

Rosmarinic acid content in selected varieties of sage (*Salvia officinalis* L.)

Obsah kyseliny rozmarínovej vo vybraných odrodách šalvie lekárskej (*Salvia officinalis* L.)

Miroslav HABÁN^{1,2}, Marta HABÁNOVÁ^{3*}, Mária HOLOVIČOVÁ³ and Katarína RAŽNÁ⁴

¹ Department of Sustainable Agriculture and Herbology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic

² Department of Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy, Comenius University in Bratislava, Slovak Republic

³ Department of Human Nutrition, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 94976, Nitra, Slovak Republic, *correspondence: marta.habanova@uniag.sk

⁴ Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic

Abstract

The aim of this thesis was to find the content of rosmarinic acid (RA) in the selected varieties of sage (*Salvia officinalis* L.): 'Krajová', 'Purpurascens', 'Berggarten', 'Tricolor', 'Icterina' and 'Alba'. In the monitoring years 2013-2015 and two collection dates was found that the highest RA content was in 'Tricolor' in 2013 (30,084.65 mg*kg⁻¹) collected in the first term. The lowest value was recorded for the 'Berggarten' (9,000.5 mg*kg⁻¹) in 2015 in the second collection date. The highest average RA content was found in 'Tricolor' (19,605.82 mg*kg⁻¹), while the lowest RA content was in 'Berggarten' (14,610.71 mg*kg⁻¹). When the terms of collection were compared, there were confirmed statistically significant difference in RA content in the monitored varieties of sage ($P < 0.001$) between 1st time of harvesting (22,516.08 mg*kg⁻¹) and 2nd time of harvesting (11,155.83 mg*kg⁻¹). Within years was the lowest content of the RA (13,562.74 mg*kg⁻¹) found in 2015 and the difference in the RA content this year compared to 2013 and 2014 was statistically significant ($P < 0.001$). Average RA values in the monitored varieties of sage in 2013 (17,624.12 mg*kg⁻¹) and in 2014 (17,522.69 mg*kg⁻¹) were not statistically significant. These results follow, that the content of RA in sage (*Salvia officinalis* L.) statistically significantly affected the variety, time of harvesting and growing year.

Keywords: growing year, rosmarinic acid, sage, time of harvesting, variety

Abstrakt

Cieľom práce bolo zistiť obsah kyseliny rozmarínovej (RA) vo vybraných odrodách šalvie lekárskej (*Salvia officinalis* L.): 'Krajová', 'Purpurascens', 'Berggarten', 'Tricolor', 'Icterina' a 'Alba'. V rámci sledovaných rokov 2013-2015 a dvoch termínov zberu sme zistili, že najvyšší obsah RA mala odroda 'Tricolor' v roku 2013 ($30084,65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) zberaná v prvom termíne. Najnižšia hodnota bola zaznamenaná pri odrode 'Berggarten' ($9000,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) v roku 2015 v druhom termíne zberu. Najvyšší priemerný obsah RA bol v odrode 'Tricolor' ($19605,82 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), naopak najnižší obsah RA bol v odrode 'Berggarten' ($14610,71 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Pri porovnávaní termínov zberu sme potvrdili štatisticky významný rozdiel obsahu RA v sledovaných odrodách šalvie ($P < 0,001$) medzi 1. termínom ($22516,08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) a 2. termínom zberu ($11155,83 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). V rámci sledovaných rokov bol najnižší obsah RA ($13562,74 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) zistený v roku 2015 a rozdiel v obsahu RA v tomto roku v porovnaní s rokmi 2013 a 2014 bol štatisticky významný ($P < 0,001$). Priemerné hodnoty RA v sledovaných odrodách šalvie lekárskej v roku 2013 ($17624,12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) a v roku 2014 ($17522,69 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) neboli štatisticky významné. Na základe týchto výsledkov je možné konštatovať, že na obsah RA v šalvii lekárskej (*Salvia officinalis* L.) štatisticky významne vplývala odroda, termín zberu aj pestovateľský ročník.

Kľúčové slová: kyselina rozmarínová, odrody, ročník pestovania, šalvia lekárska, termín zberu

Detailed abstract

Content of rosmarinic acid (RA) in selected varieties of sage (*Salvia officinalis* L.) was studied in this research. The field multifactor experiment, which was established in 2013-2015 on the experimental area of the Slovak University of Agriculture in Nitra (SUA) in Kolíňany were selected for the following varieties: 'Krajová', 'Purpurascens', 'Berggarten', 'Tricolor', 'Icterina' and 'Alba'. The area is geomorphologically located in the Žitava upland, a separate unit of the Danube lowland and belongs to the warm climatic region, the dry sub-region and the region of the mild winters. Monitored varieties of sage (*Salvia officinalis* L.) were harvested in June (1st term) and August (2nd term). Rosmarinic acid (RA) was determined by the method of Wang et al. (2004), which was slightly modified for the Waters Breeze HPLC liquid chromatograph of the Department of Sustainable Agriculture and Herbology, the Faculty of Agrobiography and Food Resources of the Slovak University of Agriculture in Nitra (SUA). All values are given as mean \pm S.D. Data were evaluated by the ANOVA, Fisher LSD test using Statistica Cz version 7.1. The results showed that the highest RA was found in the 'Tricolor' variety $30,084.65 \pm 132.03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in 2013, after the first time of harvesting. The lowest value was recorded for the 'Berggarten' variety $9,000.5 \pm 79.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in 2015 after the second time of harvesting. On the basis of the average RA values in the selected varieties of sage for the three monitored varieties at the first time of harvesting, the order from the highest value is the following: 'Tricolor' > 'Krajová' > 'Purpurascens' > 'Alba' > 'Icterina' > 'Berggarten'. After the 2nd time of harvesting, the values of the RA were significantly lower, which is related to ontogenetic variability. The order from the highest value is the following:

