levél, mind a kéreg esetében. A kéreg etanolos kivonatában a vizsgált komponensek aránya magasabb volt, mint a hexános kivonatban, kivételt csak a β-szitoszterol képezett.

21. táblázat. Kivonási módszerek hatása a terpén összetételre

Komponens neve:	**Komponensek százalékos aránya a tisztított kivonatokban (%)**				
	fitol	β-szitoszterol	β-amirin	lanoszt-7-en-3-on	α-amirin
t_R (perc):	10,98	29,37	30,34	30,78	32,30
Morus levél kivonatok:					
Hexános kivonat	20,3	8,7	-	5,8	8,8
Etanolos kivonat	56,7	7,8	-	5,2	8,5
Hexános kivonást követő etanolos kivonat	86,1	-	-	-	-
Analítikai SFE 200bar 60 perc	27,4	4,3	-	3,2	2,4
Analítikai SFE 200bar 90perc	25,3	5,7	-	0,3	3,5
Analítikai SFE 300bar 60 perc	25,1	5,5	-	1,5	1,7
Analítikai SFE 300bar 90perc	15,6	3,5	-	0,4	0,6
Analítikai SFE 400bar 60perc	32,3	1,7	-	2,7	3,1
Analítikai SFE 400bar 90 perc	15,1	2,2	-	1,0	1,2
Félüzemi SFE	28,4	9,0	-	2,3	3,5
Félüzemi SFE után visszamaradt drog pentános kivonata	33,7	5,0	-	-	-
Félüzemi SFE után visszamaradt drog etanolos kivonata	81,2	6,0	-	-	-
Morus ágkéreg kivonatok					
Hexános kivonat	1,1	10,5	4,3	4,5	20,3
Etanolos kivonat	3,4	5,9	7,4	7,8	45,5
Hexános kivonást követő etanolos kivonat	8,3	4,0	-	-	-
Analítikai SFE 300bar 90perc	6,8	9,9	12,1	8,7	52,0
Analítikai SFE 400bar 60perc	6,6	10,3	8,5	5,3	42,6
Analítikai SFE 400bar 90 perc	6,5	8,7	8,7	5,8	41,9

5.3.4. *Morus* levél β-szitoszterol tartalmának és terpénösszetételének alakulása termésérés során

Vizsgálatainkhoz a termésérés elött (májusban), termséréskor (júniusban) és termésérés után (szeptemberben) gyűjtött eperfa levél mintákat használtuk (22-23 táblázat). Minthogy korábbi vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a hexán egyike a legmegfelelőbb kivonószernek, a méréseket a levelek hexános, elszappanosítással tisztított kivonataiból végeztük el. Megállapítottuk, hogy a β-szitoszterol tartalom tavasszal a legmagasabb és termésérés során csökken; lényegében ugyanez tapasztalható az egyes komponensek százalékos arányára vonatkozóan is.

22. táblázat. *Morus* levél tisztított hexános kivonatok β-szitoszterol tartalmának változása termésérés során

Gyűjtés ideje:	β-szitoszterol tartalom	
	a szárított növényanyag tömegére vonatkoztatva (mg/100g)	a tisztított kivonat tömegére vonatkoztatva (g/100g)
Termésérés elött (május)	111,87±12,11	12,16±0,81
Termséréskor (június)	54,71±4,56	8,70±0,54
Termésérés után (szeptember)	47,60±3,22	3,50±0,92

23. táblázat. *Morus* levél tisztított hexános kivonatok di- és triterpén összetételének változása termésérés során

Gyűjtés ideje:	Komponensek százalékos aránya (%)			
	fitol	β-szitoszterol	lanoszt-7-en-3.on	α-amirin
Termésérés elött (május)	26,25	12,2	5,0	14,5
Termséréskor (június)	20,30	8,7	5,8	8,8
Termésérés után (szeptember)	15,58	3,5	4,1	3,2

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS ÚJ EREDMÉNYEK

Salvia officinalis fehér és lila virágú-, 3 díszváltozat (cv. *tricolor, purpurascens, Kew Gold*), továbbá 3 egzotikus zsályafaj: *Salvia judaica, S. africana-caerulea* és *S. mexicana* illóolaját vizsgáltuk. Az illóolaj vízgőzdesztillációja során megállapítottuk:

- A legmagasabb illóolajtartalmat a *Salvia africana-caerulea* és a *S. officinalis* cv. *Kew Gold* leveléből kaptunk, ezeket a fehér virágú orvosi zsályalevél illóolajtartalma közelítette meg legjobban. Az orvosi zsálya taxonok közül, ha csak az illóolaj mennyiségét vesszük alapul, utóbbi két változat a legalkalmasabb az illóolaj kinyerésre.
- A lila virágú *S. officinalis,* valamint *tricolor* és *purpurascens* változatai közepes illóolajtartalommal rendelkeztek, a *S. judaica* és *mexicana* csak nyomokban tartalmazott illóolajat.

A zsálya illóolajokban GC-MS módszerrel tömegspektrumuk alapján, spektrumtári és irodalmi adatokkal összehasonlítva, valamint standard addícióval 56 illó komponenst azonosítottunk.

- *Elsőként írtuk le a S. officinalis cv. purpurascens, tricolor és Kew Gold, valamint S. judaica illóolaj összetételét.*
- A *S. officinalis* változatainak levéldrogjai azonos illóolaj komponenseket tartalmaztak, különbséget csak az arányukban mutattak. A fehér virágú *Salvia officinalis* fő illókomponense a toxikus α-tujon a többi taxonban alacsonyabb arányban volt kimutatható. A lila viragú, és a termesztett változatok fő komponense az α-humulén, további jelentős komponensek a β-pinén, 1,8-cineol és a kámfor.
- A többi faj illóolajösszetétele jelentősen eltér: a jelentősebb komponenseik szeszkviterpének. A júdeai zsálya fő illókomponensei a β-kubebén, β-kariofillén és a ledol. Az afrikai zsálya illó komponensei közül legjelentősebb a piperiton és a β-kopaén, nagyobb mennyiségben ezeken kívül még β-kariofillént, δ-kadinént és spatulenolt mutattunk ki. A mexikói zsálya fő illó komponensei a β-kariofillén, az izoledén, a β-kopaén és a β-farnezén.
- Összehasonlítva a fehér viragú *S. officinalis* virág és levél illóolajösszetételét, megállapítottuk, hogy a virágban a levélhez hasonlóan jelentős komponens az α-

tujon, de több szeszkviterpén: β-kariofillén, α-humulén, ledol, viridiflorol és arturmeron is kimutatható. Az alacsonyabb tujontartalmú olaj kinyerése mégsem gazdaságos, mivel a virág illóolajtartalma kevesebb, mint fele volt a leveléhez képest.

Az illóolaj százalékos összetételét GC-FID mérések alapján vizsgáltuk.

- Monoterpéneket, főként α-tujont legmagasabb arányban a *Salvia officinalis* fehér virágú változatában találtunk, a lila virágú változatra alacsonyabb monoterpén, ill. α-tujon arány jellemző.
- Az orvosi zsálya díszváltozataiban közel egyenlő arányban mutattunk ki mono és szeszkviterpéneket, fő komponensként az α-humulént.
- A júdeai, afrikai és mexikói zsályára a szeszkviterpének túlsúlya jellemző a monoterpénekkel szemben, legjelentősebb különbséget a mexikói zsálya esetében találtunk (86:2), utóbbi jellemző szeszkviterpénjei az izoledén, β-kariofillén és a δ-kadinén.
- A *S. officinalis* díszváltozatok közül a *purpurascens* és *tricolor* változatokban is a szénhidrogének voltak túlsúlyban, főként α-humulén tartalmuknak köszönhetően.
- Az oxigenált terpének legmagasabb arányát a fehér virágú orvosi zsályában mértük, ezek főként alkoholok és ketonok voltak, de étereket és észtereket is tartalmazott. A lila virágú változatban közel 50% oxigén tartalmú mono- és szeszkviterpént mértünk, a díszváltozatokban valamint a júdeai és afrikai zsályában 40% körül, a mexikói zsályában csak 6% -ban találtunk oxigén tartalmú terpéneket.
- Diterpén epimanoolt csak a *S. judaica* illóolajában mutattunk ki, a zsálya fajokra jellemző egyéb diterpének vízgőzdesztillációval nem voltak kinyerhetőek.
- Megállapítottuk, hogy a fehér virágú *Salvia officinalis* levél és virág illóolajának százalékos összetétele jelentősen eltért. Monoterpének a levélben, szeszkviterpének a virágban voltak magasabb arányban.
- Oxigenáltság tekintetében is tapasztaltunk különbséget a levél- és a virág-olaj között, bár mindkét szervben az oxigén tartalmú terpének voltak többségben, a virág esetében kisebb volt a különbség a két vegyületcsoport aránya között. Az

alkoholok aránya a virágban, a ketonok aránya - a magasabb α-tujon tartalom miatt - a levélben volt magasabb.

