

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО
ФИТОХИМИЯ

Ангел Николов Конакчиев

ЕТЕРИЧНИ МАСЛА ОТ СОРТОВЕ *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL.
И ВИДОВЕ ОТ РОД *ACHILLEA* L.

ДИСЕРТАЦИЯ

За получаване на образователната и научна степен “доктор”

Научен ръководител: доц. д-р Милка Тодорова

София, 2015

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам най-искрена благодарност на научният ми ръководител доц. д-р Милка Тодорова за ценните съвети и напътствия при разработването на дисертацията. Благодаря на доц. Антонина Виткова за предоставените растителни материали, проведените задълбочени дискусии по хемосистематиката на рода *Achillea* и възможността да работя по тази интересна тематика. Благодаря на моите учители проф. д-р Илия Огнянов и доц. д-р Елена Цанкова за старта който ми дадоха въвеждайки ме в интересната област на изследване на етеричните масла, на проф. Аглика Едрева и доц. д-р Люба Евстатиева за знанията, които ми дадоха по отношение на генетика, ботаника и систематика. Благодаря на доц. д-р Антоанета Трендафилова за ценната помощ, която ми оказа при статистическата обработка на данните и за ползотворните дискусии. Благодаря на всички колеги за огромната подкрепа, която ми оказаха в цялостната работа по изготвяне и оформяне на дисертацията, на фирма „Булаттарс“ за частичното финансиране на изследванията и на семейството си за моралната подкрепа.

Благодаря на колегите от Лабораторията по Химия на Природните Вещества, на лаб по инструментална хроматография ИОХ-ЦФ, БАН.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на кирилица

ГХ – газова хроматография

ГХ-ИЧ - газова хроматография - инфрачервена спектроскопия

ГХ-МС – газова хроматография – масспектрометрия

ИЧ – инфрачервена спектроскопия

КХ – колонна хроматография

МС – мас-спектрометрия

ТСХ – тънкослойна хроматография

УВ – ултравиолетова спектроскопия

ЯМР – ядреномагнитен резонанс

Съкращения на латиница

MDGC - мултидименсионална газова хроматография

I.D. – вътрешен диаметър

RSD – относително стандартно отклонение

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	7
ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	8
1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	9
1.1. Етерични масла	9
1.1.1. Етеричномаслени хранилища.....	9
1.1.2. Получаване на етерични масла.....	10
1.1.3. Лабораторни методи за извличане на летливи вещества.....	11
1.1.3.1. Апарат на Клевенджер.....	11
1.1.3.2. Апарат на Гинзберг.....	13
1.1.3.3. Апарат на Ликенс-Никерсон	13
1.1.4. Методи за химичен анализ на етерични масла.....	15
1.1.4.1. Тънкослойна хроматография.....	15
1.1.4.2. Газова хроматография.....	16
1.1.4.2.1. Свърхбърза газова хроматография.....	17
1.1.4.2.2. Енантиселективна газова хроматография.....	17
1.1.4.2.3. Мултидименсионална газова хроматография.....	18
1.1.5. Биосинтез на моно и сески терпеноиди.....	19
1.1.5.1. Мевалонов път за получаване на изопреноиди.....	20
1.1.5.2. Биосинтез на монотерпеноиди.....	21
1.1.5.3. Получаване на „Неправилни скелети“	25
1.1.5.4. Биосинтез на сескитерпеноиди.....	26
1.2. Лавандула	29
1.2.1. Кратки данни за род <i>Lavandula</i> L.....	29
1.2.2. Ботаническа характеристика и разпространение на <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.....	29
1.2.3. Сортове лавандула.....	30
1.2.4. Жътва на лавандулов цвят.....	34

1.2.5. Получаване на лавандулово масло.....	34
1.2.6. Химичен състав на лавандулово масло.....	37
1.3. <i>Achillea</i>	42
1.3.1. Кратки данни за род <i>Achillea</i> L. (Равнец).....	42
1.3.2. Ботаническа характеристика и разпространение на <i>Achillea millefolium</i> group.....	42
1.3.3. Характеристики на етеричните масла на видове <i>Achillea</i>	44
1.3.3.1. Присъствие на хамазулен в етерични масла от видове <i>Achillea</i>	52
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ.....	54
2.1. Материали и методи.....	54
2.1.1. Растителен материал.....	54
2.1.1.1. Лавандула.....	54
2.1.1.2. <i>Achillea</i>	54
2.1.2. Изолиране на етеричното масло.....	56
2.1.2.1. Лавандула.....	56
2.1.2.2. <i>Achillea</i>	56
2.1.3. Анализ на етеричните масла.....	57
2.1.4. Клъстерен анализ.....	58
3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	59
3.1. Лавандула.....	59
3.1.1. Определяне химичния състав на лавандулови масла от различни сортове.....	59
3.1.2. Влияние на степента на цъфтеж на лавандуловите съцветия върху количеството и химичния състав на етеричното масло.....	64
3.1.2.1. Влияние на степента на цъфтеж на лавандуловите съцветия върху етерично масленото съдържание.....	64
3.1.2.2. Влияние на степента на цъфтеж на лавандуловите съцветия	

върху количествения състав на характерни компоненти на етеричното	
масло.....	65
3.1.3. Енантиомерен състав на лавандулови масла.....	73
3.2. <i>Achillea</i>	76
3.2.1. Определяне на химичния състав на етерични масла от видове	
от род <i>Achillea</i>	76
3.2.1.1. <i>A. crithmifolia</i>	76
3.2.1.2. <i>A. asplenifolia</i>	80
3.2.1.3. <i>A. collina</i>	83
3.2.1.4. <i>A. distans</i>	89
3.2.2. Влияние на методите за изолиране на етерични масла	
върху количеството и качеството на маслото.....	93
 ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ.....	97
 ПРИНОСИ.....	99
 4. ЛИТЕРАТУРА.....	100
Публикации във връзка с дисертацията.....	110
Забелязани цитати.....	112

ВЪВЕДЕНИЕ

Лечебните растения са обект на особено внимание през последните години. Те са важна част от растителните ресурси на България. Много от тях са богати на етерични масла, които са обект на изследване от десетилетия. Етеричните масла са много различни по отношение на аромат дължащ се на изключително голямото разнообразие от компоненти, участващи в тях. Научните изследвания през годините са доказали много възможности за приложение на етеричните масла – в медицинската практика като хранителни добавки, репеленти, ароматерапия; в селското стопанство като инсектициди; в парфюмерията и козметиката и т.н. В много случаи те могат да бъдат използвани и като хемотаксономични маркери в помощ на систематика на видове на различно ботаническо ниво.

Лавандулата е етерично-маслена култура с основно промишлено значение в България и маслото, получено от нея, намира широко приложение в парфюмерията, козметиката и не на последно място в ароматерапията. У нас диворастящи представители на род *Lavandula* не се срещат. *L. angustifolia* Mill. се култивира и са създадени над 15 сорта, от които в момента практически се използват 7 от тях. Досега изследванията върху състава на техните етерични масла се ограничават до определяне на основни компоненти. Липсват данни за пълен анализ – количествен, качествен и енантиомерен състав.

За разлика от лавандулата, която у нас е известна само като културно растение, 20 вида от род *Achillea* се срещат в естествени популации. Етеричното масло и екстракти от някои видове се използват за изготвяне на козметични и апетито възбуждащи средства. С лечебни свойства, като противовъзпалителни, спазмолитични и противожлъчни са известни представителите, включени в групата *Millefolium*, от които в България са разпространени 6 вида. Поради това, че морфологично трудно се различават, на практика всички бяло-цъфтящи видове се събират и използват като билка „Herba Millefolii”. Изследванията през последните години върху етеричните масла от видовете на група *Millefolium* показват голяма вариабилност и са правени опити за използване на етерично-маслените компоненти като хемотаксономични маркери. Химичният състав етеричните масла от българските видове от тази група не са изучавани до започване на настоящите изследвания.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Изследванията в настоящата работа са насочени към изучаване на етерични масла от представители на род лавандула и род *Achillea* L. от български произход.

Цели на настоящата дисертация са:

- Изследване на химичния състав на етерично масло от 7 български сорта лавандула и влиянието на степента на цъфтеж върху количеството и качеството на маслото.
- Сравнително изследване на химичния състав на етерични масла от видове *Achillea*;

За постигането на тези цели е необходимо изпълнението на следните задачи:

1. Получаване на етерични масла от седем сорта лавандула;
2. Определяне химичният състав на получените лавандулови масла;
3. Провеждане на сравнителен качествен и количествен анализ на етерични масла, получени при пет степени на цъфтеж на подбраните сортове лавандула;
4. Определяне на енантиомерната чистота на камфор, линалол и линалил ацетат в лавандулови масла;
5. Получаване и сравнителен качествен и количествен анализ на етерични масла, от четири вида *Achillea*;
6. Изследване влиянието на начина на дестилация върху количествения и качествен състав на етеричното масло от *A. collina* сорт *Proa*.
7. Интерпретиране на получените резултати за видовете *Achillea* от хемотаксономична гледна точка.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. Етерични масла

Растителните ароматични вещества са известни още от антични времена, като наименованието „етерично масло“ се появява много по-късно, през средните векове, в ерата на алхимиците, когато от растения чрез водно-парна дестилация са получени силно миришещи маслообразни вещества. Тези нови масла са получили латинското си наименование *olea aetherea* (*етерични масла*) от гръцката дума **aither**, означаваща горния, най-лек и прозрачен слой на въздуха, който достига до връх Олимп, както и тънка всепроникваща материя.

Етеричните масла са сложни смеси от летливи с водна пара ароматични вещества, основно терпеноиди, по-рядко ароматни и алифатни съединения, получени от различни части на растенията и определящи техния приятен аромат. Те са несмесващи се с водата и лесноразтворими в органични разтворители. Обикновено етеричните масла са течни, но някои от тях при стайна температура са полутвърди или твърди. Течната част, т. нар. елеоптен, съдържа предимно ароматичните компоненти на маслото, а твърдата, т. нар. стеароптен – съдържа восъци (розово масло) и/или голямо количество кристални терпеноиди (здравецово масло) (Георгиев и Стоянова, 2006).

Много от етеричните масла и техните компоненти притежават бактерицидно, антисептично, противовъзпалително действие, положително въздействие на нервната система, благотворно повлияват емоционалното и психическото състояние, благодарение на което те намират широко приложение в медицината и в частност в ароматерапията (Buchbauer, 2002).

1.1.1. Етеричномаслени хранилища

Етеричните масла могат да се намират в протоплазмата или в клетъчния сок в разтворено или емулгирано състояние, могат да се натрупват в отделни клетки – идиобласти (блатен аир, дафинов лист, камфорово дърво) или да се концентрират в определени вместилища.

Етеричномаслените вместилища на растенията се разделят на външни (екзогенни), разположени по повърхността на органите (сем. *Lamiaceae*, *Asteraceae*) и са образувания на епидермалната тъкан, и вътрешни (ендогенни), изградени от живи клетки, заграждащи специални кухини (сем. *Rutaceae*), в които се отделя маслото, или от мъртви клетки, в които е натрупано етеричното масло (кантарион) (Георгиев, 1980).

Типът разпределение на етеричното масло в растението е в основата на избора на оптималния начин за неговото изолиране. Екзогенните вместилища са разположени на повърхността на обвивката на растенията и са най-податливи за екстракция. Стените на екзогенните хранилища са тънки, лесно се разрушават от парата и извличането на етеричното масло протича бързо и ефективно. Като правило, при обработка на растенията, съдържащи етерично масло, съсредоточено в екзогенни вместилища, е необходима краткотрайна парна дестилация за пълното му извличане.

При локализация на етеричното масло в ендогенни вместилища е необходимо по-дълго време за пълното извличане на веществата с водната пара. Това най-вече се отнася за случаите, когато за вместилища служат канали, скрити дълбоко в тъканите на растенията – дървесина, сърцевина на стъбла и корени.

1.1.2. Получаване на етерични масла

Естествени ароматични продукти могат да се получат от различни части на растенията – цветове, кора, дървесина и други. Основните методи за изолиране на етерични масла са:

- Дестилация с водна пара при атмосферно, повишено или понижено налягане в периодично или непрекъснато действащи апарати. Тя се разделя на три типа:
 - Водна дестилация – обработваната суровина се залива с вода и апаратът се загрява до кипене с външен топлоизточник. Методът е незаменим за суровини, проявяващи склонност към слепване в плътна маса, непозволяваща преминаване на парата през нея.
 - Водно-парна дестилация – суровината се разполага на решетка над повърхността на кипящата вода; суровината не е в пряк контакт с водата, а само с водната пара.
 - Парна дестилация – през суровината, отдолу нагоре се пропуска пара от външен парогенератор. Под слоя суровина практически няма вода. Вариант на парната дестилация е хидродифузията, при която водната пара се подава отгоре надолу, което съкращава времето на дестилационния процес и намалява разхода на пара.

Други методи за получаване на естествени ароматични продукти са:

- Анфлѳораж – адсорбция на ароматичните вещества от слой твърда мазнина, най-често животинска.
- Мацерация – екстракция на ароматичните вещества с течни растителни масла или разтопена твърда мазнина (растителна или животинска) при обикновена или повишена (50-70°C) температура.
- Екстракция с неполярни органични разтворители с последващо отдестилиране на екстрагента и получаване на конкрет. След отделяне на восъците от конкретата, чрез утаяването им в етанол и последващо концентриране на етанолния екстракт се получава абсолю.
- Суперкритична екстракция (екстракция с втечнени газове).
- Студено пресоване с последващо центрофугиране.

Получените ароматични продукти чрез анфлѳораж, мацерация или екстракция, наречени натурални цветочни масла, за разлика от етеричните масла са много по-близки по аромат до този на растителния източник от който са получени.

1.1.3. Лабораторни методи за извличане на летливи вещества

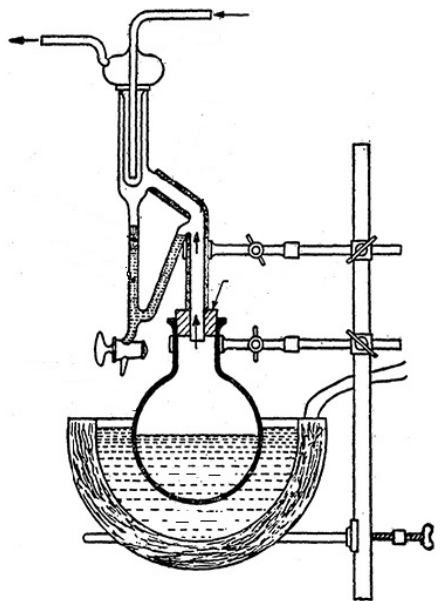
При лабораторните методи за извличане на летливи вещества има такива, които наподобяват умалено копие на промишлено използваните процеси, такива, които още не са намерили промишлено приложение или които са специално разработени за изолиране на малки количества вещества в лабораторни условия за целите на количествения и качествен анализ.

Преобладаващата част от етеричните масла имат плътност по-малка от 1,0 гр/см³. В процеса на дестилация с водна пара, след кондензация и разслояване на дестилата, етеричното масло образува тънък слой на повърхността. Обикновено, обезмасленият дестилат се връща в дестилационната колба за редестилация (кохобация) с цел максимално извличане на маслото. Необходимо е да се осигури задържане в апарата на разслоеното етерично масло.