'Tricolor' > 'Krajová' > 'Purpurascens' > 'Alba' > 'Icterina' > 'Berggarten'. The mean RA content was twice higher after the first time ($22,516.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) compared to the second term ($11,155.83 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), which is related to the ontogenetic variability of the active ingredient. The statistically highly significant content of rosmarinic acid ($P < 0.001$) was confirmed in the 'Tricolor' variety ($19,605.82 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) compared to 'Berggarten' ($14,610.71 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and 'Alba' ($15,267.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), a statistically significant difference ($P \leq 0.05$) was found only between 'Tricolor' ($19,605.82 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and 'Purpurascens' ($15,863.72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). A highly significant difference was confirmed between 'Krajová' ($19,196.71 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and the 'Berggarten' ($14,610.71 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and a significant difference in the 'Krajová' compared to 'Alba' ($15,267.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). There were not statistically significant differences between 'Berggarten', 'Alba', 'Purpurascens' and 'Icterina' varieties in the content of RA. The results showed that the highest RA content was found in the 'Tricolor' and 'Krajová' varieties. The first time of harvesting of sage with respect to RA content is more appropriate. In the second collection period under the same soil and climatic conditions, the plants are no longer able to produce a comparable amount of rosmarinic acid with the first date of their collection. The weather conditions of the monitored varieties influenced the content of RA statistically.

Úvod

Kyselina rozmarínová (α -o-caffeoyl-3,4-dihydroxyphenyllactic acid) je prírodná fenolická zlúčenina, ktorá bola prvýkrát izolovaná z *Rosmarinus officinalis* L. v roku 1958 (Scarpati a Oriente, 1958). Je to ester kyseliny kávovej (caffeic acid) a kyseliny 3,4-dihydroxyfenyl mliečnej (3,4-dihydroxyphenyllactic acid) (Petersen a Simmonds, 2003). Je to biologicky aktívna netoxická látka, vykazujúca antioxidantné účinky spojené s mierne protizápalovým a mierne antibakteriálnym účinkom (Holzmannová, 1996). Patrí do skupiny fenolických kyselín, ktoré sa v rastlinách vyskytujú buď ako deriváty kyseliny benzoovej (typ C₆-C₁) alebo ako fenylypropanoidy (typ C₆-C₃), pričom najvýznamnejším zástupcom sú deriváty kyseliny škoricovej. Obidva typy kyselín sa v rastlinách nachádzajú buď voľné alebo viazané esterami, amidmi alebo glykozidmi (Petersen a Simmonds, 2003). Biosyntéza kyseliny rozmarínovej v rastlinách vychádza z dvoch rozdielnych aminokyselín L-fenylalanínu a L-tyrozínu. Z L-fenylalanínu sa syntetizuje kyselina škoricová, z nej ďalej kyselina p-kumárová a kyselina kávová. Z L-tyrozínu cez 3,4-dihydroxyfenylalanín a kyselinu 3,4-dihydroxyfenylpyrohroznovú sa syntetizuje kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl) mliečna. V poslednej časti vzniku je z obidvoch prekurzorov syntetizovaná kyselina rozmarínová (Parnham a Kesselring, 1985). Biosyntézou kyseliny rozmarínovej sa experimentálne zaoberali Petersen (1991), Sumaryono et al. (1991), Mizukami et al. (1992), Szabo et al. (1999), Matsuno et al. (2001), Petersen et al. (2009) a Petersen (2013). Prítomnosť kyseliny rozmarínovej v liečivých rastlinách predstavuje prospešný a podporný efekt pre zdravie, pretože vykazuje vysokú biologickú aktivitu (Petersen a Simmonds, 2003), pričom boli zistené nasledovné účinky kyseliny rozmarínovej: antioxidantný (Almela et al., 2006; Erkan et al., 2008; Lee et al., 2008; Klančnik et al., 2009; Sánchez-Campillo et al., 2009; Berhow et al., 2012; Adomako-Bonsu et al., 2017), antibakteriálny (Romano et al., 2009), antimikrobiálny (Chakraborty et al., 2007; Klančnik et al., 2009), protizápalový (Cartron et al., 2001;