Elsőként hasonlítottuk össze a Salvia officinalis díszváltozatainak illóolaj tartalmát és összetételét különböző virágzási stádiumokban.

- A legmagasabb illóolajtartalmat minden teljes virágzáskor mértük, virágzás előtt és után az illóolaj tartalom minden esetben alacsonyabb volt.
- Az illóolaj összetétel is jelentősen változott a virágzás stádiumaiban. A monoterpének százalékos aránya, és ezen belül a neurotoxikus α-tujon tartalom egyedfejlődés alatt folyamatosan nőtt, legmagasabb virágzás után, szeptemberben volt. A szeszkviterpének aránya ennek megfelelően csökkent (kivéve a '*purpurascens'* mintát), de a fő komponens, az α-humulén aránya virágzáskor volt a legmagasabb.
- A terpén szénhidrogének aránya virágzás elött és alatt nem változott jelentősen; ősszel viszont lecsökkent, az oxigén tartalmú terpéneké ebből következően nőtt: az alkoholok aránya nem mutatott egyértelmű változást, az étereké közel állandó volt, a ketonok aránya virágzás után nőtt, míg az észtereké csökkent.

A gázkromatográfiás vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a fehér virágú orvosi zsályalevél magas illóolaj tartalma magas neurotoxikus tujonaránnyal párosul, ezért biztoztonságos hatású illóolaj kinyerésére kevéssé alkalmas. Biztonságos illóolaj leggazdaságosabban a '*Kew Gold*' változat leveléből nyerhető, teljes virágzáskor gyűjtve; minthogy a tujontartalma mindössze 13%.

A *Salvia africana-caerulea* levél magas illóolajtartalma mellett, a illóolaj-összetétele jelentősen eltér a bizonyított hatású S. officinális leveléétől, ezért az illóolaj tradícionálisan tapasztalt hatásainak bizonyítására további kísérletek szükségesek. A Salvia africana-caerulea a Kirstenbosch National Botanical Garden (Dél-Afrikai Köztársaság) gyűjteményéből származott, ezért a jövőben esedékes vizsgálatokhoz, valamint hazai honosítás céljából elsőként szaporítottuk in vitro körülmények között. 5–6 cm-es állapotban földbe ültettük, 3 hétig klímaszobában tartottuk, majd szabad földbe kiültettük, életképes növényeket kaptunk. *Összehasonlítottuk az intakt gyűjtött növény, a lombikban laboratóriumi körülmények között nevelt (in vitro), és a szabadföldbe kiültetett növények levelének illóolaj tartalmát és összetételét.*

- Az in vitro szaporított és laboratóriumban nevelt növények az intakt növény illóolaj produkcióját nem érték el, a szabadföldbe kiültetett növény illóolajtartalma is csak az eredeti illóolajtartalom egyharmadát közelítette meg, ezért a termesztési körülmények optimalizálására lenne szükség.
- Az illóolaj összetétel nem változott jelentősen a laboratóriumi szaporítás alatt. Minden mintában a szeszkviterpén szénhidrogének voltak nagyobb arányban. A monoterpének aránya az in vitro és a kiültetett növények illóolajában alacsony volt, mintegy fele az intakt növényéhez képest.
- Az oxigenált terpének közül mindhárom mintában domináltak a ketonok, ezen belül a piperiton. A szeszkviterpének közül a β-kariofillén és a γ-elemén magasabb aránya volt jellemző, a szabadföldbe ültetett növények illóolajában ezek voltak a fő komponensek. A *S. africana-caerulea* szövettenyésztési körülményeinek optimalizálása, és fitoterápias hatásának igazolása jövőbeli vizsgálataink érdekes tárgya lehet.

Az illó komponensek eredeti (a növényben jelen lévő) arányának meghatározása nehéz feladatot jelent, mivel az extrakciós módszer befolyásolhatja az összetételt. Az illóolaj vízgőzdesztillációjakor a magas hőmérséklet és a vizes közeg hatására egyes komponensek (pl. észterek, éterek) hidrolizálhatnak, és egyéb szerkezeti átalakulások is történhetnek, viszont kevésbé illékony, de vízgőzzel illó komponensek is kinyerhetők. A növények illatát legjobban megközelítő illóolaj összetételt szilárdfázisú mikroextrakcióval határoztuk meg. A kivonás során 60 ˚C-on 5 perces inkubálás alatt gyűjtöttük az illóolajat. *Salvia taxonoknál elsőként hasonlítottuk össze a vízgőzdesztillációval kapott illóolaj, és az SPME kivonatok összetételét.* Mivel a SPME kivonás vízmentes, és a hőmérséklet is alacsonyabb a vízgőzdesztillációhoz képest, a komponensek szerkezeti változást nem szenvedtek, viszont az illékonyabb komponensek aránya megnőtt. A kivonási módszer illóolaj összetevők arányára gyakorolt hatásának vizsgálatakor a következőkrt állapíthattuk meg:

- Várakozásainknak megfelelően a kisebb molekulatömegű, illékonyabb monoterpének magasabb aránya az SPME kivonatokra volt jellemző, a szeszkviterpének a vízgőzdesztillátumban voltak nagyobb részben.
- Oxigén tartalmú terpéneket minden esetben a vízgőzdesztillátumban találtunk nagyobb arányban, legnagyobb eltérést az alkoholok esetében tapasztaltunk.

Éterek a SPME kivonatokban magasabb arányban voltak jelen, feltételezhetően a vízgőzdesztilláció során egy részük alkoholra bomlott.

Az illóolaj tartalom és összetétel környezeti és genetikai tényezőktől egyaránt függ. A DNS alapú molekuláris markerek (RAPD) jól használhatók fajtaazonosításra, illetve egyedek és fajok közti genetikai rokonság meghatározására. *Elsőként tanulmányoztuk az említett zsálya taxonok genetikai és kémiai variabilitását, és vizsgáltuk az illóolajösszetétel genetikai meghatározottságát. Molekuláris és kemotaxonómiai vizsgálatainkkal a gázkromatográfia és a tömegspekrtometria újabb célú alkalmazási lehetőségét kívántuk bemutatni.* A genetikai és illóolaj összetétel alapján számított hierarchikus klaszter analízis jellemzésére dendrogramokat szerkesztettünk, ezek alapján megállapítottuk:

- A júdeai zsálya (külső faj) várakozásainknak megfelelően különvált az orvosi zsályától és termesztett változataitól. A *S. officinalis* taxonok között a legközelebbi rokonság a '*purpurascens*' és '*tricolor*' változatok között volt kimutatható.
- A RAPD fragmentumokon és az illóolaj összetételen alapuló klaszter analízis azonos eredményt adott, ez a kémiai profil és a genetikai készlet szoros kapcsolatára utal, eredményeink megerősítik, hogy a kémiai profil és a RAPD markerek egyaránt hatásosan alkalmazhatók a zsálya változatok közti rokonság vizsgálatára.

A zsálya minták rokonságvizsgálatát illóolaj összetételük alapján kiterjesztettük mindegyik általunk vizsgált mintára. *A nagyobb számú minta rokonsági kapcsolatainak ábrázolására elsőként végeztünk PCA vizsgálatot, melynek során vektorok segítségével koordináta rendszerben két dimenzióban ábrázoltuk a rokonsági kapcsolatokat.* A Jaccard index alapján végzett vizsgálat az azonosított komonensek prezencia-abszencia típusú bináris jelenlétét vette alapul, az illóolaj összetétel *kvalitatív* vizsgálatán alapult.