1.1.3.1. Апарат на Клевенджер.

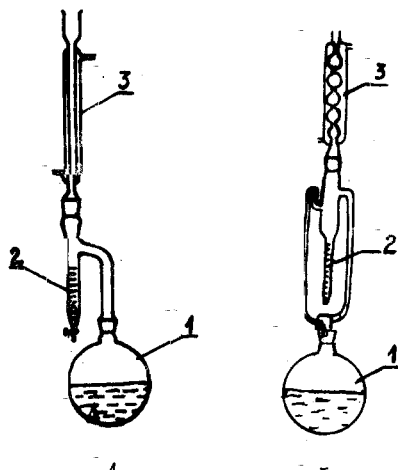
Апаратът на Клевенджер (Фиг. 1) е един от първите лабораторни апарати за определяне на етеричномасленото съдържание на растителен материал, чрез изолиране на етеричното масло с водна пара (Clevenger, 1928). В него суровината се зарежда в дестилационната колба, залива се с вода и се загрява до кипене. Образованите пари се издигат по паропроводната трѳба, която обикновено се обвива с термоизолиращ

материал. Парите кондензират в хладник и полученият дестилат постъпва в приемник-отстойник, където водата и маслото се разслояват, а обезмасленият дестилат се връща в дестилационната колба през водовъзвратната тръбичка.



Фиг. 1 Апарат на Клевенджер

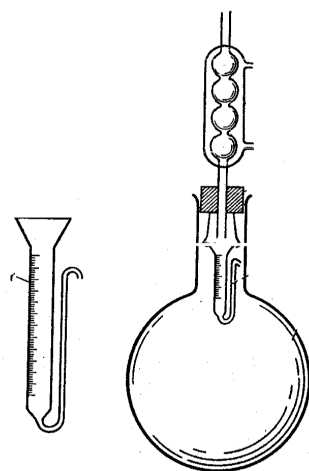
За етерични масла с плътност $> 1,0 \text{ гр/см}^3$, за определяне на съдържанието им в растителни суровини или за изолирането им в чист вид може да се използва модифицирания апарат на Клевенджер или апарата на Дийн-Старк (Фиг. 2). Етеричното масло се събира в долната част на приемника (отстойника), а обезмасленият дестилат, който образува слой над маслото, се връща в дестилационната колба от горната част на приемника.



Фиг. 2 Апарат на Дийн-Старк

1.1.3.2. Апарат на Гинзберг

Определянето на съдържанието на етерично масло в растителни суровини може да се определя и по метода на Гинзберг (фиг. 3), който е публикуван 1932 г. (Ткачѐв, 2008). При апарата на Гинзберг приемникът на етерично масло се намира вътре в дестилационната колба, съдържаща растителния материал, залят с вода. Този метод се използва за суровини, съдържащи масло, устойчиво на продължително нагряване в присъствие на вода, защото приемникът се намира в горещата зона на апарата.

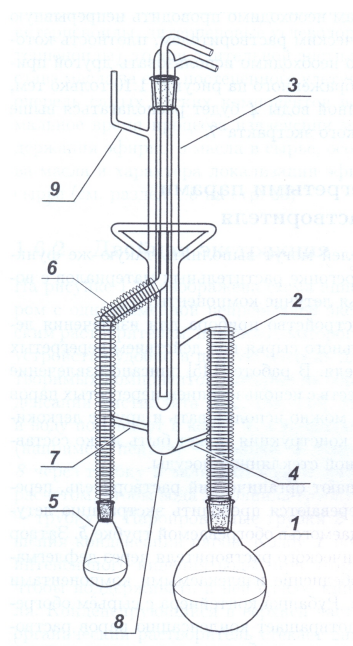


Фиг. 3 Апарат на Гинсберг.

1.1.3.3. Апарат на Ликенс-Никерсон

На фигура 4 е показан апарат на Ликенс-Никерсон за микродестилация с водна пара и едновременна непрекъсната екстракция на дестилата с нискокипящ органичен разтворител, с плътност по-малка от тази на водата. На първо място, този апарат е удобен за изолиране на микроколичества етерично масло за целите на количествения и качествен анализ, както и за изолиране на етерични масла с плътност близка до тази на водата. Изследваната растителна суровина и вода се поставят в дестилационната колба 1, съответният органичен разтворител (напр. пентан, диетилов етер) - в колба 5. Преди началото на работа резервоарът 8 се запълва с вода и органичен разтворител през тръбичка 9, така че водата да запълни тръбичка 4, а органичният разтворител - тръбичка 7. Паропроводните тръбички 2 и 6 се топлоизолират за намаляване кондензацията на парите. Дестилационната колба 1 се загрева до интензивно кипене на

водата, като същевременно колба 5 се загрява до слабо кипене на органичния разтворител. Кондензиращият в горната част на хладника органичен разтворител се стича надолу и екстрахира водния кондензат, образуващ се в долната част на хладника. По този начин извлечените от растителния материал летливи вещества с водната пара се екстрахират с органичния разтворител. В резервоара 8 се извършва разслояване на двете течни фази: обезмаслената водна фаза през тръбичка 4 се връща в дестилационната колба 1, а органичната фаза през тръбичка 7 се връща в колба 5, в която постепенно се натрупва концентрат от летливи вещества, извлечени с водната пара от обработваната суровина. Този апарат може да се използва за приготвяне на екстракти с цел количествено определяне на летливите компоненти в тях. За целта колба 5 се запълва с органичен разтворител, в който предварително е поставен вътрешен стандарт за провеждане на газхроматографски анализ. След приключване на процеса на дестилация-екстракция, към охладения органичен екстракт се добавя чист разтворител до достигане на определен обем (Ткачѐв, 2008).



Фиг. 4 Апарат на Ликенс-Никерсон за микродестилация-екстракция на етерични масла: 1 – дестилационната колба; 2 – паропроводна тръбичка за водната пара; 3 – хладник; 4 – тръбичка за връщане на обезмаслената водна фаза; 5 – колба за органичен разтворител/екстракт; 6 – паропроводна тръбичка за парите на органичния разтворител; 7 – тръбичка за връщане на органичната фаза; 8 – резервоар за разделяне на водната и органичната фаза; 9 – изравнител на налягането.

Ако по някаква причина е необходимо провеждане на непрекъсната екстракция на дестилата с органичен разтворител с плътност, по-голяма от тази на водата, е трябва да се използва апарат в който тръбичката за връщане на обезмасления воден дестилат 4 е разположена по-високо от тръбичката за връщане на органичния екстракт 7.

1.1.4. Методи за химичен анализ на етерични масла

Разработени са голям брой методи за анализ на етерични масла. Някои от тях във времето са изместени от нови, по-ефективни и бързи методи. Основните методи за анализ, които се използват в момента, са газовата хроматография (ГХ), газовата хроматография – масспектрометрия (ГХ-МС), тънкослойната хроматография (ТСХ) и не на последно място различни видове колонна хроматография (КХ). В допълнение на тях, приложение намират ултравиолетова спектроскопия (УВ), инфрачервена спектроскопия (ИЧ), мас-спектрометрия (МС) и ядреномагнитен резонанс (ЯМР).

През годините последователно са разработени и приложени в етеричномасления анализ допълнителни методи, включващи: високоефективна течна хроматография (ВЕТХ); различни варианти на течна-течната хроматография; свръхкритична течна хроматография; хроматографски методи, комбинирани с МС, ^{13}C ЯМР, ИЧ и др., които посредством директно свързване на разделящото хроматографско устройство със спектрометъра осигуряват важна информация за структурата на предварително разделени компоненти, съответно за тяхната идентификация.

1.1.4.1. Тънкослойна хроматография

Тънкослойната хроматография е една от първите използвани хроматографски техники, която продължава да се използва и до днес за анализ на етерични масла. Този метод осигурява ценна информация и не изисква сложно и скъпо апаратурно оборудване, което позволява прилагането му в стандартни фармакопейни методи за охарактеризиране на етерични масла (Wagner & Bladt, 1996). В годините търпи развитие и са разработени различни модификации, като хроматография върху обърнати фази, високоефективна тънкослойна хроматография, както и хроматография на импрегниран силикагел със сребърен нитрат или сребърен перхлорат. Въпреки безспорната си бързина и простота, този метод е много остарял за съвременните изисквания при анализ на сложни смеси, каквито са етеричните масла, поради слаба разделителна способност и ниска чувствителност. Въпреки това, за бързо изследване на

химическия профил или за отличаване на различни растителни видове, този метод все още успешно се прилага.

1.1.4.2. Газова хроматография

Високата разделителната способност на газовата хроматография и дава предимство пред други разделителни техники. Еволюционното развитие на тази техника ретроспективно може да се илюстрира с газхроматографското разделяне на етерично масло от седефче, едно добре познато лечебно растение. Това етерично масло за пръв път е разделено на осем компонента от S. Bruno през 1961 година (Kubeczka, 2010). Няколко години по-късно, през 1964 година разделянето на етерично масло от седефче е проведено на газов хроматограф Perkin Elmer, снабден с набивна 2 м колона и термокондуктивен детектор при изотермални условия, на 20 компонента. Следващото усъвършенстване в разделянето е свързано с използването на програмирана промяна на температурата на колоната, което позволява достигането до 80 компонента. Следващите важни подобрения са в резултат на развитието на капилярни колони с висока разделителна способност и чувствителния пламъчно йонизационен детектор, позволяващи разделянето му на 150 компонента през 1981 година. Основните проблеми са свързани с крехкостта на стъклените капилярни колони и трудното им инсталиране. Когато кварцовите капилярни колони стават търговски достъпни, на приемливи цени, приложението на газовата хроматография в анализа на етерични масла рязко се увеличава. Проблемите със стабилността на неподвижните фази, особено на полярните, са разрешени с развитие технологиите за омрежване на колоните. Използваните неподвижни фази в конвенционалната газова хроматография също стават налични в търговската мрежа, което допълнително разширява приложението и в рутинните анализи. Най-често използваните неподвижни фази при анализ на етерични масла са полярните фази Carbowax 20M (DB-Wax, Supelcowax-10, HP-20M, Innowax и др.), среднополярни на база полидиметилсилоксан с 14% цианопропилфенил (DB-1701, SPB-1701, HP-1701, OV-1701 и др.), фази с ниска полярност – със съдържание на 5% фенилметилполисилоксан (DB-5, HP-5, SPSil-8, SE-54 и др.) и неполярни – 100 % диметилполисилоксан (DB-1, SPB-1, HP-1 и HP-1ms, OV-1 и др.). При избора на колона е от значение вътрешният диаметър на колоната. На пазара се предлагат колони с диаметър 0,53; 0,32; 0,25; 0,10 и 0,05 мм. Увеличаването на диаметъра на колоната дава възможност и за увеличаване на дебелината на неподвижната фаза, което позволява разделянето на по-голямо количество проба, при запазване на ефективността на

разделянето. Това е от значение при количествения анализ на микрокомпоненти в етерични масла, както и при някои техники за качествен анализ, като ГХ-МС и ГХ-ИЧ (Kubeczka, 2010).

1.1.4.2.1. Свръхбърза газова хроматография

За целите на рутинния анализ на етерични масла са разработени нови, по-бързи методи за газ хроматографски анализ. Най-ефективният начин да се ускори разделянето, без да губи от неговата ефективност, е да се използват по-къси колони с по-малък вътрешен диаметър и по-тънки покрития, по-висок дебит на газа носител, и ускорен температурен градиент.

Свръхбързо газ хроматографско разделяне на етерично масло от зелен лимон е постигнато (Mondello et al., 2004), използвайки 5 м капилярна колона с 50 мкм I.D. и дебелина на неподвижна фаза 0,05 мкм, линейна скорост на газа носител на 120 см/мин и ускорена тристепенна температурна програма. Анализът на етерично масло се извършва за 90 сек, което е приблизително 33 пъти по-бързо в сравнение с конвенционалната газова хроматография. Разбира се, такова разделяне не може да се извърши с конвенционален газов хроматограф, а са необходими специално конструирани за целта апарати. В допълнение, тази техника е приложима и за мас спектрална идентификация на така разделените компоненти (Kubeczka, 2010).

1.1.4.2.2. Енантиселективна газова хроматография

Въвеждането на енантиселективните капилярни колони с висока разделителна способност дава възможност за разделяне и идентифициране на множество хирални съединения, присъстващи в етеричните масла (Kubeczka, 2010).

Развитието на енантиселективната хроматография започва в средата на 60-те години на миналия век, с приложението на първите хирални диамидни неподвижни фази за газова хроматография за разделяне на хирални съединения. През 80-те години навлиза използването на циклодекстринови производни, които действат енантиселективно чрез взаимодействие на принципа „гост-приемник“, чрез частично проникване на енантиомера в циклодекстриновата кухина. Модифицираните α -, β - и γ -циклодекстрини са стабилни, разтворими в неполярни разтворители, притежават висока енантиселективност към много хирални съединения. С прилагането на 2,3-пентил-6-метил- β - и γ -циклодекстрин като неподвижни фази се постига разделяне практически на всички монотерпенови въглеводороди често срещащи се в етеричните масла.

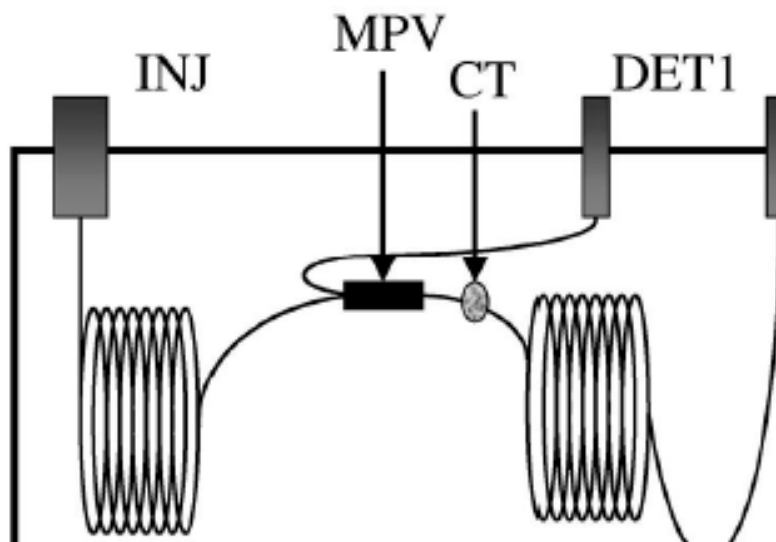
1.1.4.2.3. Мултидимензионална газова хроматография (MDGC)

Приложението на MDGC в анализи на етерични масла е логично развитие в изследването на подобни комплексни матрици.

Методът се състои във въвеждането на частично разделена (в първата колона) малка фракция (отрязък) във втора по-селективна колона, където се постига по-добро разделяне на компонентите, а оттам и по-пълно идентифициране.