Boonyarikpunchai et al., 2014), antikarcinogénny (Venkatachalam et al., 2016), imunosupresívny (Yun et al., 2003), antisklerotický (Cartron et al., 2001), antidepresívny (Takeda et al., 2002), hepatoprotektívny (Lin et al., 2017), antiulcerogénny (Akhondzadeh et al., 2003; Mahmoud et al., 2005). Ďalej je známe, že kyselina rozmarínová zlepšuje citlivosť na inzulín, čo naznačuje potenciálny mechanizmus antidiabetického účinku, tiež znižuje hladinu lipidov v plazme (Karthik et al., 2011; Berhow et al., 2012). Výsledky vedeckých experimentov potvrdili, že kyselina rozmarínová môže mať praktické využitie v potravinárskom priemysle (Šihlár et al., 2004), predovšetkým ako prírodný antioxidant využívaný na zvýšenie trvanlivosti tukov a olejov, tukových výrobkov a iných potravín obsahujúcich tuky a oleje ako významnú zložku (Pokorný a Schmidt, 2003), vo farmaceutickom a kozmetickom priemysle ako perspektívny antioxidant v liečebných kozmetických prípravkoch, tiež protizápalová a antimikrobiálna zložka v prípravkoch ústnej hygieny (Holzmannová, 1996). Produkty obsahujúce kyselinu rozmarínovú môžu byť využívané v humánnej medicíne (Fecka et al., 2002), napr. ako doplnky výživy pri liečbe srdcových ochorení (Fonteles et al., 2016). Obsah kyseliny rozmarínovej bol experimentálne potvrdený vo viacerých čeľadiach, napr. hluchavkovité (*Lamiaceae*), borákovité (*Boraginaceae*), mrkvovité (*Apiaceae*) a skorocelovité (*Plantaginaceae*). Ďalšie výsledky chemických analýz potvrdzujú zastúpenie kyseliny rozmarínovej v čeľadiach *Blechnaceae*, *Zosteraceae* a *Cannaceae* (Petersen et al., 2009). Podľa údajov, ktoré uvádzajú Bandoniene et al. (2005) a Rady a Nazif (2005), medzi významné a perspektívne druhy vyšších rastlín obsahujúce kyselinu rozmarínovú patrí bazalka pravá (*Ocimum basilicum* L.), brečtan popínavý (*Hedera helix* L.), rozmarín lekársky (*Rosmarinus officinalis* L.), levanduľa lekárska (*Lavandula angustifolia* L.), hrdobarka obyčajná (*Teucrium chamaedrys* L.). Pomerne vysoký obsah kyseliny rozmarínovej (5,1%) bol zistený v rožkatci (*Anthroceros agrestis* Paton.) (Vogelsang et al., 2005). Šalvia lekárska, hluchavkovité (*Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) je liečivá rastlina, chamefyt, pôvodom zo Stredomora, hlavne v Dalmácii, pestovaná v kultúrnych agroekologických podmienkach (Habán et al., 2004). Pestujú sa rôzne odrody, z ktorých sa zberá list – *Salviae officinalis folium* a pripravuje šalviová tinktúra – *Salviae tinctura*. Predmetom zberu býva aj bylinná časť vňate, zberaná pred kvitnutím – *Salviae officinalis herba* (Jahodář et al., 1999). Terapeuticky účinné látky šalvie lekárskej sú silica (0,5 – 2,5%) obsahujúca zmes α - a β -tujónu (35 – 60%) a ďalšie monoterpény (celkovo asi 20%), seskviterpény, triesloviny, flavonoidy (1 – 3%), triterpény (kyselina oleánová a jej deriváty), diterpénové horčiny (karnosol, tzv. pikrosalvín), diterpénový laktón abietánového typu, tiamín, kyselina nikotínová (Tomko et al., 1999). Kamatou et al. (2010) analyzovali obsah kyseliny rozmarínovej v 16 druhoch rodu *Salvia*, pričom najvyššie zastúpenie RA bolo v druhoch *Salvia albicaulis*, *S. muiirii*, *S. runcinata*. Súčasne bol potvrdený obsah kyseliny kávovej v 12 analyzovaných druhoch; v štyroch druhoch *S. africana-lutea*, *S. garipensis*, *S. radula* a *S. stenophylla* nebol obsah kyseliny kávovej zistený. Z 11 európskych druhov šalvií bola potvrdená najvyššia antioxidačná aktivita 40% metanolového extraktu s priemerným obsahom kyseliny rozmarínovej 4,12%, kyseliny kávovej 0,11% a celkovým obsahom flavonoidov 0,68% v *Salvia candelabrum* (Hohmann et al., 2003).

Materiál a metodika

Poľný polyfaktorový pokus bol založený v rokoch 2013 – 2015 na experimentálnej ploche Vysokoškolského poľnohospodárskeho podniku SPU s.r.o. Kolíňany (VPP SPU, s.r.o. Kolíňany) metódou delených dielcov usporiadaný v troch samostatných blokoch s tromi opakovaniami. Oblasť sa geomorfologicky nachádza v Žitavskej pahorkatine, samostatnej jednotke Podunajskej nížiny. Táto oblasť patrí do agroklimatickej oblasti teplej, podoblasti suchej a okrsku prevažne miernej zimy (Špánik et al., 1996). Priemerná mesačná teplota vzduchu v porovnaní s dlhodobým klimatickým normálom experimentálneho územia v rokoch 2013 - 2015 je uvedená v tabuľke 1, mesačný úhrn zrážok v porovnaní s dlhodobým klimatickým normálom pre danú oblasť je uvedený v tabuľke 2. Obsah kyseliny rozmarínovej bol sledovaný v šiestich odrodách šalvie lekárskej (*Salvia officinalis* L.) a to 'Krajová', 'Purpurascens', 'Berggarten', 'Tricolor', 'Icterina' a 'Alba'. Nadzemné časti rastlín (vňat') boli odoberané v období pred kvitnutím a v čase plného kvitnutia.