- A *Salvia officinális* minták egy csoportot alkottak, a többi zsályafaj elkülönült, ezek közül a közelebbi rokonságot a *S. mexicana* és a *S. africana-caerulea* taxonok mutattak.
- A *S. officinalis* minták közül a lila virágú minta különült el legjobban. A fehér virágú változat a '*purpurascens*' változathoz állt legközelebb.

A Bray-Curtis koefficiens alapján végzett vizsgálat a komponensek százalékos eloszlását is figyelembe vette (*kvantitatív* analízis), ezért a habitusnak jobban megfelelő eloszlást kaptunk.

- A lila virágú *S. officinalis* a termesztett változatok között foglalt helyet, mivel a termesztett változatok is lila virágúak voltak, és közülük, meglepő módon, közelebbi rokonságot mutat a '*purpurascens*' és '*tricolor*' változatokhoz, mint a '*Kew Gold*' taxon.
- A külső fajok közül az afrikai és a mexikói zsálya közelebbi rokonságot mutatott a *S. officinalis* mintákhoz, mint a *S. judaica*.

A rokonság vizsgálatát biplot analízissel kiegészítettük, ami *a rokonság belső szerkezetéért felelős komponenseket* is ábrázolta, és igazolta korábbi megállapításainkat.

- A júdeai zsálya elkülönüléséért leginkább a ledol és a viridiflorol volt felelős, az afrikai és a mexikói zsálya távolságát több komponens (β-kariofillén, izoledén, γ-elemén, terpinolén, piperiton és γ-kadinén) együttes jelenléte okozta.
- A *S. officinalis* változatokon belül a fehér virágú zsálya rokonsági távolságát egyértelműen az α-tujon, a lila virágú változat rokonsági távolságát az eukaliptol és kisebb mértékben a γ-muurolén okozta. A díszváltozatok különbözőségéért az α-humulén, kámfor és az α-tujon komponensek voltak felelősek leginkább.

Négy féle helyről származó *Lavandula vera (syn. L. angustifolia, L.officinalis)*, valamint további négy *Lavandula* taxon: *L. vera* ssp. *pyrenaica, L.intermedia, L. stoechas* virágából illetve *L.dentata* virágából és leveléből vízgőzdesztillációval előállított illóolajokat vizsgáltunk.

- Az irodalmi adatoknak megfelelően a legmagasabb illóolajtartalmat a *L. intermedia* virágában találtunk.
- A *L. vera* virágok illóolaj tartalma alacsonyabb volt, de mindegyik minta illóolajtartalma meghaladta a Ph.Hg.VIII. határértékét (13ml/kg).
- A *L. stoechas* illóolajtartalma alacsonyabb volt a fentiekénél, a *L. dentata* virága csak nyomokban tartalmazott illóolajat.

A levendula minták illóolajában 46 komponenst azonosítottunk tömegspektrumuk, irodalmi adatok és standard addíció alapján.

- A *Lavandula vera* és *L. intermedia* virágok illóolajának fő komponense a linalool, ez alól kivételt képezett *az általunk leírt Lavandula vera-3 minta illóolaja, amelynek fő komponense a lavandulil-acetát*. További fontosabb komponensek a linalil-acetát, a kámfor és terpinén-4-ol - megfelelően a Ph.Hg.VIII előírásainak - és a *L. intermedia* esetében az eukaliptol.
- A *Lavandula stoechas* olaj fő komponense a fenkon, és észtere a fenkil-acetát.
- A *L. dentata* virág és levél olaj legjelentősebb komponense az eukaliptol, de a linalool is jellemző alkotója; a virágban ezen kívül α-bizabolol, a levélben β-pinén is előfordult nagyobb mennyiségben.

Az illó komponensek arányát a zsályavizsgálatnál leírtakhoz hasonlóan GC-FID módszerrel vizsgáltuk:

- A levendula virág illóolajokban minden esetben az oxigén tartalmú monoterpének voltak legnagyobb arányban, legmagasabb monoterpén arányt a pireneusi levendulában mértük, legnagyobb szeszkviterpén arányt pedig a *L. dentata* virág olajában.
- Az oxigéntartalmú terpének aránya legmagasabb a *L. stoechas* olajában volt, míg a legnagyobb szénhidrogén arányt a *L. vera-3* mintában találtunk.
- Az oxigéntartalmú komponensek főként alkoholok és észterek voltak, kisebb mennyiségben étereket és ketonokat is találtunk. Legmagasabb észteraránytt a *L. vera-3,4* minta tartalmazta, az alkoholok túlsúlya az irodalmi adatoknak megfelelően a *L. intermedia* illóolajára volt jellemző.
- A linalool és a linalil-acetát aránya is jellemző érték az orvosi levendula illóolajára. A linalool aránya 21 – 44% között változott, a hibrid levendulaolajban volt a legmagasabb. A linalil-acetát aránya 10 – 14% között volt, legmagasabb értéket a pireneusi levendula olajában érte el, tehát ez a taxon szolgáltatta a „legértékesebb” levendula olajat. Az észter típusú vegyületek közül a 4. *L. vera* virág lavandulil-acetát tartalma meghaladta mind a linalool, mind a linalil-acetát tartalmát.

Elsőként vizsgáltuk a Lavandula dentata virágának és levelének illóolajtartalmát és összetételét.

- A virágzat érdekes módon csak nyomokban tartalmazott illóolajat, a levél illóolajtartalma magasabb volt.

- A levél és a virág illóolaj összetétele nem tért el jelentősen. Az illóolaj fő komponense az eukaliptol, százalékos értéke a levélben magasabb volt, emellett linaoolt is nagyobb mennyiségben tartalmazott. A virág másik fő komponensét, a transz-pinokarveolt a levél alacsonyabb arányban tartalmazta. A levél jellemző komponense ezeken kívül a β-pinén volt. Megállapíthattuk, hogy a *Lavandula dentata* levél drogjából gazdaságosabban nyerhető illóolaj, mint virágából.

A korábban ismertetett levendula taxonok vízgőzdesztillált illóolajának, és a szilárd fázisú mikroextraktumának (SPME) összetételét elsőként hasonlítottuk össze GC-MS mérések alapján.

- A mono- és szeszkviterpének molekulatömegen alapuló illékonysága alapján az SPME kivonatokban magasabb monoterpén arányt vártunk, de a gyakorlat ezt nem igazolta.
- A szénhidrogének és az oxigén tartalmú terpének arányában viszont jelentős különbséget tapasztaltunk, várakozásainknak megfelelően az SPME kivonatokban az illékonyabb szénhidrogének magasabb arányban voltak.
- A levendula illóolaj alkalmas a vízgőzdesztilláció során történő észter hidrolízis tanulmányozására. Várakozásainknak megfelelően az SPME kivonatokban az észterek aránya magasabb volt, mint a desztillált illóolajokban, alkoholokban viszont az illóolajok bizonyultak gazdagabbaknak.
- Komponensek szintjén a linalool és a linalil-acetát arányát vizsgáltuk, az előzőekkel megegyező eredményt kaptunk, ami egyértelműen a desztilláció során bekövetkezett hidrolízisre utalt.

A levendula minták rokonság vizsgálatra illóolaj összetételük alapján elsőként végeztünk PCA vizsgálatot.

- A Jaccard indexen, az azonosított komonensek bináris jelenlétén alapuló vizsgálat során a két külső faj, a *Lavandula dentata* és a *Lavandula stoechas* természetesen elkülönült, a hibrid levendula közelebb állt a *L. vera* fajokhoz, a *L. vera* minták egy klasztert alkottak.
- A komponensek százalékos eloszlását is figyelembe vevő Bray-Curtis koefficiens alapján a külső fajok, és a hibrid levendula helyzete nem változott, a *L. vera* mintákon belül a pireneusi levendula elkülönült a többi mintától, a legközebbi rokonság az *L. vera-1,2* minták között mutatható ki.