Обичайната методика включва охлаждане и улавяне на зоната в малък обем в началото на втората колона. След това охладителят се нагрява и компонентите се хроматографират във втората колона. Концепцията на метода изисква избор на колони с различна селективност, което да позволява неразделените и/или частично припокриващи се пикове да бъдат успешно разделени във втората колона (Kubeczka, 2010).

Принципната схема на MDGC е дадена на фиг. 5



Фиг. 5. Мултидимензионална газова хроматография

INJ - инжектор; *MPV* - междинен кран; *CT* - охладител; *DET1* и *DET2* - детектори; *C1* – предколона; *C2* – аналитична колона;

Възможно е апаратът да бъде оборудван с допълнителни вентили, които да позволяват включването на различни детектори.

Важна област на приложение на MDGC е разделянето и идентифицирането на хирални съединения. Типичният подход включва използване на обикновена колона за първоначалното разделяне на компонентите. Като втора колона се използва високоселективна хирална колона. Използването на единична хирална колона за разделяне на енантиомери в етерични масла внася несигурност поради възможни пречения от други компоненти и е приложимо за ограничен брой етерични масла.

1.1.5. Биосинтез на моно- и сескитерпеноиди

Основните компоненти на етеричните масла са моно- и сескитерпеноидите. Те са изградени от два или три изопреноидни остатъка. Свързването на тези изопреноидни остатъци основно се извършва съгласно правилото на Ружичка „глава – опашка“ (Ruzicka, 1953). На Схема 1 са показани и други възможности за свързване на изопреноидните остатъци, при което се получават съответните скелети (Poulter et al., 1977).

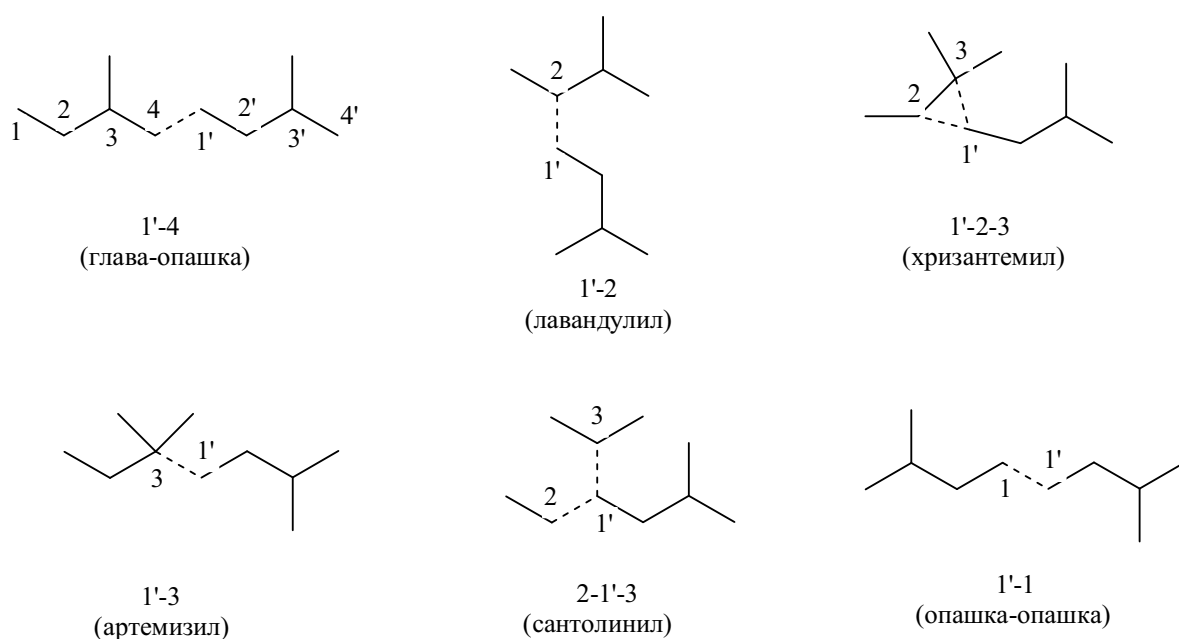


Схема 1. Свързване на изопреноидните остатъци

При свързване 1'-4 (глава – опашка) се получава геранил дифосфат, предшественик на почти всички терпеноиди. При друга последователност на свързване се получават т. нар. „неправилни скелети“. Това са лавандулил (1'-2), хризантемил (1'-2-3), артемизил (1'-3) и сантолинил (2-1'-3). Свързване 1'-1 (опашка-опашка) е характерно при получаването на сквален - предшественикът на всички тритерпеноиди (Poulter et al., 1977).

1.1.5.1. Мевалонов път за получаване на изопреноиди

С помощта на белязани атоми ^{14}C и ^{13}C е установено, че ацетилкоензим А (AcCoA) е предшественик на терпеноидите, като от две молекули се получава ацетоацетилкоензим А (AcAcCoA). Следващата кондензация с още една молекула AcCoA води до получаването на мевалонилкоензим А (HMG-CoA), който се превръща в изопентенил дифосфат (IPP). При изомеризация на IPP се получава диметилалил дифосфат (DMAPP) (Dewick, 2002).

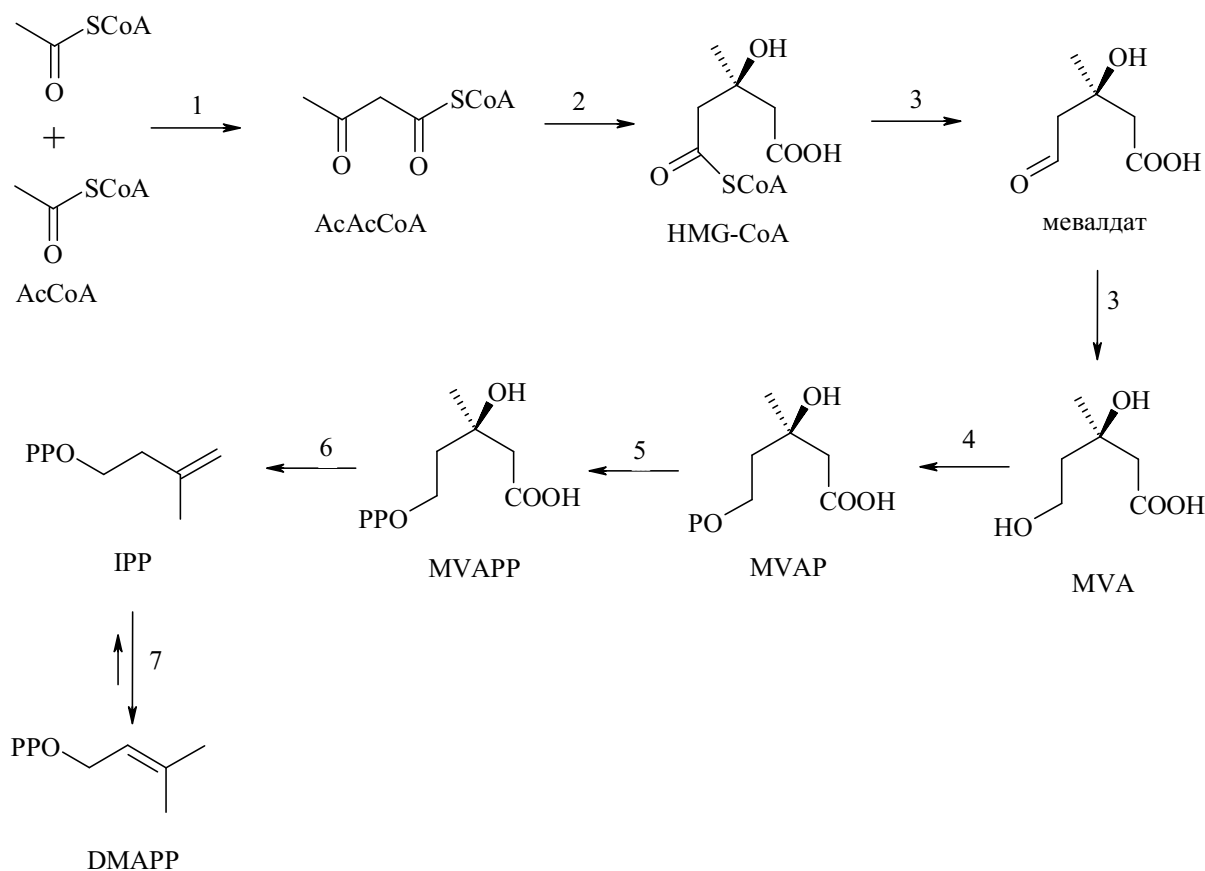


Схема 2. Мевалонов път за получаване на IPP и DMAPP. *Ензими:* 1, ацетил коензим А тиолаза (ААСТ); 2, HMG-CoA синтаза; 3, HMG-CoA редуктаза (HMGR); 4, мевалонат киназа; 5, фосфомевалонат киназа; 6, мевалонат 5-дифосфат декарбоксилаза; 7, IPP изомераза.

При кондензация на IPP и DMAPP се получава геранил дифосфат (GPP), предшественика на монотерпеноидите (C₁₀). При кондензация на GPP и IPP се получава фарнезил дифосфат (FPP), даващ началото на сескитерпеноидите (C₁₅). При взаимодействие на FPP с IPP се получава геранилгеранил дифосфат (GGPP), който е предшественик на дитерпеноидите (C₂₀). При взаимодействие на 2 молекули FPP се получава сквален, предшественик на тритерпеноидите (C₃₀) (Dewick, 2002).

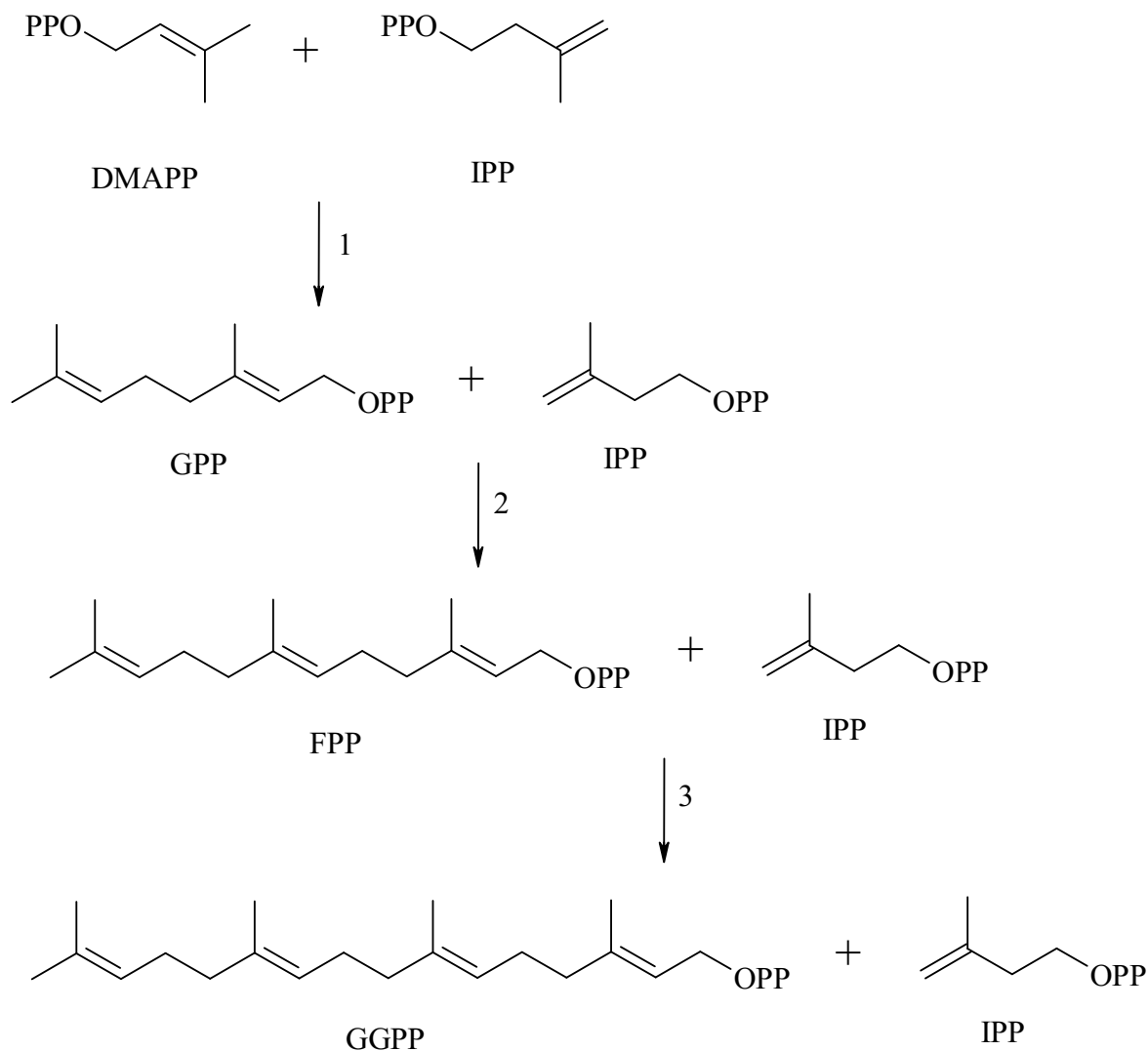


Схема 3. Основни изопреноидни структури. *Ензими:* 1, геранил дифосфат синтаза; 2, фарнезил дифосфат синтаза; 3, геранил дифосфат синтаза.

1.1.5.2. Биосинтез на монотерпеноиди

При йонизация на GPP се получава геранил катион, от който при елиминиране на протон или присъединяване на молекула вода се получават основната група ациклически монотерпеноиди (Схема 4).

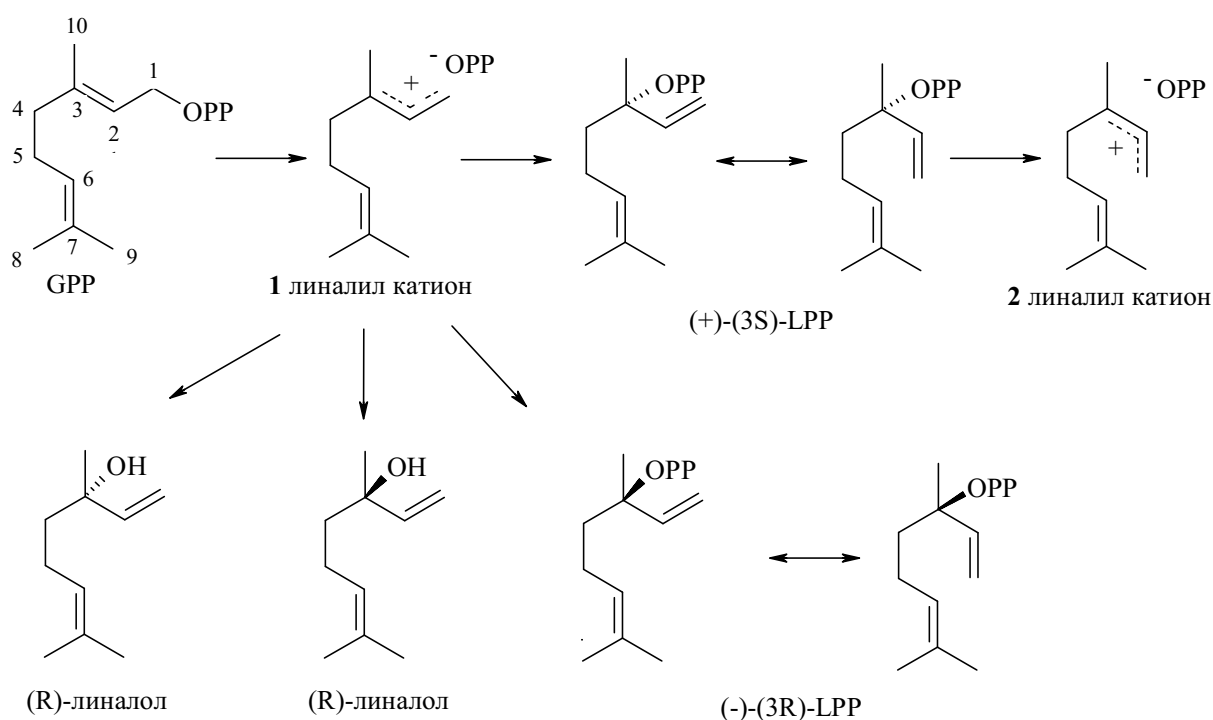


Схема 4. Получаване на ациклични монотерпеноиди

Превръщането на GPP в циклични монотерпеноиди преминава през първоначалната му изомеризация до (+)-(3S)-линалил дифосфат (LPP) или до (-)-(3R)-LPP (Degenhardt et al., 2009).