Table 1. Average month temperatures (°C) during evaluated vegetation seasons (2013 – 2015) in comparison with average value (Ø) in 1961 – 1990

Tabuľka 1. Priemerné mesačné teploty (°C) počas hodnotených vegetačných období (2013 – 2015) v porovnaní s priemernou hodnotou (Ø) za obdobie 1961 – 1990

Month Mesiac	Long-term average Dlhodobý priemer (°C)	2013		2014		2015	
		°C	Δ t	°C	Δ t	°C	Δ t
III	5	2,8	-2,3 Cold Studený	9,3	4,3 Very warm Veľmi teplý	4,2	-0,8 Normal Normálny
IV	10,4	11,7	1,3 Warm Teplý	12,4	2 Warm Teplý	8,5	-1,9 Cold Studený
V	15,1	15,2	0,1 Normal Normálny	15,1	0 Normal Normálny	12,8	-2,3 Very cold Veľmi studený
VI	18	18,5	0,5 Normal Normálny	19,3	1,3 Warm Teplý	17,3	-0,7 Normal Normálny
VII	19,8	22,2	2,4 Very warm Veľmi teplý	21,8	2 Warm Teplý	21	1,2 Warm Teplý
VIII	19,3	22,9	3,6 Very warm Veľmi teplý	19,3	0 Normal Normálny	21,2	1,9 Warm Teplý

Table 2. Average precipitation (mm) of the experimental site on the years 2013 – 2015 in comparison with average value ($\bar{\varnothing}$) in 1961 – 1990

Tabuľka 2. Priemerný úhrn zrážok (mm) experimentálneho územia v rokoch 2013 – 2015 v porovnaní s priemernou hodnotou ($\bar{\varnothing}$) za obdobie 1961 – 1990

Month Mesiac	Long-term average Dlhodobý priemer (mm)	2013		2014		2015	
		mm	(%)	mm	(%)	mm	(%)
III	30	93,2	310,7 Extremely wet Mimoriadne vlhký	15,4	51,3 Dry Suchý	44,4	148 Wet Vlhký
IV	39	23	59 Dry Suchý	48,9	125,4 Normal Normálny	25,6	65,6 Dry Suchý
V	58	65,6	113,1 Normal Normálny	57,6	99,3 Normal Normálny	83	143,1 Wet Vlhký
VI	66	54,8	83 Normal Normálny	52,5	79,6 Normal Normálny	23,6	35,8 Very dry Veľmi suchý
VII	52	2,2	4,2 Extremely dry Mimoriadne suchý	64,1	123,3 Normal Normálny	26,4	50,8 Dry Suchý
VIII	61	15,4	114,8 Normal Normálny	55,9	91,6 Normal Normálny	77,4	126,9 Wet Vlhký

Table 3. Time of harvesting of herb of sage (*Salvia officinalis* L.)

Tabuľka 3. Termín zberu vňate šalvie lekárskej (*Salvia officinalis* L.)

Year Ročník	Time of harvesting Termín zberu	
	1 st time of harvesting 1. termín zberu	2 nd time of harvesting 2. termín zberu
	2013	28/6
2014	24/6	13/8
2015	30/6	8/8

Termíny zberu vňate sledovaných odrôd šalvie lekárskej (*Salvia officinalis* L.) v jednotlivých rokoch sú uvedené v tabuľke 3. Odobrané vzorky vňate boli prenesené do laboratória, kde boli sušené pri izbovej teplote, kým nedosiahli konštantnú hmotnosť. Kyselina rozmarínová bola stanovovaná metodickým postupom podľa Wang et al. (2004), ktorý bol modifikovaný pre podmienky kvapalinovej chromatografie HPLC Waters Breeze (Waters Corporation Systems, CA, USA) na Katedre udržateľného poľnohospodárstva a herbológie Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov SPU v Nitre. Rozdrobená droga o hmotnosti 0,5 g bola zaliata 25 ml roztokom metanolu a vody (30 : 70, v/V), extrahovaná v ultrazvukovom kúpeli 10 minút, následne 5 minút centrifugovaná pri 8000 ot/min. Supernatant, horná čistá vrstva bola odobraná, rezíduá zaliata 20 ml roztokom metanolu a vody (30 : 70, v/V). Extrakcia bola opakovaná v ultrazvukovom kúpeli 5 minút a centrifugovaná 5 minút pri 8000 ot/min. Obidva extrakty sme spojili, odobrali sme 1 ml extraktu, ktorý sa centrifugoval pri 15 – 21000 ot/min a následne dávkovali do HPLC. Podmienky chromatografie: Waters Breeze s detektorom 2487 dual UV-VIS, 330 nm, kolóna Waters Spherisorb ODS2, 5 mikrometrov, 4,6x150 mm; mobilná fáza A: 0,1% kyselina fosforečná, B: 0,1% kyselina fosforečná v metanole, prietok 1 ml/min. Gradient: 1 min: 60% A, 40% B; 10 min: 40% A, 60% B.

Štatistické vyhodnotenie

Všetky hodnoty sú uvedené ako priemer \pm S.D. Údaje boli hodnotené analýzou rozptylu, Fisherov LSD test s použitím programu Statistica Cz verzia 7.1. Štatisticky významné rozdiely boli hodnotené ako $P < 0.05$, štatisticky vysoko významné rozdiely boli hodnotené ako $P < 0.001$.