- A biplot analízis szerint a *L. stoechas* különbözőségéért első sorban a fenkon a felelős, kisebb mértékben a kámfor és a terpinen-4-ol, a *L. dentata* távolabbi rokonsága részben a transz-pinokarveol, másrészt az alacsony linalool és linalil-acetát tartalmának köszönhető. A hibrid levendula, a *L. vera-2,* és a pireneusi levendula különbözősége a linalool tartalmukra volt visszavezethető. Az *L. vera* illóolajok linalil-acetát tartalma nem tért el jelentősen, vektorához legközelebb az *L. vera-1* és a pireneusi levendula helyezkedett el. PCA vizsgálattal bebizonyítottuk, hogy az irodalomban gyakran külön fajként leírt pireneusi levendula a többi orvosi levendula taxon között helyezkedett el, tehát feltehetően nem külön faj, hanem a *L. vera* alfaja.

A *Morus alba* levél és ágkéreg di- és triterpén komponenseinek vizsgálata kiegészíti a *Salvia* és *Lavandula* fajok mono és szeszkviterpén illó vegyületeinek vizsgálatát. Az eperfa terpenoid-vizsgálatának elsődleges célja az SFE kivonatok léptéknövelésének, és körülményeinek optimalizálása volt.

Hexán, és 96%-os etanol oldószerekkel Soxhlet készülékben, valamint analítikai és félüzemi léptékű szuperkritikus széndioxiddal előállított, elszappanosítással tisztított kivonatokat vizsgáltuk. *Elsőként tanulmányoztuk az SFE léptéknövelés hatásait a kivonás hozamára, a kivonatok összetételére és β-szitoszterol tartalmára.* Az analítikai SFE kivonatokat 100, 200, 300 és 400 bar nyomáson, 60 és 90 perces extrakcióval kaptuk, a félüzemi extraktor nyomása 450 bar, a hőmérséklete 40 ˚C volt, a CO_2 nyomását – szelektív elválasztás céljából - két lépcsőben csökkentettük, az első szeparátorban a 40 bar nyomáson kapott kivonatot használtuk fel a további vizsgálatokhoz.

Összehasonlítva a különböző kivonási módszerek hozamát, a nyers kivonatok el nem szappanosítható anyag tartalmát megállapítottuk:

- A hagyományos kivonatok közül az etanolos kivonat hozama magasabb, mint a hexános kivonaté, az utóbbi módszer viszont szelektívebb a vizsgált vegyületekre.
- Az analítikai szuperkritikus kivonatok hozama rendkívül alacsony, várakozásainknak megfelelően a 400 bar nyomáson, valamint 90 perc alatt végzett extrakciók hozama magasabb volt, mint 200 bar nyomáson illetve 60

perc alatt vézett kivonásoké, a 100 bar nyomáson előállított kivonatok nem eredményeztek mérhető hozamot.

- A félüzemi szuperkritikus extrakció hozama magasabb volt, de a hexános kivonás hozamának így is csak a felét érte el.
- A hexános és szuperkritikus kivonatok el nem szappanosítható anyagtartalma nem mutatott szignifikáns különbséget, az etanolos kivonatok el nem szappanosítható frakciója volt a legkevesebb, amit a kivonás magas hozama és alacsony szelektivitása indokolt.
- A kéregből kiinduló kivonások minden esetben szignifikánsan magasabb hozamot eredményeztek, mint a levél kivonatok, de a kéregkivonatok el nem szappanosítható részének aránya alacsonyabb volt a levél kivonatokéhoz képest, ami a kéregdrog alacsonyabb apoláris (lipofil) anyag tartalmára utalt.

A fitoszterol és triterpén komponensek minőségi vizsgálatát vékonyrétegkromatográfiás elővizsgálat után, GC-MS módszerrel végeztük:

- A *Morus* levél elszappanosítással tisztított kivonataiban szterolokat: β-szitoszterolt és lanoszt-7-én-3-ont; triterpéneket: α-amirint és lupeolt; és egy nyílt láncú diterpént, a fitolt azonosítottuk, utóbbi a levél kivonatok fő komponense volt. *Lanoszt-7-en-3-on és a lupeol komponenseket elsőként írtunk le Morus levél és ágkéreg kivonatokban*.
- Az ágkéreg tisztított kivonataiban az említett komponenseken kívül β-amirint is azonosítottunk, a fő komponens (55%) az α-amirin.

Kidolgoztunk egy új, származékképzés nélküli gázkromatográfiás módszert az eperfa levél és kéreg β-szitoszterol tartalmának mennyiségi meghatározására. A kvantitatív GC-FID vizsgálatot 5-α-kolesztán-3-on belső standarddal felvett kalibráció alapján végeztük. Az RSD% 1,94% volt három párhuzamos mérés alapján. A csúcstisztaságot tömegspektroszkópiával ellenőriztük.

- Megállapítottuk, hogy β-szitoszterol kivonására *Morus* levélből a félüzemi szuperkritikus kivonás volt a legalkalmasabb, melynek β-szitoszterol tartalma megelőzte a hexános kivonatét.
- Az analítikai szuperkritikus kivonatok közül a 200 bar nyomáson 90 perc alatt, és a 300 bar nyomáson 60 perc alatt előállított kivonat β-szitoszterol tartalma volt a legmagasabb.

- A kéreg kivonatokban a hexános kivonás és a 400 bar nyomáson 60 perc alatt végzett kivonás bizonyult a leghatékonyabbnak A β-szitoszterol tartalom minden esetben szignifikánsan magasabb volt, mint a levélé, bizonyítva a Mori cortex jelentőségét a talán csekélyebb gazdasági szerepe ellenére is.
- Termésérés során vizsgálva a *Morus* levél β-szitoszterol tartalom alakulását, és a triterpén összetétel változását, elsőként állapítottuk meg, hogy *a β-szitoszterol tartalom tavasszal a legmagasabb és termésérés során csökken; ugyanez tapasztalható az egyes komponensek százalékos megoszlására vonatkozóan is.*

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Salvia offficinalis* és a *Lavandula angustifolia* a Lamiaceae család jelentős gyógynövényei, legfontosabb hatóanyaguk az illóolaj, a levendulában szedatív, a zsályában antimikróbás és görcsoldó hatású. *Salvia officinalis* fehér és lila virágú-, 3 díszváltozat (*tricolor, purpurascens, Kew Gold*), továbbá 3 egzotikus zsályafaj: *S. judaica, S. africana-caerulea* és *S. mexicana* illóolaját vizsgáltuk. Legmagasabb illóolajtartalom a *Salvia africana-caerulea* és a *S. officinalis* '*Kew Gold*' levelére jellemző. A zsálya illóolajokban GC-MS módszerrel 56 illó komponenst azonosítottunk, az illóolaj százalékos összetételét GC-FID módszerrel vizsgáltuk. A fő illókomponens a fehér virágú *Salvia officinalisban* az α-tujon, a lila viragú, és a termesztett változatokban α-humulén, a júdeai zsályában a ledol, az afrikai zsályában a piperiton, a mexikói zsályában a β-kariofillén. A *S. africana-caerulea* növényt szövettenyészetben szaporítottunk honosítás céljából, a szabadföldbe kiültetett és az in vitro termesztett növények illóolaj produkciója elmarad az intakt növényétől; míg az összetétel nem változik jelentősen. A növények illatát legjobban megközelítő SPME kivonatok monoterpén szénhidrogénekben gadagabbak. A *Salvia* taxonok illóolaj összetételük és RAPD markerek alapján végzett rokonságvizsgálata bizonyította az illóolaj összetétel genetikai meghatározottságát. A *S. officinalis* taxonokon belül a *purpurascens* és *tricolor* változat, külső fajok közül a *S. mexicana* és a *S. africana-caerulea* mutat közelebbi rokonságot.

Vizsgáltuk továbbá négy hazai gyűjtésű *Lavandula vera,* valamint *L. vera* ssp. *pyrenaica, L.intermedia, L.stoechas* és *L.dentata* illóolaját. Legmagasabb illóolajtartalom a *L. intermedia* virágzatára jellemző. A levendula mintákban 46 illókomponenst azonosítottunk. A *Lavandula vera* és *L. intermedia* olajok fő komponense a linalool, kivéve az általunk elsőként leírt *Lavandula vera-3.* illóolajának, aminek a lavandulil-acetát. A *L. stoechas* illóolaj fő komponense a fenkon, és fenkil-acetát, a *L.dentata* virág és levél olajnak az eukaliptol. Az SPME kivonatokban az észterek aránya magasabb az alkoholokéhoz képest, komponensek szintjén a linalil-acetát aránya magasabb a linaloolhoz képest. A PCA analízis bizonyította, hogy az irodalomban gyakran külön fajként leírt pireneusi levendula a *L.vera* alfaja.