От GPP преминавайки през геранил катион се получава LPP, от който се получава нерил катион. Нерил катионът, благодарение по-доброто стереохимично разположение преимуществено циклизира до α -терпинил катион, който е първоизточникът на цикличните монотерпеноиди (Схема 5).

Терпеновата синтаза катализира елиминирането на протон от α -терпинил катион, при което се получава лимонен или терпинолен, докато взаимодействието с вода води до получаването на α -терпинеол. Под влияние на синтаза се катализира 6,7- или 1,7-миграция на водород в α -терпинил катион и при последващо елиминиране на протон се получават изомерни терпиненови и феландренови въглеводороди. Приема се, че получаването на 1,8-цинеол започва от α -терпинил катион, като междинен продукт е α -терпинеол, който претърпява допълнителна циклизация по кислородния атом от хидроксилната група (Degenhardt et al., 2009).

α -Терпинил катионът може да претърпи допълнителни циклизации в резултат на електрофилно взаимодействие на някой от въглеродните атоми от двойната връзка с

карбокатиона. При присъединяване по правилото на Марковников (2,7-циклизация) се получава пинил катион, от който при елиминиране на протон съответно се получават α - и β -пинен, което е характерно за много синтази в иглолистните дървета. При електрофилно присъединяване, обратно на правилото на Марковников (3,7-циклизация) се генерира борнил катион. Получаването на борнеол и камфор преминава през междинно получаване на борнил дифосфат, от който след хидролиза и окисление се получават съответните терпеноиди. Получаването на други два бициклични монотерпенови скелета – фенхонов и изофенхонов става чрез прегрупирането на Вагнер-Меервайн съответно на пинил и борнил катиона. При 5,7-циклизация на α -терпинил катион и елиминиране на протон се получава циклопропанов пръстен – Δ^3 -карен. Терпеновите синтази катализират и друг път за получаване на циклопропанов пръстен. При 6,7-миграция на водород се получава терпинен-4-ил катион, от който при 2,6-циклизация се получава туйил катион, предшественик на сабинена и свързаните с този скелет монотерпеноиди (Degenhardt et al., 2009).

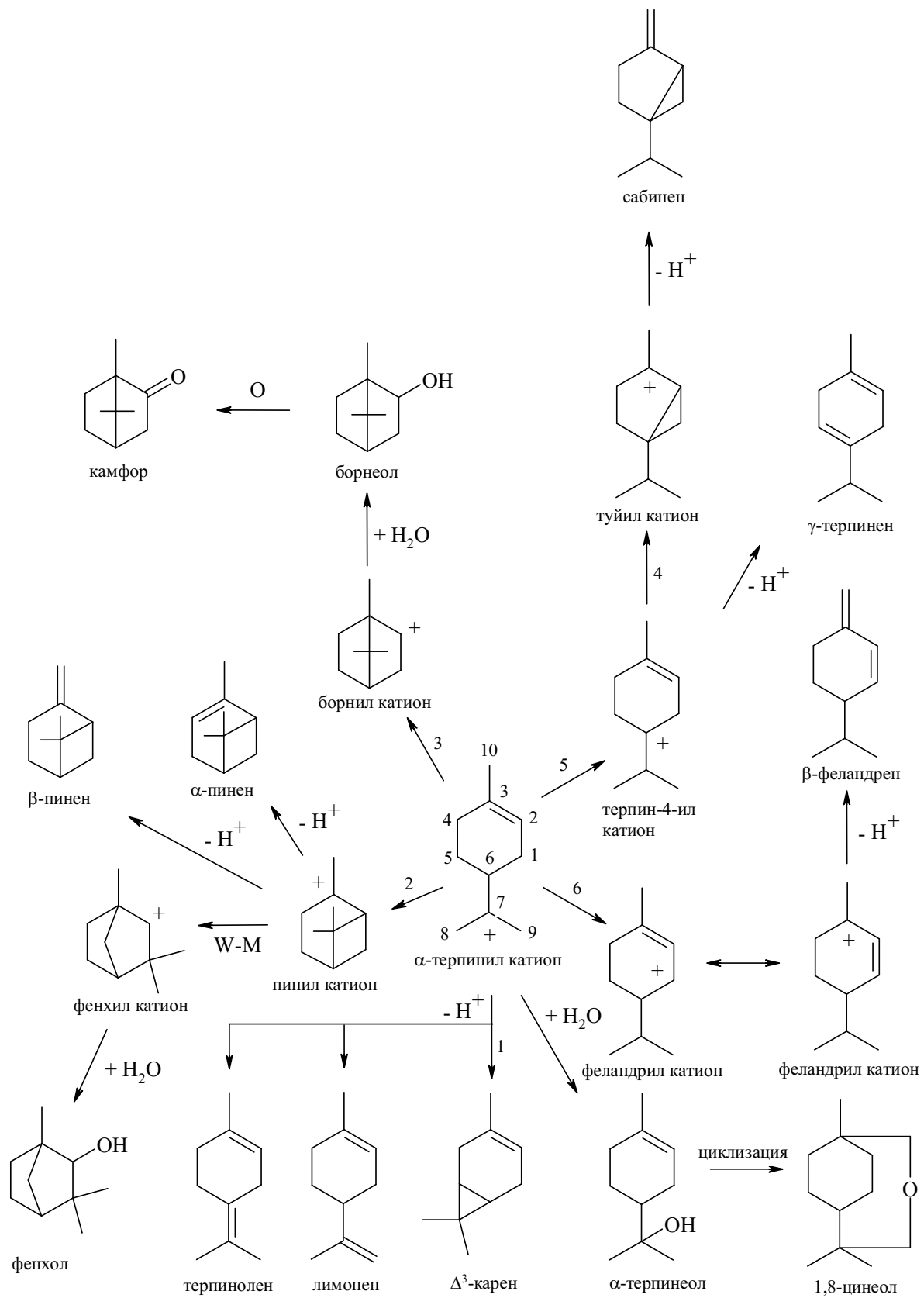


Схема 5. Получаване на циклични монотерпеноиди. *Трансформации:* 1 – 5,7-циклизация; 2 – 2,7-циклизация; 3 – 3,7-циклизация; 4 – 2,6-циклизация; 5 – 6,7-миграция на водород; 6 – 1,7- миграция на водород.

1.1.5.3. Получаване на „неправилни скелети“

При кондензация на две молекули DMAPP се получава хептенил катион от който след циклизация се получава циклопропилдифосфат. От циклопропилдифосфата се получава циклопропилкарбинил катион, който е изходното съединение за получаване на „неправилните скелети“ (Схема 6) (Poulter et al., 1977).

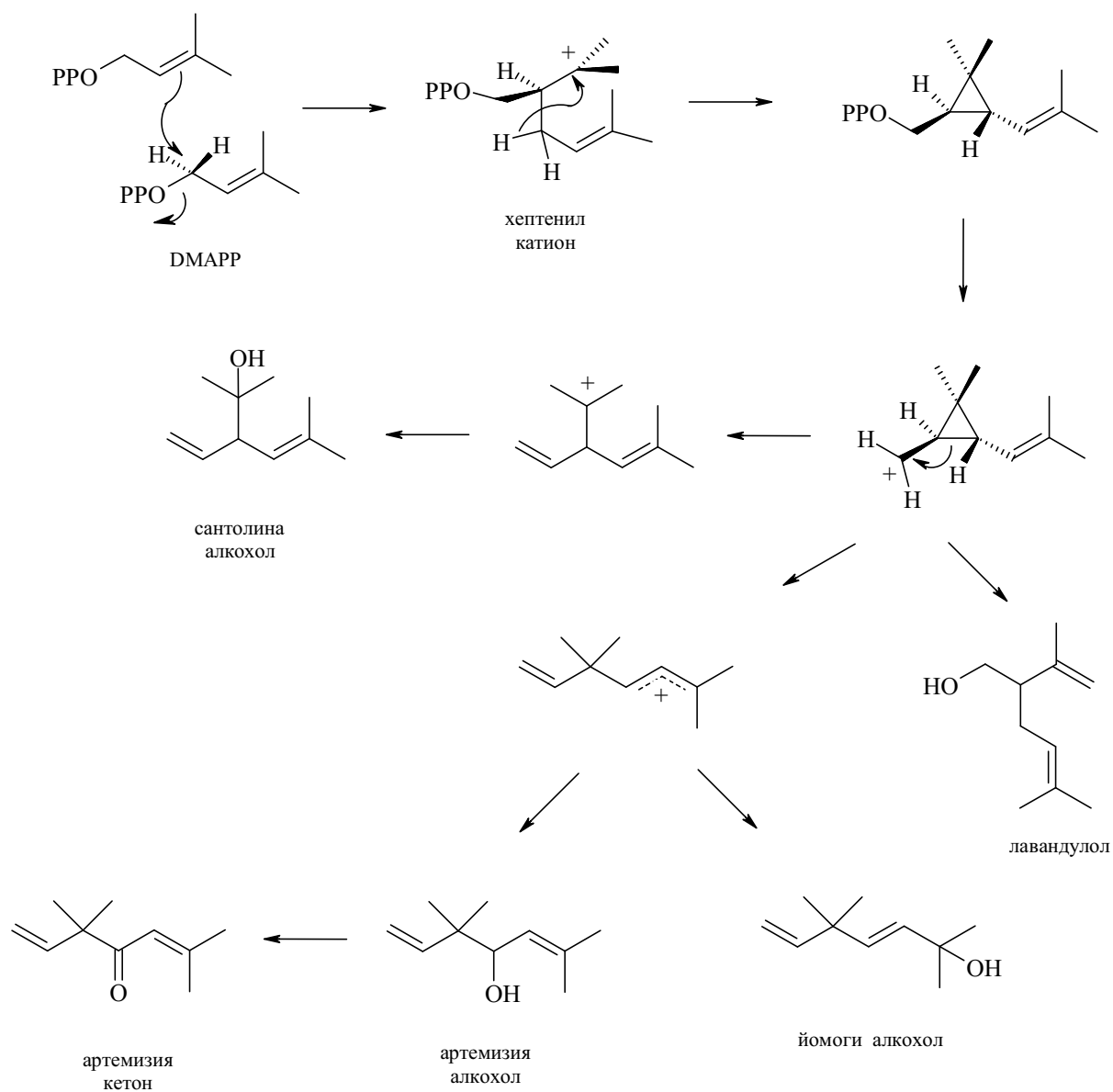


Схема 6. Получаване на монотерпеноиди с неправилни скелети

1.1.5.4. Биосинтез на сескитерпеноиди

По подобие на монотерпеноидите, сескитерпеноидите се получават от фарнезил дифосфат чрез преминаване през карбокатион реакционни механизми, катализирани от сескитерпенови синтази. По-големият въглероден скелет и наличието на три, вместо на две двойни връзки, значително увеличава структурното разнообразие на получаваните съединения. Първоначалните реакции на циклизиране могат да бъдат разделени на два типа (Схеми 7 и 8). Единият вид включва циклизация на първоначално обазувания фарнезил катион до 10-членен (*E,E*-гермакрадиенил катион) или 11-членен (*E,E*-хумулил катион) пръстен. Предвид големите размери на тези пръстени, *E*-геометрията на C2-C3 двойната връзка не е бариера за циклизация. Вторият тип циклизиране преминава през предварителна изомеризация на двойната връзка C2-C3 до третичен неролидил карбокатион, което е директна аналогия на изомеризацията на GPP до линалил катион при получаването на монотерпеноидите. Неролидил катионът може да претърпи циклизация, както по C6-C7, така и по C10-C11 двойната връзка, при което се получават съответно 1,6- (бизаболлил катион), 1,7-(циклохептенил катион), 1,10-((*Z,E*)-гермакрадиенил катион) или 1,11-((*Z*)-хумулил катион). Наличието на оставащи две двойни връзки дава възможност за допълнително циклизиране и получаване на голям брой производни (Dewick, 2002; Degenhardt et al., 2009).