Výsledky a diskusia

V práci sme sledovali obsah kyseliny rozmarínovej v šiestich odrodách šalvie lekárskej (*Salvia officinalis* L.) počas rokov 2013-2015 pestovaných na lokalite VPP SPU, s.r.o. Kolíňany (tabuľka 4). Z výsledkov vyplýva, že najvyšší obsah kyseliny rozmarínovej bol zistený pri odrode 'Tricolor' $30084,65 \pm 132,03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ v roku 2013, zberanej v prvom termíne. Najnižšia hodnota bola zaznamenaná pri odrode 'Berggarten' $9000,5 \pm 79,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ v roku 2015 v druhom termíne zberu. Na základe priemerných hodnôt obsahu kyseliny rozmarínovej v sledovaných odrodách šalvie lekárskej v rámci troch sledovaných ročníkov pri 1. termíne zberu je poradie od najnižšej hodnoty nasledované: 'Berggarten' < 'Alba' < 'Purpurascens' < 'Icterina' < 'Tricolor' < 'Krajová' (tabuľka 5). Po 2. termíne zberu boli hodnoty obsahu kyseliny rozmarínovej výrazne nižšie, čo súvisí s ontogenickou variabilitou a poradie jednotlivých odrôd bolo od najnižšej hodnoty nasledovné: 'Berggarten' < 'Icterina' < 'Alba' < 'Purpurascens' < 'Krajová' < 'Tricolor'. Podobné výsledky publikovali (Farhat et al., 2014), ktorí uvádzajú štatisticky významné rozdiely v obsahu kyseliny rozmarínovej v šalvi lekárskej (*Salvia officinalis* L.) medzi odberom pred kvitnutím ($11723,29 \pm 343,69 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ suš.) a odberom v čase plného kvitnutia ($9171,35 \pm 58,05 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ suš.). V odrodovom experimente so šalviou lekárskou bol metódou viacfaktorovej analýzy rozptylu potvrdený štatisticky vysoko preukazný vplyv odrody,

ročníka a termínu zberu na obsah kyseliny rozmarínovej v šalvii lekárskej (*Salvia officinalis* L.) (tabuľka 5).

Table 4. Rosmarinic acid content in the monitored varieties of sage (*Salvia officinalis* L.) ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dry weight)

Tabuľka 4. Obsah kyseliny rozmarínovej v sledovaných odrodách šalvie lekárskej (*Salvia officinalis* L.) ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suš.)

Variety Odroda	Year Rok	Rosmarinic acid content ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dry weight) Obsah kyseliny rozmarínovej ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suš.)	
		1 st time of harvesting 1. termín zberu	2 nd time of harvesting 2. termín zberu
'Krajová'	2013	29104,84±237,21 ¹	10378,7±213,44
	2014	29049,32±259,64	14539,3±234,98
	2015	21181,25±291,4	10926,8±158,3
	Average Priemer	26445,14	11948,27
'Purpurascens'	2013	21490,75±301,46	11568,25±199,04
	2014	21698±301,39	12231,75±140,26
	2015	19040,75±235,5	9152,8±74,4
	Average Priemer	20743,17	10984,27
'Berggarten'	2013	21079,25±328,21	10236±105,89
	2014	19785,49±309,5	9994±159,89
	2015	17569±313,58	9000,5±79,1
	Average Priemer	19477,91	9743,5
'Tricolor'	2013	30084,65±132,03	14368±131,77
	2014	25102,75±241,34	12813,75±181,82
	2015	23634,25±133,11	11631,5±157,19
	Average Priemer	26273,88	12937,75
'Icterina'	2013	22015±273,87	9984±150,43
	2014	23401,15±354,85	10570,75±155,16
	2015	21480±262,88	11378±189,41
	Average Priemer	22298,72	10644,25
'Alba'	2013	19873±349,36	11306,75±86,2
	2014	20614,8±194,34	10571,2±56,87
	2015	19085,25±178,58	10152,8±68,25
	Average Priemer	19857,68	10676,92

The data are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

Údaje sú vyjadrené ako priemer \pm smerodajná odchýlka (SD).

Štatisticky vysoko preukazný obsah kyseliny rozmarínovej ($P < 0,001$) bol zistený pri odrode 'Tricolor' v porovnaní s odrodami 'Berggarten' a 'Alba', štatisticky preukazný rozdiel ($P < 0,05$) bol zistený iba medzi odrodou 'Tricolor' a 'Purpurascens'.

Table 5. Average values of rosemary acid content in different varieties of sage (*Salvia officinalis* L.)

Tabuľka 5. Priemerné hodnoty obsahu kyseliny rozmarínovej v rôznych odrodách šalvie lekárskej (*Salvia officinalis* L.)

Observed factor Sledovaný faktor		Rosmarinic acid content (mg*kg ⁻¹ dry weight) Obsah kyseliny rozmarínovej (mg*kg ⁻¹ suš.)	Significance Preukaznosť	
			$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,001$
Variety Odroda	'Berggarten'	14610,71	a	a
	'Alba'	15267,3	a	ab
	'Purpurascens'	15863,72	ab	abc
	'Icterina'	16471,49	abc	abc
	'Krajová'	19196,71	bc	bc
	'Tricolor'	19605,82	c	c
Year Rok	2015	13562,74	b	b
	2014	17522,69	a	a
	2013	17624,12	a	a
Time of harvesting Termín zberu	1 st time of harvesting 1. termín zberu	22516,08	a	a
	2 nd time of harvesting 2. termín zberu	11155,83	b	b

a, b, c - means with the same lowercase letters are not significantly different, $\alpha=0.05$; $\alpha=0.001$.
a, b, c - hodnoty označené rovnakým písmenom nie sú štatisticky významné, $\alpha=0,05$; $\alpha=0,001$.