A *Morus alba* szterol és triterpén vegyületeinek gyulladáscsökkentő aktivitása a proteinkináz C enzim gátlásán alapul. A *Morus alba* levél és ágkéreg szerves oldószeres, valamint analítikai és félüzemi léptékű SFE tisztított kivonatait vizsgáltuk. Az SFE kivonatok közül a félüzemi extraktum, a tradícionális kivonatok közül az etanolos kivonás hozama a legmagasabb, de szelektivitása alacsony szterol és triterpén vegyületekre. Tavasztól őszig az apoláris vegyületek aránya növekedett. A *Morus* levél kivonatokban GC-MS módszerrel β-szitoszterolt, lanoszt-7-en-3-ont, α-amirint és lupeolt, a kéregben továbbá β-amirint azonosítottunk. Az általunk kidolgozott, származékképzés nélküli GC-FID módszerrel, 5-α-koleszt́án-3-on belső standarddal legmagasabb β-szitoszterol tartalmat a félüzemi SFE kivonatban mértünk, termésérés elött gyűjtött drogból.

8. SUMMARY

Salvia offficinalis and *Lavandula angustifolia* are important herbs of Lamiaceae family. Their most important pharmaceutically active ingredient is the essential oil, which has sedative effect in lavender, and spasmolytic, antimicrobial effects in sage. The essential oil components of white- and purple-flowered and other three ornamental variants of *Salvia officinalis* (*tricolor, purpurascens, Kew Gold*), as well as three exotic sage species, *S. judaica, S. africana-caerulea,* and *S. mexicana* were examined. The highest essential oil content was gained from the leaves of *Salvia africana-caerulea* and of *S. officinalis 'Kew Gold'* during full flowering period. 56 volatile components were identified in sage essential oils using the GC-MS method, while the percentage-composition of those essential oils was examined by the GC-FID method. The main volatile component analysed is the α-thujone in the white-blossom *Salvia officinalis*, α-humulene in the purple-blossomed and cultivated samples, as well as ledol in Judean, piperitone in African, and β-caryophyllene in the Mexican sage. *S. africana-caerulea* was cultivated in vitro for naturalisation purposes. The essential oil production of the in vitro herbs proves to be less than of the intact herb, while their compositions do not differ significantly. Monoterpene hydrocarbons were identified in a higher ratio in SPME extracts, these extracts resemble the scent of the original herbs the most. The genetic determination of essential oil composition of *Salvia* taxa was verified by molecular and chemotaxonomic examinations based on oil compositions and RAPD markers. Molecular and chemotaxonomic examination of Salvia taxa based on their essential oil composition and RAPD markers reveal the genetic determination of their essential oil composition. Among *S. officinalis* taxa the purpurascens and tricolor versions, while among the external genera, *S. mexicana and S. africana-caerulea* show closer relationship.

The essential oil content of the Hungarian harvested *Lavandula vera*, *L. vera* ssp. *pyreneica, L.intermedia, L. stoechas,* and *L. dentata* was analysed. The blossom of *L. intermedia* has the highest essential oil content. In lavender taxa 46 volatile components were identified. Linalool is the main component of *Lavandula vera* and *L. intermedia* oil, except for the *Lavandula vera-3* ecotype, where lavandulyl-acetate is the dominant

component. Fenchone and fenchyl-acetate are the main essential oil components of *L. stoechas*, and eucalyptol is the primary component in the oil of the flower and leaf of *L. dentata*. In the SPME extract the ratio of esthers to alcohols was higher. In fact, PCA analysis has proved that the Pyrenean lavender, which is often cited in the literature as a separate genus, is the subgenus of *L.vera*.

The anti-inflammatory activity of the sterol and triterpene molecules of *Morus alba* is based on the inhibition of the protein kinase-C enzyme. The extracts of *Morus alba* leaf and bark produced by organic solvents, as well as laboratory and pilot scale SFE methods, were compared. Out of the SFE purified extracts the pilot scale method has the highest yield, whereas among traditional extracts the ethanolic extraction proved to be the most effective one, but its selectivity remained low for sterol and triterpene components. An increase in the ratio of apolar contents was observed during the vegetation period from spring to fall. Using GC-MS, β-sitosterol, lanost-7-en-3-on, α-amyrin, and lupeol were identified in *Morus* leaf extracts, and β-amyrin in bark extracts. Using 5-α-cholestane-3-on as the internal standard of the derivation-free GC-FID method the highest β-sitosterol content was gained in pilot scale SFE.

IRODALOMJEGYZÉK

- Akhondzadeh S, Kashani L, Fotouhi A, Jarvandi S, Mobaseri M, Moin M, Khani M, Jamshidi AH, Baghalian K, Taghizadeh M. (2003) Comparison of Lavandula *angustifolia* Mill. tincture and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized trial. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 27:123– 127
- Alberts A, Mullen P, Spohn M. Fák, bokrok gyógyító ereje. Alföldi Nyomda Rt, 2005:96-97
- Allen T. Particle size measurement, Chapman and Hall, London, 1981.
- Ambrus R, Aigner Z, Simándi B, Révész P. (2006). A szuperkritikus technológia elméleti alapjai és gyakorlati alkalmazása. Gyógyszerészet, 50:287-291
- An M, Haig T, Hatfield P. (2001) On-site samplingand analysis of fragrance from living Lavander (*Lavandula angustifolia* L.) flowers by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography and ion trap mass spectrometry. J chromatograph A, 917:245-250
- Aoshima H, Hamamoto K. (1999). Potentiation of $GABA_A$ receptors expressed in Xenopus oocytes by perfume and phytoncid. Biosci Biotechnol Biochem, 63:743–748.
- Asano N, Yamashita T, Yasuda K, Ikeda K, Kizu H, Kameda Y, Kato N, Nash RJ, Lee HS, Ryu KS. (2001) Polyhydroxilated Alkaloids Isolated from Mulberry Trees (*Morus alba* L.) and Silkworms (*Bombyx mori* L.). J Agric Food Chem, 49: 4208-4213
- Balacs T, (1992). Research reports. Int. J. Aromather, 4:28–29.
- Baricevic D, Sosa S, Della LR, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: The relevance of ursolic acid. J Ethnopharmacol, 75:125–132.
- Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, Zupancic A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L. leaves: the relevance of ursolic acid J Ethnopharmacol, 75:125-132

- Bernáth J. Vadon termő és termesztett gyógynövények. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 1993:322-329, 436-441
- Boros Á. A levendula *Lavandula angustifolia* Mill. In: Máthé I. (Ed) Magyarország Kultúrflórája V. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1968:5-10, 63
- Bouaziz M, Yangui T, Sayadi S, Dhouib A. (2009) Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. Food Chem Toxicol, 47 :2755–2760
- Bradley BF, Starkey NJ, Brown SL, Lea RW. (2007). Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. J Ethnopharmacol, 111:517–525
- Büyükokuroglu ME, Gepdiremen A, Hacimüftüoglu A, Oktay M. (2003) The effects of aqueous extract of *Lavandula angustifolia* flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. J Ethnopharmacol, 84:91: 94
- Capek P. (2008) An arabinogalactan containing 3-O-methyl-D-galactose residues isolated from the aerial parts of *Salvia officinalis* L. Carbohydr Res, 343 :1390–1393
- Capek P. (2009) A water soluble glucomannan isolated from an immunomodulatory active polysaccharide of *Salvia officinalis* L. Carbohydr Polym, 75:356–359
- Clebsch B. The New Book of Salvias. Timber Press Inc. Portland, Oregon USA, 2003:198-199
- Dános B. Farmakobotanika. Argumentum Kiadó, Budapest, 1997: 210-211, 288, 143, 309-310
- Dános B. Farmakobotanika. A gyógynövénytan alapjai (Kemotaxonómia). Argumentum Kiadó, Budapest, 2002:238-241
- De Souza MM, Bittar M, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Messana I, Delle Monache F, Ferrari F. (2000) Antinoniceptive properties of morusin, a prenylflavionoid isolated from *Morus nigra* root bark. Z. Naturforsch, 55: 256-260
- Deng C, Song G, Zheng X, Hu M, Zhang X. (2003) Analysis of the Volatile Constituents of *Apium graveolens* L. and *Oenanthe* L. by Gas Chromatography