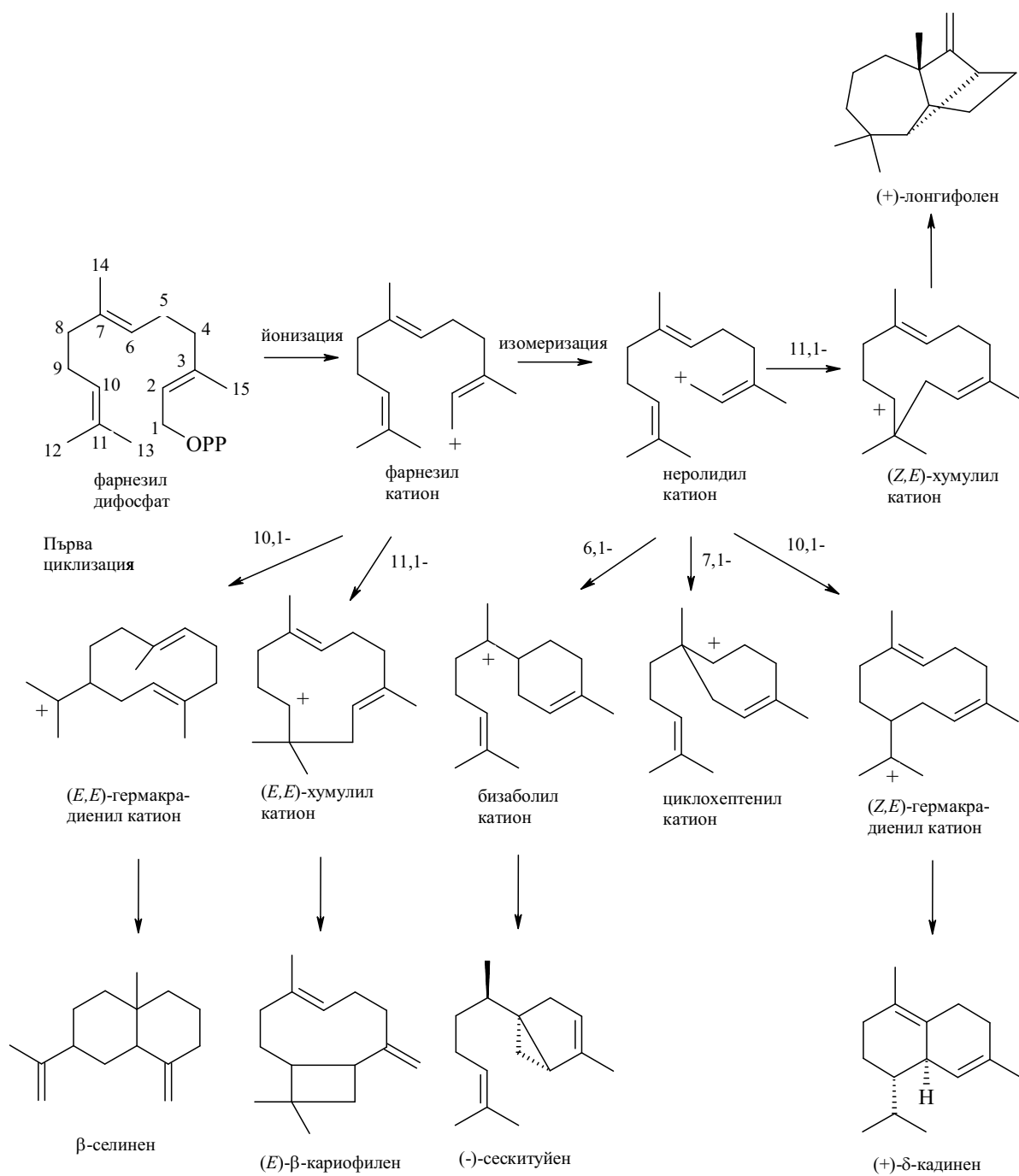


Схема 7. Циклизация през фарнезил катион

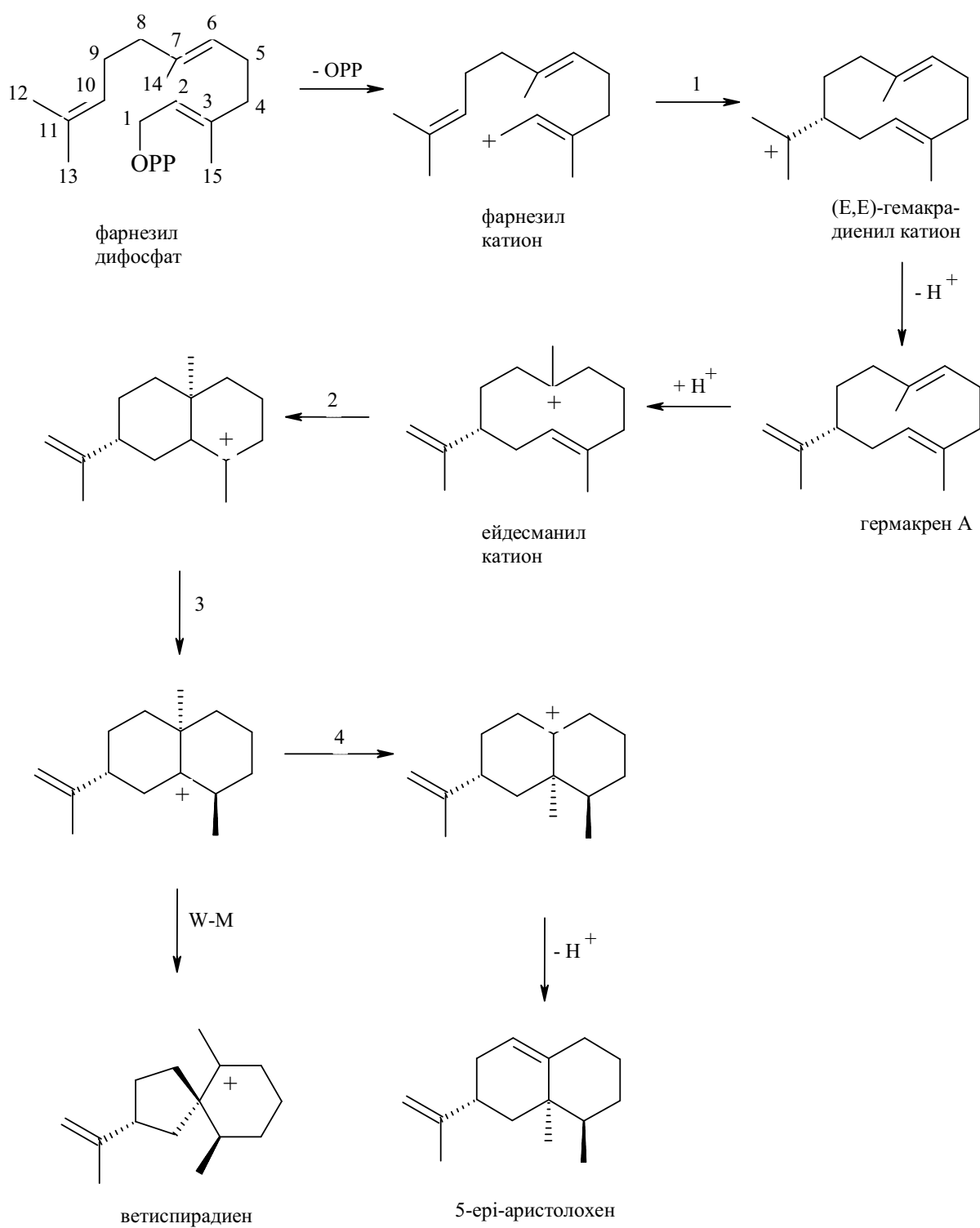


Схема 8. Циклизация през *E,E*-гемакрадиенил катион. *Прегруппировки:* 1 – 10,1-циклизация; 2 – 2,7-циклизация; 3 – 1,2-миграция H^+ ; 4 – 1,2-миграция CH_3

1.2. Лавандула

1.2.1. Кратки данни за род *Lavandula* L.

Лавандулата произхожда от планинските средиземноморски райони на Европа и Северна Африка. Днес, като културно растение, се отглежда в много страни от Източна Европа, Австралия и Южна Америка.

Родът Лавандула (*Lavandula* L.) е от семейство Устоцветни (Lamiaceae) и включва 32 вида и много подвидове (Guinea, 1972), разделени в шест секции. Стопанско значение като етеричномаслени растения имат само три вида: лавандула (теснолистна, истинска лавандула (*Lavandula angustifolia* Mill.)); спика (португалска, широколистна лавандула (*L. latifolia* Med.)) и лавандин (*L. x intermedia*, syn. *L. hybrida* Rev.), който е хибрид между лавандула и спика. В страните от Средиземноморското крайбрежие за получаване на етерично масло се използват и съцветията на диворастящата качулата лавандула (испанска лавандула (*L. stoechas* L.)). Нейното масло е със силен камфоров мирис, напомнящ спиковото и розмариновото.

1.2.2. Ботаническа характеристика и разпространение на *Lavandula angustifolia* Mill.

Представителите на род Лавандула (*Lavandula* L.) са ниски храсти, полухрасти или многогодишни тревисти растения със звездовидни трихоми. Лавандулата (*Lavandula angustifolia* Mill. (*L. officinalis* Ch.; *L. vera* DC.; *L. spica* L.)) е многогодишен полухраст със силно развита, разклонена коренова система, достигаща до 4 м дължина. Надземната част на растението се състои от многобройни стъбла, обазуващи гъсти тупи с полусферична форма. Стъблата в основата си са разклонени, възходящи или изправени, старите разклонения са вдървесинели и от тях излизат едногодишни тревисти леторасли. При завършено развитие тупите достигат до 60 – 80 см в диаметър и 30 – 100 см височина (Анчев, 1989).

Листата са приседнали, многогодишни и не окапват през зимата. Цветоносните стъбла са по върховете на младите разклонения. Те са неразклонени и достигат 400-700, понякога и над 1000 на растение. Съцветията са класовидни, връхни, 2 – 8 см дълги, с многобройни цветове. Разположени са на неразклонени цветоносни дръжки по върховете на разклоненията. Имат 4-12 прешлена с 8-32 цветчета в прешлен. Чашката и

цветчето са двуустни, различно оцветени – от белезникаво-зелени до тъмновиолетови чашки и от розови до тъмновиолетови венчета.

Етеричното масло е свободно отложено в лабиатни жлези и жлезисти трихоми – най-много по чашките, малко по горната част на цветоносната дръжка, още по-малко по долната страна на листата и най-малко по прицветниците.

При своето развитие лавандулата изисква значително количество топлина. Тя е светлолюбиво растение и не търпи засенчване. Лавандулата се развива добре при алкална или неутрална почвена среда. При кисели почви тя образува по-малки туфи, които остаряват и загиват по-бързо, добивът и качеството на маслото са по-ниски (Стоянова и съавт., 2009).

1.2.3. Сортове Лавандула

У нас лавандулата не се среща като диворастващ вид, а се култивира. В България е пренесена от Франция през 1903 година, но като културно растение става известна у нас едва през 1925 година, когато работата по тази култура се поема от „Опитно поле за благоуханни растения” в гр. Казанлък (Иринчев и Георгиев, 1959).

Отглежданата в нашата страна местна популация лавандула, поради кръстосаното опрашване и размножаване от семена, създава пъстри, неизравнени насаждения, характеризиращи се с различен хабитус и темп на развитие на растенията, което затруднява механизираниите обработки. Местната популация има ниско съдържание на етерично масло (от 0,81 до 0,86%) и добивите, които се получават са средно 2 – 3 кг масло от декар, качеството на маслото не е било конкурентноспособно на външния пазар. Това е наложило селектирането на нови сортове лавандула със стопански качества, които осигуряват висок добив на етерично масло. Между тях съществуват различия в количеството и качеството на маслата, зависещи от климатично почвените условия на развитие (Стоянова и съавт., 2009).

За увеличаване продуктивността на лавандулата и подобряване на качеството на маслото са селектирани десетки български сортове. Доскоро най-широко разпространените сортове, формиращи характера на българското лавандулово масло, бяха „Карлово”, „Свежест“, „Арома“, „Дружба” и „Хемус”. През последните години

навлизат и по-новите сортове „Юбилейна”, „Севтополис”, „Рая” и „Хебър”. В резултат на това настъпи промяна в качеството и „характера“ на българското лавандулово масло.

В Таблица 1 е дадена сравнителна характеристика на девет български сорта лавандула и на етеричните масла, получени от тях, (Георгиев и Стоянова, 2006). От данните се вижда, че етеричното масло от сорт „Севтополис“, независимо от най-високото съдържание на естери (57 – 59%) има мирисова оценка 4, както е при някои лавандулови масла с по-ниско количество естери. Това потвърждава съществуващото в литературата мнение, че мирисовата характеристика на лавандуловото етерично масло зависи не само от съдържанието на линалил ацетат, но и от съотношението му с други компоненти. Например, според Димитров, (1986) от съществено значение за мирисовата характеристика на маслото са терпеновите въгледороди *цис*-, *транс*- β -оцимен и лимонен.

Табл. 1. Сравнителна характеристика на сортове лавандула.

Сорт	Добив на цвят, кг/декар	Етерично масло в цвета, %	Естери, %, като линалилацетат	Мирисова оценка на маслото (по петобална система)
„Казанлък“	463	1,2	50 – 52	3,5
„Карлово“	690	1,2	51 – 53	4,0
„Свежест“	550	1,3	52	3,5
„Арома“	530	1,2	57	5,0
„Хемус“	450 - 500	1,9	55 - 59	5,0
„Севтополис“	560	2,7	57 – 59	4,0
„Юбилейна“	625	2,6	*	5,0
„Дружба“	500 - 550	2,0	*	4,5
„Рая“	600	2,4	59 - 60	5,0

*-липсват данни

Чрез оптимизиране на сортовата структура, според Димитров и съавт., (1981), е възможно да се получи лавандулово масло с високо качество (оценка по мирис 4,5) при висок добив (8,17 кг/дек), като максимално се удължи жътвения период чрез залагане на ранно, средно и късно цъфтящи сортове. Авторите предлагат сортовата структура на лавандуловите насаждения в страната да се оптимизира, като изготвяне на партии от лавандулови масла може да се предвиди и реализира още в самия масив. Те предлагат съобразно климатичните условия на района да се обособят различни типови качества лавандулови масла, което ще доведе до чувствително повишаване качеството на българското лавандулово масло и добивите на етерично масло от декар.

Както може да се очаква, лавандуловото етерично масло е продукт от природен произход и представлява сложна смес. Детайлното познаване на химичния състав на маслото е от значение за предвиждане на неговия мирис. Освен основните два компонента линалол и линалил ацетат, маслото съдържа и множество микрокомпоненти, които имат решаваща роля при формиране на мириса му. Химичният състав на маслото зависи от много фактори, като основните са сортовият състав на използвания растителен материал и екологичните условия при които е отглеждан (Ognyanov, 1984; Lawrence, 1993). Това е едно от обясненията за големите мирисови разлики между френско, българско, молдовско и австралийско масло. При сравнителен анализ на проби от съответните страни е установено, че практически няма разлика между съдържанието на линалол и линалил ацетат. Основните различия се наблюдават при количественото съдържание на микрокомпонентите на маслото (Schmidt, 2003).

1.2.4. Жътва на лавандулов цвят

Съдържанието на етерично масло в лавандула зависи от фазата на развитие на съцветието. Определянето на степента на цъфтеж на лавандуловите съцветия е важен показател за началото на жътвата. За целта се вземат проби от различни тупи и различни места на насаждението и се определя общият брой на цъфналите цветчета в съцветието. В българската литература пръв Георгиев, 1931 (Иринчев и Георгиев, 1959), дава препоръки за времето на прибиране на лавандулата – когато 2/3 от цветчетата в съцветието са отворени. Тази фаза се достига за 10 – 15 дни след появата на първите цъфнали цветчета в съцветието, в зависимост от метеорологичните условия.

Препоръката за времето на прибиране, обаче не е съпроводена с обективни данни за количеството или качеството на етеричното масло.

След около 20 години Илиева и съавт., (1955) провеждат изследване в два района – Самоков и Казанлък, за влиянието на степента на цъфтеж върху съдържанието и качеството на маслото в съцветията при пет фази от развитието им: бутонизация – непосредствено преди началото на цъфтежа, начало на цъфтеж (около 20% разцъфнали и прецъфтели цветчета), пълен цъфтеж (около 50% цъфнали и прецъфтели цветчета), край на цъфтежа (около 85% прецъфтели и 10 – 15% цъфтящи цветчета) и пълно прецъфтяване (няма цъфтящи цветчета). Авторите установяват, че съдържанието на масло нараства до пълния цъфтеж (50%), след което започва да намалява. Съдържанието на естери в маслото, обаче, е в зависимост от месторастенето на лавандулата – в Самоков е най-високо преди и в началото на цъфтежа, след което намалява, а в Казанлък следва натрупването на масло, т.е. максимално е при пълен цъфтеж. Тези особености авторите отдават на местните почвено-климатични условия.