Pri odrode 'Krajová' bol potvrdený vysoko preukazný rozdiel s odrodou 'Berggarten' a preukazný rozdiel s odrodou 'Alba'. Medzi odrodami 'Berggarten', 'Alba', 'Purpurascens' a 'Icterina' neboli v obsahu kyseliny rozmarínovej zistené štatisticky významné rozdiely. V rámci experimentálnych rokov bol najnižší obsah kyseliny rozmarínovej ($13562,74 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) bol zistený v roku 2015. Mesiace jún a júl v tomto roku boli zrážkovo hodnotené ako veľmi suché a suché. To mohlo byť dôvodom preukazne nižšieho obsahu kyseliny rozmarínovej oproti roku 2013 a 2014, kedy boli úhrny zrážok vyššie. Výsledky našich pokusov korešponujú so závermi, ktoré uvádzajú vo svojich prácach viacerí autori (Tóth et al., 2003; Habán et al., 2009), pričom uvádzajú, že priebeh počasie sa najvýraznejšie prejavil pri šalvii lekárskej a mäte piepornej. Pri porovnávaní termínov zberu sme potvrdili štatisticky významný rozdiel medzi 1. a 2. termínom zberu. Priemerný obsah kyseliny rozmarínovej bol v prvom termíne dvojnásobne vyšší ($22516,08 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) oproti druhému termínu ($11155,83 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), čo súvisí s ontogenetickou variabilitou obsahovej účinnej látky. Z uvedených výsledkov vyplýva, že prvý termín zberu šalvie lekárskej vzhľadom na obsah kyseliny rozmarínovej je vhodnejší. V druhom termíne zberu za rovnakých pôdných a klimatických podmienok už rastliny nie sú schopné vyprodukovať porovnateľné množstvo kyseliny rozmarínovej v porovnaní s prvým termínom ich zberu. Tieto výsledky sa zhodujú s výsledkami, ktoré publikovali Farhat et al. (2014), ktorí sledovali zmeny obsahových látok, predovšetkým zmeny polyfenolového zloženia v šalvii lekárskej (*Salvia officinalis* L.) v priebehu fenologického cyklu v dvoch regiónoch severného Tuniska sledovali. Uvádzajú, že počas vegetačného obdobia sa obsah kyseliny rozmarínovej znižuje. V teplých klimatických podmienkach Maďarska (Vácrátót, 30 km severne od Budapešti) potvrdili najväčšie zastúpenie kyseliny rozmarínovej v mesiacoch apríl a júl pri *Salvia officinalis*, v máji pri *S. candelabrum*, *S. fruticosa* a *S. tomentosa*, v júni pri *S. lavandulifolia*.

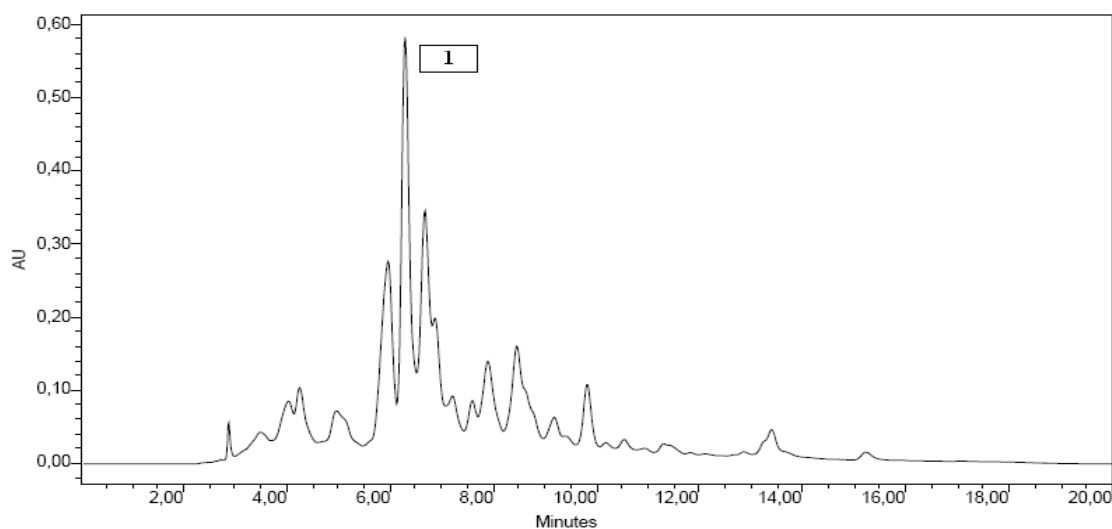


Figure 1. HPLC chromatogram of extract from sage (*Salvia officinalis* L.),
1 - rosmarinic acid

Obrázok 1. HPLC chromatogram extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis* L.),
1 - kyselina rozmarínová

Najvyššia koncentrácia kyseliny kávovej bola zaznamenaná v mesiaci apríl pri *S. officinalis* a mesiaci máj pri druhoch *S. candelabrum* a *S. fruticosa*. Hodnotením obsahových látok v troch odrodách šalvie lekárskej (*Purpurascens*, *Tricolor* a *Kew Gold*) sa zaoberali Böszörményi et al. (2009).

Záver

V práci bol sledovaný obsah kyseliny rozmarínovej v šiestich odrodách šalvie lekárskej (*Salvia officinalis* L.): 'Krajová', 'Purpurascens', 'Berggarten', 'Tricolor', 'Icterina' a 'Alba' v dvoch termínoch zberu (jún a august) v pestovateľských ročníkoch 2013 - 2015. Na základe výsledkov je možné konštatovať, že na obsah RA v šalvii lekárskej (*Salvia officinalis* L.) štatisticky významne vplývala odroda, termín zberu aj pestovateľský ročník.