– Mass Spectrometry, Using Headspace Solid-Phase Microextraction. Chromatographia, 57:805-809

- Deshpande VH, Parthasarathy PC, Venkataraman K. (1968) Four analoges of artocarpin and cycloartocarpin from *Morus alba*. Tetrahedron Lett, 9: 1715-1719
- Diego M, Jones N. (1998). Aromatherapy positively affects mood, EEG patterns of math computations. Int J Neurosci, 96:217–224.
- Du J, He ZD, Jiang RW, Ye WC, Xu HX, But PPH. (2002) Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. Phytochemistry, 62: 1235-1238
- Echeverrigaray S, Agostini G, Atti-Serfini L, Paroul N, Pauletti GF, Atti dos Santos AC (2001) Correlation between the Chemical and Genetic Relationships among Commercial Thyme Cultivars. J Agric Food Chem, 49: 4220-4223.
- Eidi A, Eidi M. (2009) Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, 3:40–44
- Eidi M, Eidi A, Zamanizadeh H. (2005) Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol, 100:310–313
- El-Beshbishy HA, Singab ANB, Sinkkonen J, Pihlaja K. (2006) Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. Life Sci, 78: 2724-2733
- Esquivel B, Ramirez-Davalos N, Espinosa-Perez G. (1999**)** A cis-Languidulane Diterpenoid from Salvia mexicana var. major (Labiatae). Heterocycles, 51:1647-1651
- European Pharmacopoeia 5th. Edition. Vol.2. EDQM, Strasbourg, France, 2004: 1894-1895
- Farag RS, Salem H, Badei AZMA, Hassanein DE (1986) Biochemical studies of the essential oil of some medicinal plants. Fette Seifen Anstrichmittel, 88**:**69–72.
- Fukai T, Kaitou K, Terada S. (2005) Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Fitoterapia, 76: 708-711
- Funke I, Melzig MF. (2005) Phytotherapie bei Typ-2- Diabetes Mellitus? Z Phytother, 26: 271-274

- Gilani AH, Aziz N, Khan MA, Shaheen F, Jabeen Q, Siddiqui BS, Herzig JW. (2000) Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L. J Ethnopharmacol, 71:161-167.
- Giray ES, Kirici S, Kayab DA, Turk M, Sonmez O, Inan M. (2008) Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas.* Talanta, 74:930–935
- Gohlke RS. (1959) Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography. Anal Chem, 31:535.
- Gohlke RS. (1993) Early gas chromatography/mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom, 4:367.
- Goldblatt P, Manning J. Cape plants. A conspectus of the Cape flora of South Africa. National Botanical Institute, Pretoria & Missouri Botanical Garden, Missouri, 2000:67-69
- Graham PH, Browne L, Cox H, Graham J. (2003). Inhalation aromatherapy during radiotherapy: results of a placebo controlled double-blind randomized trail. J Clin Oncol, 21:2372–2376.
- Gutierrez A, Rio DC, Gonzalez-Vila FJ, Martin F (1998) Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. J Chrom A, 823:449–455
- Hajhashemi V, Ghannadi A, Sharif B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. J Ethnopharmacol, 89:67–71
- Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G. (Hrsg) Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis; Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, 1994: 630-645, 539-552
- Hartwell JL. Plants used against cancer. A survey. Lloydia, 1971:34
- Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen. Birkhäuser Verlag, Basel, 1969:107-127
- Hikino H, Mizuno T, Oshima Y, Konno C. (1985) Isolation and hypoglycemic activity of moran A, a glycoprotein of Morus alba root barks. Planta Med, 2: 159-160

- Hohmann J, Zupko I, Redei D, Csanyi M, Falkay G, Mathe I, Janicsak G. (1999) Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis, Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. Planta Med, 65:576-578.
- Hohmann J, Rédei D, Máthé I, Blunden G. (2003) Phenylpropanoid glycosides and diterpenoids from *Salvia officinalis* Biochem Syst Ecol, 31:427–429
- Hunyadi A, Báthori M, Szendrei K. (2006) Ekdiszteroidok és ekdiszteroidtartalmú növények- gyógyászati és egyéb alkalmazások. Képzés egy életen át, 6: 3-9
- Imelouane B, Elbachiri A, Ankit M, Benzeid H, Khedid K. (2009) Physico-Chemical Compositions and Antimicrobial Activity ofEssential Oil of Eastern Moroccan *Lavandula dentata.* Int. J Agric Biol, 11:113-118
- Jackson WPU. Origins and meanings of names of South African plant genera. University of Cape Town Printing Dept, Cape Town, 1990:81
- Janicsák G, Veres K, Kállai M, Máthé I. (2003) Gas chromatographic method for routine determiantion of oleanolic and ursolic acids in medicinal plants. Chromatographia, 58: 295-299.
- Jeszenszky Á**.** Az eperfa. *Morus alba* L. In: Máthé I (szerk), Magyarország kultúrflórája. VII. Akadémiai Kiadó, Budapest, (1972): 7-11, 15-30, 74-77, 81-84
- Johnsson L, Paresh C, Dutta PC (2005) Separation of phytosterol oxidation products by combination of different polarity gas chromatography capillary columns J Chrom A, 1064:213–217
- Miura K, Kikuzaki H, Nakatani N. (2001) Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. Phytochem, 58: 1171–1175
- Kamatou GPP, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, Viljoen AM, Figueriedo AC, Barroso JG, Pedro LG, Tilney PM. (2006) Chemical composition, leaf trichome types and biological activities of the essential oils of four related Salvia species indigenous to Southern Africa. J Essential Oil Res, 18:72-79
- Kamatou GPP, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Viljoen AM. (2007) Seasonal variation in essential oil composition, oil

toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* species. S Afr J Bot, 74:230-237

- Kamatou GPP, Makunga NP, Ramogola WPN, Viljoen AM. (2008) South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. J Ethnopharmacol, 119:664–672
- Kamatou GPP, Viljoen AM, Steenkamp P. (2010) Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African Salvia species Food Chem, 119: 684–688
- Kim ES, Park SJ, Lee EJ, Kim BK, Huh H, Lee BJ. (1999) Purification and characterization of Moran 20K from *Morus alba*. Arch Pharm Res, 22: 9-12
- Kim ES, Lee DS. (2002) Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from Lavandula species by gas chromatography–mass spectrometry J. Chromatogr. A, 982:31–47
- Kimura T, Nakagawa K, Kubota H, Kojima Y, Goto Y, Yamagishi K, Oita S, Oikawa S, Miyazawa T. (2007) Food-Grade Mulberry Powder with 1–Deoxyno-jirimycin Supresses the Elevation os Postprandial Bood Glucose in Humans. J Agric Food Chem, 55: 5869-5874
- Lafont R, Dinan L. (2003) Practical uses for ecdysteriods in mammals including humans: an update. J Insect Sci, 3: 7
- Larkov O, Zaks A, Bar E, Lewinsohn E, Dudai N, Mayer AM, Ravid U. (2008) Enantioselective monoterpene alcohol acetylation in Origanum, Mentha and Salvia species. Phytochem, 69:2565–2571
- Lehrner J, Marwinski G, Lehr S, Johren P, Deecke L, (2005). Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. Physiol Behav, 86:92–95.
- Lima CF, Valentao PCR, Andrade PB, Seabra RM, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. (2007) Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from *t*-BHP induced oxidative damage Chem Biol Interact, 167:107–115
- Liptak J. Vademecum of Paramedicinal Product. National Institute of Pharmacy, Primexpharma Ltd. Eger 1995:332-357