Обобщение на изследванията у нас върху влиянието на степента на цъфтеж върху количеството и качеството на лавандуловото масло до средата на 70-те години на ХХ век е направено от Стайков и съавт. (1973), като се препоръчва жътвата да започва при 50%-ен цъфтеж, масовата да е при 75 – 90%-ен и да завършва с прецъфтяването.

Георгиев и съавт., (2007), проследяват промените в състава на етеричното масло по време на цъфтежа от сортове „Хемус“ и „Карлово“. Те установяват, че съдържанието на въглеводородите до 50% цъфтеж е високо (11 – 12%), като след това рязко намалява (7%). Линалолът нараства непрекъснато (от 18 на 26%), а линалил ацетатът е най-много в средата на цъфтежа (50 – 70%). Мирисовата оценка на маслата показва, че най-добри са тези от степен на цъфтеж 60 – 80% за сорт „Хемус“, което съвпада и с най-високия им добив, а за сорт „Карлово“ при 45 – 70%, което се обяснява със сортовата биологична специфика. За тези два сорта се посочва, че по-високите средноденощни температури и по-малкото валежи скъсяват периода на цъфтеж, като съдържанието на етерично масло се увеличава.

Лавандуловият цвят се жъне ръчно или механизирано и не трябва да се трупа на дебел слой при съхранение и транспортиране, за да се запази качеството на растителната суровина, респективно на етеричното масло.

Изследванията върху времето за прибиране на суровините, особено на тези с екзогенни вместилища, са свързани и с определянето на денонощната динамика на натрупване на етеричното масло в растенията, която обуславя времето на прибиране през денонощието при технологичната зрялост.

Такива изследвания са провеждани от Иринчев и Георгиев, (1959) и Димитрова, (1960), които препоръчват жътвата да се извършва до 12 часа. Според Иринчев и Божков, (1970) и Стайков и съавт., (1973) считат време за прибиране на лавандулата е между 10 и 16 часа. Количеството на етеричното масло в лавандуловите съцветия се влияе значително и от атмосферните условия през време на прибирането. Необходимо е жътвата да се провежда при тихо, слънчево и топло време, защото при дъжд, ниски температури и силен вятър добивът на масло може да спадне до 40% (Стоянова и съавт., 2009).

1.2.5. Получаване на лавандулово масло

Провеждани са изследвания за оптимизиране на условията за получаване на лавандулово масло.

Илиева и съавт. (1955), изследват динамиката на дестилацията за 2 часа с пара на свежи лавандулови съцветия. Те установяват, че в първите 30 мин се извлича 80% от етеричното масло, а в последните – 1,3%. За 90 мин се дестилират 95 – 98% от маслото, което се потвърждава и от други автори (Zhekova & Nedkov, 2010; Zheljazkov et al., 2013). Проследените показатели на маслото – относителна плътност, ъгъл на въртене на поляризованата светлина, киселинно число и съдържание на естери – нарастват от началото до края на процеса. Лазаров и Наков, (1965) проследяват динамиката на дестилация на полусухи лавандулови съцветия след престояването им на снопчета на нивата 48 часа. Те установяват, че извличането на маслото е най-много през първите 15 мин (60%), но с общо забавяне до 30 мин (общо 83,3%) (Стоянова и съавт., 2009).

Стайков и съавт., (1973) обобщават изследванията 70-те години на XX век по преработката на лавандуловите съцветия. Обръщат внимание на уплътняването на суровината в апарата, при което се създават условия за по-висока скорост на парата в него и по-бързо извличане на маслото. Дестилацията се провежда с директна пара под налягане 0,5 МРа и с продължителност 90 мин при скорост на дестилация 7 – 8%

(количеството дестилат, получен за един час, отнесен към обема на дестилационния апарат, изразено в проценти).

Zolotovitch, (1955) сравнява водната и парната дестилация (с парообразуване в апарата) и показва предимствата на втората – по-висок добив на маслото (5,7 – 14,1%) с по-ниско киселинно число и повишено естерно съдържание със 7,9 – 18,7%. Авторът доказва катализиращото влияние на медта, от която са изработени дестилационните казани, върху хидролиза на естерите и избягването и чрез калайдисването им, което довежда до увеличаване на добива на масло (0,8 – 4,8) с по-ниско киселинно число и повишено естерно съдържание (1,0 – 9,9%). Тези заключения се потвърждават от Иринчев и Георгиев, (1959).

През последните години има публикувани примери, обясняващи намаляването на естерното съдържание на дадено етерично масло в зависимост от избора на метод за изолирането му от растителната суровина.

По време на дестилацията, средата (растителен материал – вода) е кисела – $\text{pH}=5,5-6,5$, което в комбинацията с високата температура на дестилация предполага хидролиза на изолирания от растението линалил ацетат и протичане на последващите процеси на хидратация или циклизация при които могат да се получат някои ациклични и моноциклични монотерпеноиди (Схема 8). При елиминиране на H^+ от линалил карбокатиона се получава мирцен, *цис*- и *транс*-оцимен. При процеса на хидролиза след елиминиране на OAc^- се получава линалил карбокатион с делокализация на заряда. При хидратация на този катион в зависимост от мястото на присъединяване на OH^- се получава линалол, гераниол и нерол в различно съотношение. При циклизация на линалил карбокатиона се получава α -терпенил карбокатион от който при миграция на водород се получава терпен-4-ил карбокатион. При елиминиране на H^+ от двата карбокатиона се получават лимонен, терпинолен, α -терпинен и γ -терпинен. При хидрогениране на двата катиона се получават терпинен-4-ол, α -терпинеол от който пък се получава 1,8-цинеол (Voelens et al., 1988, Mastelić et al., 2000).

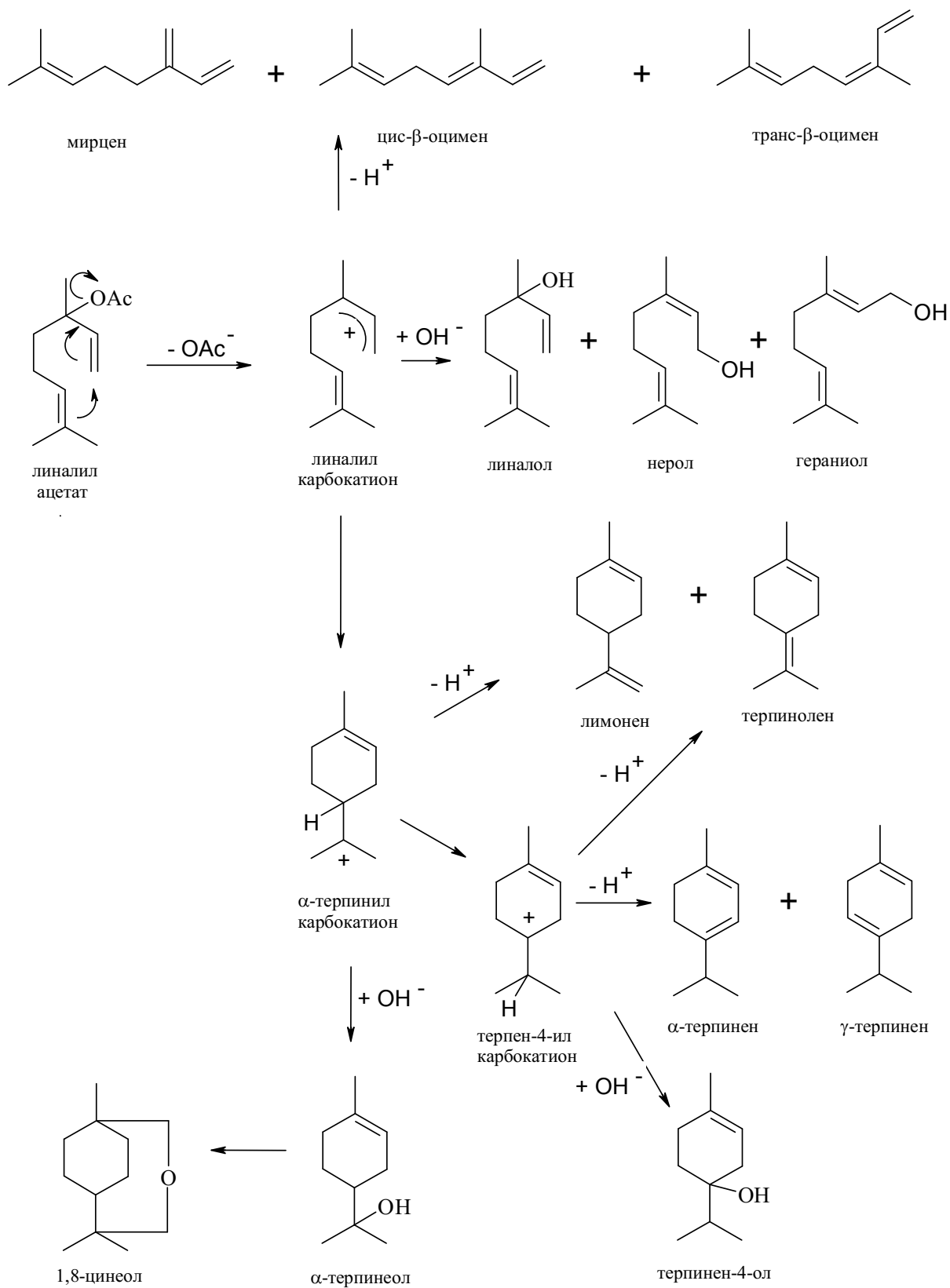


Схема 8. Монотерпеноиди получаващи се по време на изолиране на етеричното масло.

При изследване на съдържанието на етерично масло в цветчетата и цветоносните дръжки по време на процеса на дестилация е установено, че етеричното масло от цветчетата се извлича за 1 – 3 мин и след това до 90-та минута не се открива. Маслото в дръжките преди дестилацията е съвсем малко, увеличава се до максимум между 1 и 3 мин от започване на процеса и бавно намалява до 90 мин. Това, според авторите, показва наличието на сорбция на маслото от парната фаза в дръжки. Десорбцията е по-продължителна – до около 90 мин. При десорбция първо се десорбират терпиненолът и въглеводородите, а последни – линалолът и линалил ацетатът (Стоянова и съавт., 2009).

1.2.6. Химичен състав на лавандулово масло

Лавандуловото масло се получава при дестилация на съцветия от *L. angustifolia* (лавандула), *L. intermedia* (лавандин) и *L. latifolia* (спика). Етеричните масла получени от тези три вида лавандула, макар и близки по състав, се различават значително в качествено отношение. Съдържанието на характерни моно- и сескитерпеноиди за трите вида лавандула е представено в Таблица 2 (Lis-Balchin, 2002). Най-ценно е лавандуловото, което намира приложение в козметиката и ароматерапията, докато другите две масла основно се търсят за масови, по-нискокачествени козметични продукти. Етеричното масло от лавандула се отличава с високо съдържание на линалол (27 – 46%) и линалил ацетат (30 – 55%), от спиката е богато на линалол (11 - 54%), камфор (5 - 12%) и 1,8-цинеол (21 -36%), докато маслото от лавандин е с качество, приближаващо се повече до това на лавандуловото, отколкото на спиковото (Георгиев и Стоянова, 2006).

Лавандуловото масло съдържа над 100 индивидуални компонента (Lawrence, 1993, 1996, 2000, 2004). Много от тях, въпреки че се откриват в следи оказват влияние при формиране на аромата на маслото. Характерно за лавандуловото масло е ниското съдържание на лимонен (до 0,6%), β -феландрен (до 0,6%), камфор (до 0,6%) и 1,8-цинеол (до 2,0%), умерено съдържание на *цис*- β -оцимен (3,0-9,0%), *транс*- β -оцимен (1,0-6,0%), лавандулол (над 0,3%), терпинен-4-ол (2,0-5,0%), α -терпинеол (0,8-2,0) и лавандулил ацетат (2,0-5,0%) и високо съдържание на линалол (22,0-34,0%) и линалил ацетат (30,0-42,0%) (ISO 3515:2002).

Табл. 2. Съдържание (%) на характерни моно- и сескитерпеноиди във видове лавандула

Компонент	Лавандула (<i>L. angustifolia</i>)	Лавандин (<i>L. xintermedia</i>)	Спика (<i>L. latifolia</i>)
Линалол	10 - 50	20 – 23	26 – 44
Линалил ацетат	12 - 54	19 - 26	0 – 1,5
<i>цис</i> - и/или <i>транс</i> - β -Оцимен	1,0 - 17	1,0 – 3,0	0 – 0,3
Лавандулол и лавандулил ацетат	0,1 – 14	0,5 – 0,8	0,2 – 1,5
Камфор	0 – 0,2	12	5,3 – 14,3
1,8-Цинеол	2,1 – 3,1	10	25 – 36
α - и β -Пинен	0,02 – 0,3	0,6 – 0,9	1,6 – 3,6
Борнеол	1,0 – 4,0	2,9 – 3,7	0,8 – 4,9
β -Кариофилен	3,0 – 8,0	2,7 – 6,0	0,1 – 0,3
Мирцен	0,4 – 1,3	1,2 – 1,5	0,2 – 0,4
<i>транс</i> - β -Фарнезен	сл.	1,1	0,2 – 0,3
Гермакрен Д	0,2 – 0,9	1,0 – 1,2	сл.
Камфен	0,1 – 0,2	0,3 – 0,6	0,2 – 1,8
Лимонен	0,2 – 0,4	0,9 – 1,5	1,0 – 2,2

В Таблица 3 са представени литературни данни за състав на лавандулови масла с различен географски произход. Shellie et al. (2002), изследват 9 проби от търговски лавандулови масла и установяват голямо отклонение от изискванията на ISO стандарта за някои от характерните компоненти в четири от тях. За тези проби е характерно

високото съдържание на 1,8-цинеол (до 20,28%), камфор (до 7,1%), борнеол (до 14,04%) и ниско съдържание на линалил ацетат (до 4,01%) и лавандулил ацетат (до 0,65%). Подобно високо съдържание на 1,8-цинеол и камфор се съобщава и от други автори (Milhau et al. 1997, Adam et al. 1998). В тези случаи най-вероятно е работено с некоректно идентифицира растителен материал, защото този количествен състав е характерен за етерични масла получени от *L. latifolia*, а не от *L. angustifolia*.