Podakovanie

Vedecká publikácia vznikla s podporou Výskumného centra AgroBioTech (ITMS 26220220180). Kolektív autorov ďakuje Ing. Ľubomírovi Kobidovi za realizáciu chemických analýz.

Literatúra

- Adomako-Bonsu, A. G., Chan, S. L. F., Pratten, M., Fry, J. R. (2017) Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicology in Vitro*, 40, 248-255.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.016>
- Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A. H., Khani, M. (2003) *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 28 (1), 53-59. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12605619> [Accessed 10 June 2017].
- Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J. A., Roca, M. J., Rabe, V. (2006) Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120 (1-2), 221-229.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.056>
- Bandoniene, D., Murkovic, M., Venskutonos, P. R. (2005) Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. *Journal of Chromatography Science*, 43 (7), 372-376. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16176651> [Accessed 6 May 2016].

- Berhow, M. A., Affum, A. O., Gyan, B. A. (2012) Rosmarinic acid content in antidiabetic aqueous extract of *Ocimum canum* Sims grown in Ghana. *Journal of Medicinal Food*, 15 (7), 611-620.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1089/jmf.2011.0278>
- Boonyarikpunchai, W., Sukrong, S., Towiwat, P. (2014) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 67-73.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2014.05.004>
- Böszörményi, A., Héthelyi, E., Farkas, A., Horváth, G., Papp, N., Lemberkovics, E., Szoke, E. (2009) Chemical and genetic relationships among sage (*Salvia officinalis* L.) cultivars and Judean sage (*Salvia judaica* Boiss.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (11), 4663-4667.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/jf9005092>
- Cartron, E., Carbonneau, M. A., Fouret, G., Descomps, B., Leger, C. L. (2001) Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. *Journal of Natural Products*, 64 (5), 480-486. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np000421u?journalCode=jnprdf> [Accessed 5 May 2017].
- Chakraborty, D., Mandal, S. M., Chakraborty, J., Bhattacharyya, P. K., Bandyopadhyay, A., Mitra, A., Gupta, K. (2007) Antimicrobial activity of leaf extract of *Basilicum polystachyon* (L.) Moench. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45, 744-748. Available at: http://www.niscair.res.in/ScienceCommunication/ResearchJournals/rejour/ijeb/ijeb2k7/ijeb_aug07.asp [Accessed 15 June 2017].
- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2008) Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110 (1), 76-82. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.058>
- Farhat, M. B., Chaouch-Hamada, R., Sotomayorc, J. A., Landoulsi, A., Jordán, M. J. (2014) Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. *Industrial Crops and Products*, 54, 78-85.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.001>
- Fecka, I., Mazur, A., Cisowski, W. (2002) Rosmarinic acid, an important therapeutic component of some herbal crude drugs. *Postepy Fitoterapii*, 3 (8), 20-25. Available at: <http://www.czytelniamedyczna.pl/2495,kwas-rozmarynowy-wazny-skladnik-terapeutyczny-niektorych-surowcow-roslinnych.html> [Accessed 5 May 2017].
- Fonteles, A. A., de Souza, C. M., de Sousa Neves, J. C., Fontenele Menezes, A. P., Santos do Carmo, M. R., Pinheiro Fernandes, F. D., de Araújo, P. R., de Andrade, G. M. (2016) Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice. *Behavioural Brain Research*, 297, 91-103.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.029>

- Habán, M., Vaverková, Š., Dančák, I., Souitkat, H., Červenková, S. (2004) Analysis of cultivated sage (*Salvia officinalis* L.) in the warm agro-climatical conditions. In: 3rd Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European countries. Nitra, Slovakia, 5-8 September 2004, Slovak University of Agriculture in Nitra.
- Habán, M., Martišková, B., Habánová, M., Kobida, L. (2009) Obsah kyseliny rozmarínovej vo vybraných liečivých rastlinách z čeľade hluchavkovité. Antioxidanty 2009, 83-88. Available at: http://www.slpk.sk/eldo/2009/zborniky/008_09/haban.pdf [Accessed 28 May 2017].
- Hohmann, J., Janicsák, G., Forgo, P., Rédei, D., Máthé, I., Bartók, T. (2003) New diterpenoids from the aerial parts of *Salvia candelabrum*. *Planta Medica*, 69 (3), 254-257. DOI: <https://dx.doi.org/10.1055/s-2003-38484>
- Holzmannová, V. (1996) Kyselina rozmarínová a její biologická aktivita. *Chemické listy*, 90, 486-496.
- Jahodář, L., Melicharová, E., Potrusilová, D. (1999) Makroskopický a mikroskopický atlas drog. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví.
- Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Steenkamp, P. (2010) Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*, 119, 684-688. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.010>
- Karthik, D., Viswanathan, P., Anuradha, C. V. (2011) Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 58 (5), 514-521. DOI: <https://dx.doi.org/10.1097/FJC.0b013e31822c265d>
- Klančnik, A., Guzej, B., Kolar, M. H., Abramovič, H., Možina S. S. (2009) In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72 (8), 1744-1752. Available at: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-72.8.1744> [Accessed 10 June 2017].
- Lee, J., Jung, E., Koh, J., Kim, Y. S., Park, D. (2008) Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *Journal of Dermatology*, 35, 768-771. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1346-8138.2008.00565.x>
- Lin, S. Y., Wang, Y. Y., Chen, W. Y., Liao, S. L., Chou, S. T., Yang, CH. P., Chen, Ch. J. (2017) Hepatoprotective activities of rosmarinic acid against extrahepatic cholestasis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 214-223. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.005>
- Mahmoud, A. A., Al-Shihry, S. S., Son, B. W. (2005) Diterpenoids quinones from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Phytochemistry*, 66 (14), 1685-1690. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.041>