- Lis-Balchin M, Hart S, (1997). A preliminary study of the effect of essential oils on skeletal and smooth muscle in vitro. J Ethnopharmacol, 58: 183-187
- Lis-Balchin M, Hart S. (1999). Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.). Phytother Res, 13:540-542
- Lis-Balchin M. Lavender: The Genus Lavandula Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles, Taylor and Francis Inc. London, New York 2002:12-17
- List PH, Hörhammer L. Hager's Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Springer-Verlag, Berlin, 1976:245, 465-467, 897-900
- Lu Y, Foo LY. (1999) Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. Phytochem, 51:91-94
- Lu Y, Foo LY, Wong H. (1999) Sagecoumarin, a novel caffeic acid trimer from *Salvia officinalis*. Phytochem, 52:1149±1152
- Lu Y, Foo LY. (2000) Flavonoid and phenolic glycosides from Salvia officinalis. Phytochem, 55: 263-267
- Lu Y, Foo LY. (2001) Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. Tetrahedron Lett, 42:8223–8225
- Lu Y, Foo LY. (2002) Polyphenolics of Salvia—a review. Phytochem, 59: 117–140
- Madaus G. Lehrbuch der Biologischen Heilmittel. Georg Thime-Verlag, Leipzig, 1938:1927-1931
- Magyar Gyógyszerkönyv 7. kiadás. Medicina Könyvkiadó, Budapest 1986. 1:396
- Magyar Gyógyszerkönyv 8. kiadás. Medicina Könyvkiadó RT. Budapest, 2004 1:127, 233-234, 2:2171 – 2172, 2350 – 2351
- Manley CH. (1993) Psychophysiological effect of odor. Crit Rev Food Sci Nutr, 33:57–62
- Máthé I, Hohmann J, Janicsák G, Nagy G, Rédei D. (2007) Chemical diversity of the biological active ingredients of *Salvia officinalis* and some closely related species. Acta Pharm Hung, 77: 37-43
- Mayer B, Baggio CH, Freitas CS, Santos AC, Twardowschy A, Horst H, Pizzolatti MG, Micke GA, Heller M, Santos EP, Otuki MF, Marques MCA.

(2009) Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. Fitoterapia, 80:421–426

- Mockuté D, Nivinskiené O, Bernotiené G, Butkiené R. (1990) The cis-thujone chemotype of *Salvia officinalis* L. essential oils. Chemija, 14:216-219
- Nagy B, Simandi B, Andras CsD. (2008) Characterization of packed beds of plant materials processed by supercritical fluid extraction. J Food Eng, 88:104
- Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V, Kukongviriyapan U. (2008) Ethanolic extract of *Morus alba* Linn. leaf increases glucose uptake and glucose transporter 4 translocation in adipose cells of streptozocin-induced diabetic rats. Diab Res Clin Pract, 79: 108
- Oh H, Ko E, Jun J, Oh M, Park S, Kang K, Lee H, Kim Y. (2002) Hepatoprotective and Free Radical Scavening Activities if Prenylflavonoids, Coumarin, and Stilbene from *Morus alba*. Planta Med, 68: 930-932
- Oszagyán M, Simándi B, Sawinsky J, Kéry Á, Lemberkovics É, Fekete J. (1996) Supercritical fluid extraction of volatile compounds from lavandin and thyme. Flavour Fragr J, 11:157-165
- Parker J, Malone M. Flora Atheneum 2000 Publishing Limited, Budapest, 2006:801
- Petersen M, Simmonds MSJ. (2003) Rosmarinic acid. Phytochem, 62:121-125
- Petri G. Gyógynövény és drogismeret. Medicína Kiadó, Budapest, 1991:242
- Podani J. Syn-tax-pc computer programs for multivariate data analysis in ecology and systematics. Version 5.0. Scientia Publishing, Budapest, 1993
- Podani, J. Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe. Scientia Kiadó, Budapest, 1997:84-86
- Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. (2006) *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complement Altern Med, 6:1-8
- Prasad L, Khan TH, Sehrawat A, Sultana S. (2004) Modulatory effect of *Morus alba var. indica* against two-stage skin carcinogenesis in Swiss albino mice: possible mechanism by inhibiting aryl hydrocarbon hydroxylase. J Pharm Pharmacol, 56: 1291-1298
- Rácz G, Rácz-Kotilla E, Laza A. Gyógynövényismeret. Ceres Könyvkiadó, Bukarest, 1984:182

- Reed CF. Information summaries on 1000 economic plants. USDA Transcript, 1976:231
- Roberts M. Indigenous healing plants. Southern Book Publishers, Halfway House, South Africa. 1990:54-55
- Rollinger JM, Bodensieck A, Seger C, Ellmerer EP, Bauer R, Langer T, Stuppner H. (2004) Discovering COX-Inhibiting Constituents of *Morus* Root Bark: Activity- Guided versus Computer-Aided Methods. Planta Med, 71:399-405
- Rónyai E, Simándi B, Kéry Á, Lemberkovics É, Then M, Csordás A. (1996) Növényolajok kinyerése és feldolgozása szuperkritikus oldószerekkel. Olaj, Szappan, Kozmetika, 45:94-99
- Santos-Gomes PC, Fernandes-Ferreira M. (2001) Organ and seasondependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated in two different sites. J Agric Food Chem, 49:2908–2916.
- Schnitzler P, Nolkemper S, Stintzing FC, Reichling J. (2008) Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of Salvia officinalis grown at two different locations. Phytomedicine, 15:62–70
- Schönfelder I, Schönfelder P. Der neue Kosmos Heilpflanzen Führer, Franckh-Kosmos Verlags-GmbH, Stuttgart, 2001:286
- Shaw D, Annett JM, Doherty B, Leslie JC. (2007) Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. Phytomedicine, 14:613–620
- Simon T, Csapody V. Kis növényhatározó. Tankönyvkiadó, Budapest, 1986:138
- Singab ANB, El-Beshbishy HA, Yonekawa M, Nomura T, Fukai T. (2005) Hypoglycemic effect of Egyptian *Morus alba* root bark extract: Effect in diabetes and lipid peroxidation of streptozocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol, 100: 333-338
- Skoula M, Abidi C, Kokkalou E. (2006) Essential Oil Variation of *Lavandula stoechas L. ssp. stoechas* Growing Wild in Crete (Greece). Biochem Syst Ecol, 24:255-260
- Soó R, Kárpáti Z. Magyar Flóra. Harasztok-virágos növények. Tankönyvkiadó, Budapest 1968: 639-640

- Sugawara Y, Hara C, Tamura K, Fujii T, Nakamura K, Masujima T, Aoki T. (1998) Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. Anal Chim Acta, 365:293–299
- Szabó LGy. Drog- és gyógynövénynevek. Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, Budapest, 2004:87, 94, 114
- Szabó LGy. Gyógynövény-ismereti tájékoztató - gyógyszerészeknek, orvosoknak, kertész- és agrármérnököknek, biológiatanároknak. Schmidt und Co.- Melius Alapítvány, Baksa - Pécs, 2005:177, 195, 249
- Szendrei K, Csedő K, Hunyadi A. (2006) Gyógynövény alkalmazások a Kárpát-medencében: Mit ér az eperfalevél? I. Gyógyszerészet, 50: 243-248
- Szendrei K, Csedő K, Hunyadi A. (2006) Gyógynövény alkalmazások a Kárpát-medencében: Mit ér az eperfalevél? II. Gyógyszerészet, 50: 422-427
- Szendrei K, Csupor D. Gyógynövénytár. Útmutató a korszerű gyógynövény alkalmazáshoz. Medicina könyvkiadó Zrt. Budapest, 2009: 209-211, 326-328
- Tabacchi R, Saturnin GC, Porret CL, Biedermann M, Sponsler S, Bitzer L. (1997) A Guide to the Analysis of Chiral Compounds by GC. Restek Corporation, p:8
- Tada M, Hara T, Hara C, Chiba K. (1997) A Quinon methide from *Salvia officinalis.* Phytochem, 45:1475-1477
- Takemoto T, Ogawa S, Nishimoto N. (1967) Isolation of the insectmoulting hormones from mulberry leaves. Yakugaku Zasshi, 87: 748
- Tóth L. Gyógynövények, Drogok, Fitoterápia. Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, 2005:76-78, 97-100
- Tucker AO, Marciarello MJ. (1990) Essential Oils of cultivars of Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.) J Essent Oil Res, 2: 139-144.
- Upson TM, Grayer RJ, Greenham JR, Williams CA, Al-Ghamdi F, Chen FH. (2000) Leaf Flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia.* Biochem Syst Ecol, 28:991-1007
- Vágújfalvi D. (1971) Die Alkaloidakkumulation im Latex. Acta Bot Hung, 17:217-241