Табл. 3. Компоненти в лавандулови масла в количества над 0,5% в поне една от пробите

Компонент	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]
α-Пинен	0,08-0,73	0,02-0,10	0,25	0,14	0,8	0,34	0,58
Камфен	0,02-0,54	0,03-0,17	0,09	0,13	0,3	0,22	0,04
β-Пинен	0,03-0,63	-	0,08	0,51	0,4	0,18	0,25
Октен-3-ол	0,03-1,14	0,04-0,23	-	-	0,3	0,48	0,53
3-Октанон	0,33-2,61	0,07-2,85	0,90	-	-	1,39	-
Мирцен	0,26-0,78	0,10-0,45	0,35	1,08	0,7	1,27	0,45
3-Октанол	0-0,88	сл.-0,34	-	-	-	0,18	0,08
Хексил ацетат	-	0,08-0,24	-	1,96	-	0,55	-
Лимонен	0,18-3,92	0,04-0,36	0,16	0,59	-	0,42	0,25
1,8-Цинеол	0,10-20,28	сл.-1,62	0,40	3,32	5,2	0,91	13,10
Z-β-Оцимен	0,95-6,17	0,34-5,49	7,20	0,88	2,8	8,23	3,11
E-β-Оцимен	0,34-2,36	0,13-2,41	3,30	1,96	1,4	6,24	-
транс-Сабинен хидрат	0-0,20	-	-	0,11	-	0,11	2,84

<i>цис</i> -Линалол оксид	0,34-1,09	0,06-0,18	-	2,44	-	0,16	0,04
<i>транс</i> -Линалол оксид	0,26-0,99	0,02-0,22	-	1,98	-	0,16	0,05
Линалол	23,03-57,48	27,11-44,35	25,2	20,98	29,5	17,81	20,18
ендо-Фенхол	0,11-0,54	-	-	-	-	-	-
Октен-3-ил ацетат	0,16-4,16	0,02-1,84	-	1,34	0,9	2,49	-
Камфор	0,09-5,08	0,11-0,32	0,18	0,59	3,5	0,45	5,50
Борнеол	0,3-14,04	0,35-1,04	0,60	2,76	1,6	1,06	-
Лавандулол	0,05-3,27	0,19-0,52	0,70	-	-	1,17	3,09
Терпинен-4-ол	0,11-8,07	1,51-4,63	3,50	1,52	2,9	6,43	1,0
Неоизоментол	0,12-4,25	-	-	-	-	-	-
α -Терпинеол	0,12-6,02	0,42-1,09	0,18	4,34	2,5	1,00	1,29
Гексил бутират	0,12-1,72	-	-	0,25	0,38	-	-
Изоборнил формат	0,10-0,52	-	-	-	-	-	-
Кумин алдегид	0,04-0,53	-	-	-	-	0,13	-
Линалил ацетат	6,48-35,39	36,19-42,62	35,90	26,54	41,5	21,84	18,60
Борнил ацетат	0,03-0,32	0,02-0,15	-	0,06	-	0,55	-
Лавандулил ацетат	0,65-6,00	2,09-4,65	4,00	5,49	2,0	7,30	16,01
Нерил ацетат	0,07-1,23	-	0,60	1,02	0,2	0,53	0,87
Геранил ацетат	0,19-2,37	0,28-0,50	0,16	1,95	0,3	0,96	0,45
β -Кариофилен	0,90-2,83	1,82-5,92	5,00	1,08	2,4	8,00	2,15
α -Сантален	-	-	-	-	-	1,11	-
α -Хумулен	-	0,03-0,08	-	-	-	0,25	0,25

<i>E</i> -β-Фарнезен	0,17-1,69	0,40-2,43	-	0,97	1,2	1,98	-
Гермакрен Д	0,16-0,94	-	-	0,14	0,4	0,88	0,80
Лавандулил изовалерат	0-0,73	-	-	-	-	-	-
γ-Кадинен	0-0,39	сл.-0,18		0,56		0,25	
Кариофилен оксид	-	0-0,19	-	3,74	-	-	0,15
Т-Кадинол	-	-	-	0,99	-	0,31	-
α-Бизаболол	0-0,71	-	-	-	-	-	-

Литературен сточник: [1] Shellie et al., (2000); [2] Schmidt, E. (2003); [3] Lawrence (2004); [4] Venskutonis et al., (1997); [5] Milhau et al., (1997); [6] Naef & Morris (1992); [7] Adam et al., (1998).

*Нерол + цитронелол + карвон;

1.3. *Achillea*

1.3.1. Кратки данни за род *Achillea* L. (Равнец)

Семейство Сложноцветни (Asteraceae) е второто по големина след семейство Орхидеи. То включва около 1300 рода с приблизително 22 000 вида, които съставляват около 10% от световната флора.

Родът *Achillea* принадлежи към семейство Сложноцветни (Asteraceae). Той е силно полиморфен и съдържа някои трудно различаващи се видове. Състои се от над 130 вида и подвида многогодишни тревисти растения, които са широко разпространени в северното полукълбо – Азия, Европа, Северна Америка. Голям брой от видовете са ендемични, редки и са забранени за събиране в определени райони, за разлика от други от тях, които са много широко разпространени в големи географски райони.

В българската флора семейство Asteraceae е представено от 72 рода с над 350 вида. Един от тези родове е и рода *Achillea*, чиито представители имат голямо значение като медоносни и лечебни растения.

1.3.2. Ботаническа характеристика и разпространение на *Achillea millefolium* group

Achillea е многогодишно тревисто растение с тънко, хоризонтално разклонено пълзящо коренище. Стъблата са изправени или в основата възходящи, прости, обикновено неразклонени, 20 – 60 (100) см високи, влакнести до голи. Листата са последователни, продълговатолинейни, дълги до 10 см, двойно до тройно пересто нарязани, с почти линейнозаострени крайни дялове, влакнести или голи. Цветовете са събрани в цветни кошнички, които са обратнойцевидни, 5 - 6 мм в диаметър, събрани във върхни щитовидни съцветия. Обвивката на цветните кошнички е съставена от керемидовидно наредени, прилегнали, по ръба ципести листчета. Периферните женски цветове са езичести, бели или розови, закръглени, със зъбчета. Вътрешните цветове са тръбести, двуполови, жълти, със сплесната тръбичка (Кузманов и Анчев, 2012).

Видовете *Achillea*, принадлежащи към групата *Millefolium* са представени в Таблица 4.

Табл. 4. Представители на група *Millefolium*

	Хромозомно число	Вид	Литература
1	2n	<i>A. asplenifolium</i> Vent.*	(Richardson, 1976)
2	2n	<i>A. setacea</i> Wetk.*	
3	2n (4n)	<i>A. roseo-alba</i> Ehrend.	
4	4n	<i>A. collina</i> Becker*	
5	6n	<i>A. millefolium</i> L.*	
6	8n	<i>A. pannonica</i> Sheele*	
7	6n	<i>A. distans</i> Waldst. et Kit. ex Willd.*	
8	4n	<i>A. asiatica</i> Serg.	(Greuter, 2006)
9	6n	<i>A. carpatica</i> Dubovik	
10	4n	<i>A. euxina</i> Klokov	
11	4n	<i>A. inundata</i> Kondr.	
12	4n (6n)	<i>A. nigrescens</i> (E. Mey.) Rydb.	
13	6n	<i>A. apiculate</i> Orlova	
14	8n	<i>A. seidlilii</i> J. Presl & C. Presl	
15	4n	<i>A. stepposa</i> Klokov & Krytzka	
16	4n	<i>A. pratensis</i> Saukel and Langer	(Saukel & Lange, 1992)
17	4n	<i>A. styriaca</i> Saukel & Danihelka	(Rauchensteiner et al., 2002)
18	2n (4n)	<i>A. ceretanica</i> Sennen	(Ehrendorfer, 1998)
19	4n	<i>A. lanulosa</i> Nutt.	(Biste, 1978)
20	4n	<i>A. borealis</i> Bong.	

*Срещани в България (Кузманов и Анчев, 2012)

Съгласно Европейската флора (Richardson, 1976) групата *Millefolium* се състои от 8 вида Бял равнец, някои от които (*A. distans* Weltk., *A. millefolium* L.) са отделени с подвидове. В последствие и други видове Бял равнец (Табл. 3) са включени в групата *Millefolium*; (Danihelka & Rotreklova, 2001 и Rauchensteiner et al., 2002). Съгласно Ehrendorfer (1998) *A. ceretanica* Sennen също принадлежи към основните диплоидни видове от тази група. В отделни случаи някои видове, които първоначално са били известни като цитотипове или подвидове на други видове в последствие са издигнати в ранг на вид (напр. *A. pratensis* Saukel and Langer). Някои северноамерикански и азиатски видове (*A. lanulosa* Nutt., *A. borealis* Bong.) също са били отнесени към групата *Millefolium* (Biste, 1978).

Коректното определяне на даден ботанически вид *Achillea* от групата *Millefolium* е много трудно и е почти невъзможно използвайки само морфологични белези, защото те не са много стабилни. В резултат на хибридизация някои от морфологичните белези могат да се проявяват като нова линия. Някои от видовете *Achillea* проявяват голяма морфологична изменчивост свързана дори с конкретните екологичните условия. При условия на засушаване, отделни издънки от *A. millefolium* L. само по морфологични белези лесно могат да бъдат сгрешени с *A. collina* Becker (Dabrovska, 1977). Според Gurevitch (Gurevitch, 1988) при популации Бял равнец в Сиера Невада, принадлежащи към групата *Millefolium*, морфологичните белези се променят много с промяната на надморската височина. Тази фенотипична промяна се дължи на генетични промени, настъпили в изследваните популации в резултат на екстремната промяна на екологичните условия – температура, влага и интензивността на слънчевата радиация, фактори, необходими за пълноценната фотосинтеза на растенията. Промяна в морфологичните белези е наблюдавана при представители от групата *Millefolium*, култивирани и отглеждани при стресови условия (Kindlovits et al., 2014). Biste, (1978) е описал значителни вариации във височината, дължината на листа, броя на пъпките в съцветието, разклоненията и големината на порите при популации от различни екологични райони на един ботанически вид. Някои морфологични характеристики на едно и също растение при жътва през есента могат съществено да се различават от тези през нормалния период на събиране (Saukel, & Langer, 1992). Въпреки това Rauchensteiner et al., (2002) заявяват, че морфологията на листенцата и на цветчетата са най-подходящите черти при охарактеризиране на видовете от групата *Millefolium*.

1.3.3. Характеристики на етеричните масла на видове *Achillea*

През последните десетилетия хамазуленът се приемаше като най-важния компонент на етеричното масло от *Achillea* и почти всички съобщения са изключително съсредоточени върху неговата идентификация. В последните изследвания, успоредно с разработването на аналитични методи за количественото определяне на хамазулен, са проведени много по-детайлни анализи, чиито резултати дават много по-подробен състав на етеричните масла от видове *Achillea*. Възможностите на съвременните аналитични методи позволяват идентифициране на вещества в концентрации 0.01%. Етеричните масла от някои видове *Achillea* са изключително богати на компоненти. Например при анализ на *A. millefolium* L., *A. pannonica* Scheele и *A. collina* Becker (Hofmann et al., 1992) са регистрирани 149 ГХ пика със съдържание най-малко 0.01%. В

Таблица 5 са представени литературните данни за химичния състав на седем бяло цъфтящи вида *Achillea*. Идентифицирани са 86 компонента в концентрация над 1% в поне една от изследваните проби. Количеството на тези вещества когато са доказани и в другите проби, независимо, че са под 1% също са отразени.

При оценка на публикуваните резултати може да се направи извода, че видовете, принадлежащи към род *Achillea* показват някои общи признаци по отношение на техния етеричномаслен състав.

Моно- и сескитерпеноидите характеризират етеричните масла, предствени в Таблица 5.

1,8-Цинеолът е един от най-често срещаните монотерпеноиди и много често е основен компонент в етеричното масло. Освен резултатите обобщени в Таблицата, 1,8-цинеол се открива и в други видове *Achillea* извън групата *Millefolium*, като *A. oligocephala* (Toker et al., 2003), *A. teretifolia* (Unlu et al., 2002) и *A. compacta* (Kowalczyk et al., 1998).

Съгласно публикуваните резултати допълнително се установява, че монотерпеноиди с борнанов скелет, като камфор и борнеол са съответно вторите и третите най-често срещани компоненти в етерични масла от равнец. Много често тези три вещества присъстват едновременно. Те са основни компоненти и в етерични масла от *A. crithmifolia* W. et K. (Németh et al., 2000, Chalchat et al., 1999), *A. taggetea* Boiss. & Heldr. и *A. fraasi* Sch. Bip. (Magiatis et al., 2002), камфор и 1,8-цинеол в *A. albicantis* C.A. Mey. (Feizbakhsh et al., 2003), *A. pseudoaleppica* Hub. –Mor. (Ozen et al., 2003), *A. talagonica* Boiss. и *A. vermicularis* Trin. (Rustiyan et al., 1998).

α - и β -Пинен са от петте най-често откривани компоненти в етерични масла от равнец, особено в групата *Millefolium* (Kalinkina, 2000). Те са установявани като основни компоненти и в други видове равнец извън групата (*A. tenuifolia* Lam., *A. ligustica* Lam. и *A. gonicephala* Boiss.). Hofman & Fritz (1993) също посочват монотерпеноиди принадлежащи към р-ментановия (в 51%), туяновия (в 23%) и пинановия (17%) скелет сред най-често присъстващи компоненти в маслата от изследваните популации от групата *A. millefolium*.

Освен горе описаните пет вещества, макар и по-рядко, и други компоненти са регистрирани, като основни компоненти в масла от *Achillea*. Туйон е определен в четири вида (Табл. 5), с изключително високо съдържание (70 %) в масло от *A. multifida* (DC) Boiss. (Baser et al., 2002). Аскаридол е основен компонент в изследвани етерични масла от *A. crithmifolia* W. et K. (Karamenderes et al., 2002), *A. bibersteinii* Afan. (Bader et

al., 2003). Пиперитон, освен в *A. setaceae* W. et K. и *A. crithmifolia* W. et K, като основен компонент е намиран и в *A. bibersteinii* C.Atan.. Аскаридол, като основен компонент е намиран в *A. millefolium* L. и в *A. bibersteinii* C.Atan. (Németh, 2005). „Неправилните“ скелети артемизия кетон (*A. ageratum* L. (Puerta et. al., 1996), *A. ligustica* All (Maffei et al., 1993), *A. pseudoaleppica* Hub.-Mor. (Ozen et al., 2003) се установяват в голямо количество в съответните видове.

Сескитерпеноиди се намират в голям брой видове от рода. Хамазулен е бил предмет на изследване на много проучвания. Най-често откриваните сескитерпеноиди освен хамазулен са гермакрен D, β -кариофилен и кариофилен оксид, α -бизаболол и бизаболол оксиди, ейдесмол и фарнезен. Според Hofmann et al., (1992) сескитерпеноидите са най-характерни за видове с малко (2n-4n) хромозомно число, докато монотерпеноидите са характерни за видове с голямо хромозомно число. Някои публикации, обаче, не потвърждават това обобщение.

Kastner et al., (1992) идентифицират 13 вещества които могат да служат като допълнителни инструменти при идентификацията на растителния материал от групата *Millefolium*, т.к. техните съотношения могат да се използват като независими константи за всеки един от ботаническите видове отличаващи ги един от друг. Засега това все още не е широко разпространено.

Съгласно проведени предишни изследвания познаването на енантиомерния състав е от основно значение при различаване и охарактеризиране на отделните видове *Achillea*. Orth et al., (2000) показват, че съотношението на енантиомерите в етеричното масло не зависи от местообитанието (екологичните условия), фазата на развитие на растението, както и от начина на изолирането му. Съотношение на хиралните монотерпени α -пинен, β -пинен и сабинен в изследваните масла може да се използва, като таксономичен маркер. Установено е, че съотношенията на енантиомерите в етерични масла от хибридни линии на представители от *Millefolium* групата (Streinlesberger, 2002) не корелира с морфологията на растенията. За да има по-категорични заключения е необходимо провеждане на допълнителни изследвания в тази сфера.