- Matsuno, M., Nagatsu, A., Ogihara, Y., Mizukami, H. (2001) Synthesis of 2-O-(4-coumaroyl)-3-(4-hydroxyphenyl)lactic acid, an important intermediate of rosmarinic acid biosynthesis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49, 1644-1646. Available at: http://cpb.pharm.or.jp/cpb/200112/c12_1644.pdf [Accessed 15 May 2017].
- Mizukami, H., Ogawa, T., Ohashi, H., Ellis, B. E. (1992) Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract. *Plant Cell Reports*, 11, 480-483. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00232695> [Accessed 16 June 2017].
- Parnham, M. J., Kesselring, K. (1985) Rosmarinic acid. *Drugs of the future*, 10 (9), 756-757.
- Petersen, M. S. (1991) Characterization of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei*. *Phytochemistry*, 30, 2877-2881. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)98217-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)98217-7)
- Petersen, M., Simmonds, M. S. J. (2003) Rosemarinic acid. *Phytochemistry*, 62 (3), 121-125. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)
- Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K. H., Sander, M., Weitzel, C., Wolters, S. (2009) Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 7 (15-16), 663-1679. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.010>
- Petersen, M. (2013) Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Reviews*, 12 (1), 207-227. Available at: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11101-013-9282-8.pdf> [Accessed 10 June 2017].
- Pokorný, J., Schmidt, Š. (2003) The impact of food processing in phytochemicals: the case of antioxidants. In: Johanson, I., Williamson, G. (2003) *Phytochemical functional foods*. Cambridge: Woodhead Publishing, 298-302.
- Rady, M. R., Nazif, N. M. (2005) Rosmarinic acid content and RADP analysis of in vitro regenerated basil (*Ocimum americanum*) plants. *Fitoterapia*, 76 (6), 525-533. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2005.04.001>
- Romano, C. S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A. A., Moreno, S. (2009) Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry*, 115 (2), 456-461. Available at: http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/paper/paper_03088146_v115_n2_p456_Romano.pdf [Accessed 23 June 2017].
- Sánchez-Campillo, M., Gabaldon, J. A., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Baño, M. J., Alcaraz, M., Vicente, V., Alvarez, N., Lozano, J. A. (2009) Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (2), 386-392. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.026>
- Scarpati, M. L., Oriente, G. (1958) Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus off.*). *La Ricerca Scientifica*, 28, 2329-2333.

- Sumaryono, W., Proksch, P., Hartmann, T., Nimitz, M., Wray, V. (1991) Induction of rosmarinic acid accumulation in cell suspension cultures of *Orthosiphon aristatus* after treatment with yeast extract. *Phytochemistry*, 30, 3267-3271. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83190-V](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83190-V)
- Szabo, E., Thelen, A., Petersen, M. (1999) Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports*, 18, 485-489. Available at: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs002990050608.pdf> [Accessed 10 June 2017].
- Šihlár, S., Heilerová, Ľ., Daniš, M. (2004) Význam a možnosti zvýšenia príjmu antioxidantov v spoločnom stravovaní. In: *Výživa a potraviny pre tretie tisícročie Spoločné stravovanie*. Nitra, Slovakia, 13-14 October 2004, Slovenska poľnohospodárska univerzita v Nitre.
- Špánik, F., Repa, Š., Šiška, B. (1996) Klimatické a fenologické pomery Nitry (1961-1990). Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.
- Takeda, H., Tsuji, M., Inazu, M., Egashira, T., Matsumiya, T. (2002) Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmacology*, 449 (3), 261-267. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167468> [Accessed 17 May 2016].
- Tomko, J., Kresánek, J., Hubík, J., Suchý, V., Felklová, M., Sikyta, B., Libický, A. (1999) *Farmakognózia*. 2. vyd. Martin: Osveta.
- Tóth, J., Mrlianová, M., Tekeľová, D., Koreňová, M. (2003) Rosmarinic acid - an important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, 50, 139-146. Available at: https://www.barnys.cz/img/cms/certifikaty/Pharm-15_T_th_J-Mrlianov_i_M-Teke-ov_i_D-Kore_eov_i_M.pdf [Accessed 10 June 2017].
- Venkatachalam, K., Gunasekaran, S., Namasivayam, N. (2016) Biochemical and molecular mechanisms underlying the chemopreventive efficacy of rosmarinic acid in a rat colon cancer. *European Journal of Pharmacology*, 791, 37-50. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.051>
- Vogelsang, K., Schneider, B., Petersen, M. (2006) Production of rosmarinic acid and a new rosmarinic acid 3'-O-β-D-glucoside in suspension cultures of the hornwort *Anthoceros agrestis* Paton. *Planta*, 223 (2), 369-373. Available at: <http://www.springerlink.com/content/k923q33x84p54182/fulltext.pdf> [Accessed 14 April 2017].
- Wang, H., Provan, G. J., Helliwell, K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*, 87, 307-311. Available at: <http://download.xuebalib.com/xuebalib.com.41259.pdf> [Accessed 10 July 2017].

Yun, S. Y., Hur, Y. G., Kang, M. A., Lee, J., Ahn, C., Won, J. (2003) Synergistic immunosuppressive effects of rosmarinic acid and rapamycin in vitro and in vivo. *Transplantation*, 75 (10), 1758-1760.

DOI: <https://dx.doi.org/10.1097/01.TP.0000063933.12440.50>