- Van Rooyen G, Steyn H. Cederberg. South African Wild Flower Guide 10. Botanical Society of South Africa, Cape Town, 1999:62
- Vermeulen N. Gyógynövények enciklopédiája. Ventus Libro Kiadó, Budapest, 2005:165-168
- Vernet-Maury E, Alaoui-Ismaili O, Dittmar A, Delhomme G, Chanel J. (1999). Basic emotions induced by odorants: a new approach based on autonomic pattern results. J Auton Nerv Syst, 75:176–183
- Vieira RF, Grayer RJ, Paton A, Simon, JE. (2001) Genetic diversity of *Ocimum gratissiumum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. Biochem Syst Ecol, 29:287-304
- Willershausen B, Gruber I, Hamm G. (1991) The influence of herbal ingredients on the plaque index and bleeding tendency of the Gingiva J Clin Dent, 2:75–78
- Woelk H, Schläfke S. (2010). A multi-center, double-blind, randomised study of the Lavender oil preparation Silexan in comparison to Lorazepam for generalized anxiety disorder. Phytomedicine, 17:94–99
- Yagi M, Kouno T, Aoyagi Y, Murai H. (1976) Structure of moranoline, a piperidine alkaloid from *Morus* species. J Agric Chem Soc Japan, 50:571-572
- Yun B, Ryoo I, Lee I, Park K, Choung D, Han K, Yoo I. (1999) Two bioactive pentacyclic triterpene esters from root bark of Hibiscus syriacus. J Nat Prod, 62:764-766.
- www.anniesannuals.com/signs/s/salvia_mexicana_lc.html
- www.cfsan.fda.gov/~lrd/fcf182.html:US Food and Drug Administration
- www.etnofarmakologia.hu/galeria/jpg/lavandula_angustifolia_17.jpg
- www.flora.huji.ac.il/browse.asp?lang=en&action=showfile&fileid=17459
- www.henriettesherbal.com/files/images/photos/p08/lavandula-dentata-1.jpg
- www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=28589
- www.muenster.de/~hoge/Dateien/Gruen/Lavandula_*stoechas*_2004.JPG
- www.newnordic.hu/template/t04.php?menuId=369
- www.plantpol.com.pl/uimages/kwiatki/lavn1.jpg
- www.plantsystematics.org/cgi-bin/dol/dol_terminal.pl?taxon_name=Morus_alba

- www.plantzafrica.com/plantqrs/voteplant.php
- www.prideofplaceplants.com/plants/lavandula_*stoechas*.jpg
- www.riverbendnursery.com/_ccLib/image/plants/DETA-300.jpg
- www.tribes.eresmas.net/fotos/flor/Dicot/Labiatae/Lavandula/L_angustifolia_*pyrenaica*/lavandula_angustifolia_*pyrenaica*_01_p0c364_comiols_1.jpg
- www.ubcbotanicalgarden.org/potd/lavandula_intermedia.jpg

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Folyóiratban megjelent publikációk az érekezés témájában:

- Böszörményi A**,** Héthelyi É**,** Farkas Á, Horváth Gy, Papp N, Lemberkovics É, Szőke É. (2009) Chemical and Genetic Relationships among Sage (Salvia officinalis L.) Cultivars and Judean Sage (Salvia judaica Boiss.). J Agric Food Chem, 57:4663-4667. IF: 2.562
- Böszörményi A, Szarka Sz, Héthelyi É, Gyurján I, László M, Simándi B, Szőke É, Lemberkovics É. (2009) Some triterpenes of Morus alba Leaf and Stem Bark in Traditional and Supercritical Fluid Extracts. Acta Chromatographica, 21:659–669. IF: 0.621
- Horváth Gy, Jámbor N, Végh A, Böszörményi A, Lemberkovics É, Héthelyi É, Kovács K, Kocsis B. (2010) Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC–bioautography Flavour Fragr J, DOI 10.1002/ffj.1993

Az értekezés témájához közvetetten kapcsolódó, folyóiratban megjelent publikációk:

- Böszörményi A, Lemberkovics É. (2005) Újabb gyógynövény vizsgálati módszerek az Európai Gyógyszerkönyvben. Gyógyszerészet, 5:275-285
- Lemberkovics É, Böszörményi A. (2004) Illóolaj-tartalmú drogok és illóolajok vizsgálata az 5. Európai Gyógyszerkönyvben. Képzés egy életen át, 6: 3-9
- Lemberkovics É, Kakasy AZ, Héthelyi BÉ, Simándi B, Böszörményi A, Balázs A, Szőke É. (2007) Gázkromatográfia alkalmazása illóolajok analízisére. Dracocephalum fajok illóolajjellemzői és az extrakciós mód illóolajösszetételt befolyásoló hatása. Acta Pharm Hung, 77:19-27.
- Móricz AM, Horváth Gy, Molnár P, Kocsis B, Böszörményi A, Lemberkovics É, Ott PG. Investigation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil in BioArena system. J. Planar. Chromatogr. 23 (2010) 6, DOI: 10.1556/JPC.23.2010.5.00

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Szőke Éva professzor asszonynak és Dr. Blázovics Anna docens asszonynak, a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézet korábbi és jelenlegi igazgatójának, hogy lehetővé tették az értekezésemhez szükséges vizsgálataim elvégzését, és segítőkész tanácsaikkal támogatták munkámat.

Végtelen hálával tartozom Dr. Lemberkovics Éva professzor asszonynak, témavezetőmnek, aki szakmai és emberi segítségével, megértésével mindig mellettem állt Ph.D. munkám során. Köszönöm neki a munkámhoz szükséges – közös érdeklődési körünkhöz kapcsolódó - szakmai tudásának átadását, valamint kutatói és oktatói példamutatását.

Hálásan köszönöm Dr. Horváth Györgyi, Dr. Farkas Ágnes és Dr. Papp Nóra adjunktusnőknek, a Pécsi Tudományegyetem Farmakognózia Intézet munkatársainak, a szakmai támogatást, a témaválasztásban, a növényanyag biztosításában, és a genetikai vizsgálatokban nyújtott segítséget, és külön hálával tartozom önzetlen barátságukért.

Köszönet illeti Dr. Szarka Szabolcs egyetemi tanársegédet és Héthelyi Ivánné szakértőt a gázkromatográfiás vizsgálatokban, és a módszer alkalmazásához szükséges tudásanyag elsajátításában nyújtott türelmes segítségükért.

Köszönetet mondok Dr. Simándi Béla egyetemi docensnek, a Budapesti Műszaki Egyetem Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék munkatársának, valamint Dr. Gyurján István professzor úrnak és László Miklós tudományos főmunkatárs úrnak az Eötvös Loránd Tudományegyetem Növényszervezettani Tanszék munkatársainak a szuperkritikus kivonás elvégzéséért.

Ezúton mondok köszönetet Csete Sándornak, Pécsi Tudományegyetem Növényrendszertani és Geobotanikai Tanszék tudományos munkatársának a statisztikai vizsgálatokban nyújtott segítségért.

Hálával tartozom Borosné Szabados Júliának a kísérletes munkám során nyújtott széleskörű technikai támogatásért és Mathunyi Rudolfnénak a szövettenyésztésben nyújtott segítségért.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézet minden munkatársának, különösen Dr. Marczal Gabriella tudományos tanácsadónak, akik szakmai és emberi támogatásukkal segítették munkámat.

Hálámat fejezem ki szüleimnek és férjemnek, akik szerető támogatásukkal és végtelen türelmükkel járultak hozzá munkámhoz.

A *Morus alba* kivonatokkal kapcsolatos vizsgálataimat a GVOP 3.11.-2004-05-0397/3.0 pályázat keretében végeztem.

Köszönettel tartozom az Aesculap Alapítványnak disszertációm befejezésének támogatásáért.