Табл. 5. Компоненти в етерични масла получени при дестилация на цветове от различни видове *Achillea* в количества над 1 % в поне една от пробите.

<i>ACHILLEA</i>	<i>asplenifolia</i> Vent. [1]	<i>asplenifolia</i> Vent. [7]	<i>crithmifolia</i> W. et K. [9]	<i>crithmifolia</i> W. et K. [2]	<i>crithmifolia</i> W. et K. [11]	<i>crithmifolia</i> W. et K. [13]	<i>crithmifolia</i> W. et K. [14]	<i>millefolium</i> L. [2]	<i>millefolium</i> L. [3]	<i>millefolium</i> L. [4]	<i>millefolium</i> L. [6]	<i>millefolium</i> L. [8]	<i>millefolium</i> L. [9]	<i>setacea</i> W. et K. [12]	<i>setacea</i> W. et K. [5]	<i>setacea</i> W. et K. [7]	<i>distans</i> W. et K. [7]	<i>pannonica</i> Scheele [9]	<i>pannonica</i> Scheele [11]	<i>pannonica</i> Scheele [13]	<i>collina</i> Becker [10]	<i>collina</i> Becker [7]	
Монотерпенови въглеводороди																							
камфен	-	-	1,1	0,5	2,2	0,1	1,5	0,7	-	1,3	0,8	0,1	-	0,2	0,2	-	0,1	1,9	1,8	1,1	0,9		
p-цимен	0,01	-	-	1,8	6,6	0,6	4,7	1,9	-	1,5	2,1	0,7	-	0,5	-	-	0,1	-	1,4	0,6	6,1		
лимонен	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	4,1	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	-	-	0,5	0,1	0,1	
мирцен	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	1,1	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
α-феландрен	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8		1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
α-пинен	-	-	1,2	2,6	3,7	6,7	0,5	2,5	2,5	3,8	2,7	0,1	-	0,2	3,9	-	-	0,8	1,8	7,6	1,8		
β-пинен	-	0,2	-	2,0	1,2	18,7	0,1	5,4	32,6	14,4	28,3*	0,2	0,1	0,1	10,8*	-	1,3	0,6	3,7	2,2	0,6		
сабинен	1,7	-	-	0,7	0,1	2,8	-	0,1	11,5	5,1		0,2	-	0,3		-	0,1	-	0,2	7,1	0,3		
α-терпинен	-	-	12,0	-	-	0,6	-	-	0,5	0,8	2,3	0,1	-	-	0,7	-	0,1	0,4	-	0,2	0,1	0,2	
γ-терпинен	-	-	-	0,3	0,7	1,3	0,1	0,5	0,4	1,8	2,9	0,4	-	0,2	1,3	-	0,1	-	0,4	0,5			
терпинолен	-	-	-	-	-	0,2	-	-	0,4	0,3	0,6	0,1	-	-	-	-	-	0,4	-	0,1	0,2		
цис-+транс-β-оцимен	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,9	-	-	0,2		
Кислородсъдържащи монотерпени																							

артемизия кетон	-	-	3,5	-	4,0	-	4.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-
артемизия алкоголь	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	37,2	0,2	-	-	-	0,7	-	-	-	-
аскаридол	-	-	27,2	-	0,1	-	2.6	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
борнеол	0,8	0,2	1,7	-	16,1	1,0	-	5,9	1,7	3,0	2,1	8,5	2,5	3,6	3,1	-	2,6	16,9	15,0	2,7	3,2	-
борнил ацетат	-	-	-	-	0,7	-	-	-	2,4	1,4	-	-	8,8	0,7	-	-	0,7	0,7	3,6	0,1	0,2	-
<i>изо</i> -борнил ацетат	-	-	-	1,4	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>цис</i> -+ <i>транс</i> -вербенол	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	0,1	-	1,3	-	-	-	-	0,4	0,2	0,7	-
вербенон	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
йомоги алкоголь	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17,7	0,1	-	-	0,1	0,1	-	-	-	0,1
камфор	0,1	0,1	18,8	5,9	27,2	0,2	19.9	11,0	3,7	-	0,2	22,2	-	10,1	5,3	0,4	2,9	10,4	12,7	2,8	9,0	1,3
хризантенол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	0,6	-	-	-	-	1,3	-	2,7	-
хризантенил ацетат	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	2,6	-	-	-	1,4	-
хризантенон	-	-	13,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	8,5	-
1,8-цинеол	0,1	0,1	5,7	15,2	6,0	12,3	5.4	28,8	4,6	8,9	12,8	11,9	5,7	7,8	18,5	-	0,9	43,3	23,3	11,6	27,6	0,3
геранил ацетат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
лавандулол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,3	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
лавандулил ацетат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,6	1,5	-	-	-	-	-	-	-
линалол	0,1	0,1	2,7	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,8	-	0,1	-	-	-	0,3	0,1
линалол оксид	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	8,0	-	-	-	4,9	-
миртенол	0,9	0,2	-	-	0,5	-	0.3	-	-	-	-	0,1	-	8,6	2,4	0,4	0,5	-	0,4	-	-	0,4
миртенал	0,6	0,1	-	-	-	0,9	0.2	-	-	-	-	-	-	1,5	-	0,1	0,3	-	0,3	0,5	-	0,1
<i>цис</i> - и <i>транс</i> - пиперитол	-	-	-	-	0,1	-	0.1	-	-	-	-	5,3	-	0,2	0,1	-	-	-	0,9	-	-	-
пиперитон	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	0,5	-	3,3	-	-	-	-	-	-	0,2	-
пинокарвон	0,4	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	3,8	0,2	1,1	-	1,7	-	0,3	0,1	-	-

пинокарвеол	0,7	0,1	-	-	1,6	2,5	-	-	-	-	-	-	0,2	-	0,3	1,0	-	0,4	-	0,6	1,1	0,2	0,4
<i>цис</i> -+ <i>транс</i> -сабинен гидрат	-	-	-	-	0,3	0,3	0,1	-	-	-	-	-	2,6	-	0,8	0,6	-	-	-	-	0,2	0,4	-
α -терпинеол	1,6	1,2	-	5,3	-	2,0	25,0	2,9	-	1,7	0,6	0,2	-	4,5	3,3	2,2	0,5	2,3	2,2	1,1	2,9	0,6	
терпинен-4-ол	0,4	-	2,3	4,8	5,8	3,6	4,7	2,3	0,4	3,8	-	-	-	0,4	3,5	0,4	0,4	3,1	2,5	0,9	1,8	0,4	
α + β -туйон	-	-	-	-	-	0,1	0,9	-	-	-	-	-	0,2	-	0,6	-	-	-	-	5,3	0,4	4,7	-
нерил формат	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
сабинол	-	-	-	-	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
нерил ацетат	-	3,0	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	0,7	-	-	-	0,1	-	6,4
жасмон	-	-	0,5	0,1	0,4	-	1,2	-	-	-	-	-	0,3	-	0,3	-	-	-	-	-	-	0,8	-
p-мент-3-ен-6-ол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>цис</i> -+ <i>транс</i> -p-мент-2- ен-1-ол	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	1,7	-	0,7	-
p-цимен-8-ол	-	-	-	-	0,6	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	1,1	-
сабинакетон	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
карвакрол	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5	-	-
Сескитерпенови въгледороди																							
β -кариофилен	17,6	0,1	0,6	2,2	0,7	4,1	0,3	3,1	16,5	5,2	6,1	1,2	-	0,2	1,1	0,9	1,5	-	0,4	0,6	-	14,6	
δ + γ -кадинен		0,5	-	-	-	0,2	-	-	-	1,3	2,4	-	-	-	0,9	-	0,4	-	-	0,3	-	1,2	
α + β -фарнезен	4,9	2,7	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,2	1,2	-	-	-	-	2,8	
гермакрен D	12,5	4,8	-	0,4	-	5,2	-	0,7	2,1	3,0	-	0,4	-	-	0,6	5,6	12,7	-	-	20,5	-	41,4	
бициклогермакрен	2,0	0,3	-	-	-	-	-	-	2,7	0,5	-	-	-	-	0,5	-	1,6	-	-	-	-	3,2	
α -хумулен	2,5	3,2	-	0,3	-	0,8	-	0,4	2,1	1,0	1,0	0,1	-	-	-	0,3	0,3	-	-	0,4	-	1,9	
сескифеландрен	1,5	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	0,2	-	0,6	

зингиберен		5,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
хамазулен	13,3	27,9	-	-	-	-	-	-	5,9	2,2	5,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,7
Кислородсъдържащи сескитерпени																							
α + β -бизаболол	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	11,3	-	1,5	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-	0,2
бизаболен оксид	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	3,6	2,8	1,2	3,4	30,2	-	-	0,7	-	-	0,6
виридифлорол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	9,4	-	-	-	-	-	-	1,7
глобулол	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -ейдесмол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -ейдесмол	0,6	0,3	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	0,6	2,3	0,8	1,4	12,9	0,6	0,7	0,3	-	0,4	1,0	
кариофилен оксид	7,2	1,8	1,8	3,0	0,7	4,8	3,4	3,3	3,7	3,7	-	3,6	2,5	5,1	1,6	18,0	-	1,9	1,6	0,7	1,0	1,9	
14-хидрокси-9-епи- β - кариофилен	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
кариофила- 4(14),8(15)-диен-5 β -ол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-
кариофилаен-8-ол	-	0,5	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,8	-	-	0,7	-	-	-	-
кубенол	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-	-	-	5,4	-	-	-	-	-	0,2
τ -муролол	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	0,3	-	0,2	-	-	-	0,5
фарнезол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
неролидол	0,4	-	-	-	-	0,5	-	-	-	4,2	-	-	1,7	0,2	0,9	1,9	0,4	-	1,0	1,1	0,3	0,7	
шпатуленол	-	0,7	-	-	-	0,1	0,3	-	-	1,7	-	0,5	-	0,5	-	4,4	0,1	-	0,1	0,2	0,2	0,3	
селин-11-ен-4- α -ол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,8	2,2	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	
ейдесма-7(11)-ен-4-ол	-	-	-	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
елемол	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	-	0,8	-	2,9	-	-	0,3	4,1	-	-	-	-	0,3	-

Литературен източник: [1] Simic et al., (2002); [2] Smelcerovic et al., (2010); [3] Boskovic et al., (2005); [4] Mockute et al., (2002); [5] Unlu et al., (2002); [6] Kalinkina et al., (2000); [7] Maffei et al., (1993); [8] Kokkalou et al., (1992); [9] Karamendres et al., (2002); [10] Chalchat et al., (2000); [11] Chalchat et al., (1999); [12] Kusmenoglu et al., (1996); [13] Maffei et al., (1994); [14] Tzakou et al., (1993).

* Сума от сабинен и β -пинен.

1.3.3.1. Присъствие на хамазулен в етерични масла от видове *Achillea*

Първоначално, основните изследвания са били съсредоточени върху определяне съдържанието на хамазулен като основен компонент в етеричното масло. Както е известно, той се получава по време на дестилация и е продукт на термичното разпадане на проазуленовите сескитерпенови лактони. На Схема 9 е илюстрирано получаването на хамазулен от матрицин. По време на дестилацията от матрицина се елиминират две молекули вода и една молекула оцетна киселина, при което се получава хамазуленова киселина, съединение със силно противовъзпалително действие, наречено още „природен профен“ (Simonsen et al., 2013). При декарбоксилиране хамазуленовата киселина се превръща в хамазулен.

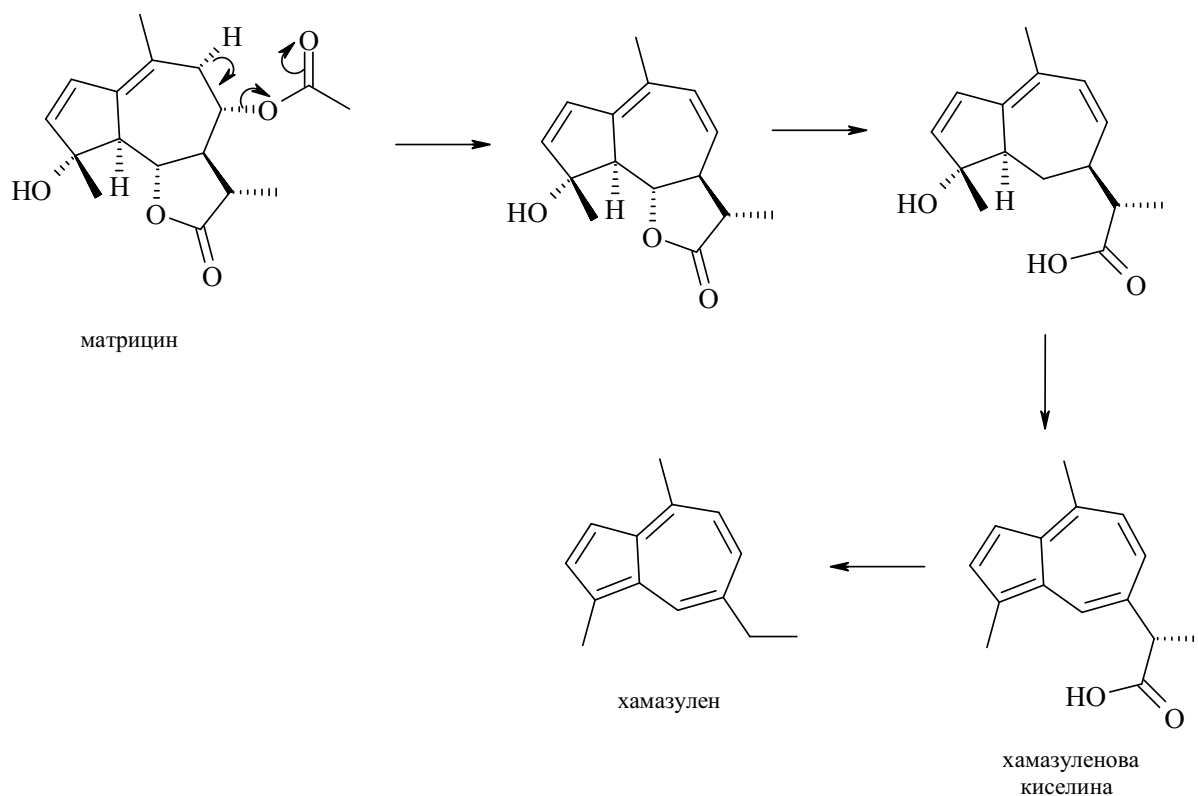


Схема 9. Превръщане на матрицин в хамазулен

В голям брой публикации наличието на хамазулен се приема като характеристичен белег за принадлежност към групата *Millefolium*, но това твърдение не е в сила дори за всички представители на тази група. В някои отделни случаи могат да

се намерят видове извън групата съдържащи хамазулен в етеричното масло, като *A. ageratum* L., *A. wilsoniana* Willd. и *A. compacta* (Németh, 2005).

Някои автори дискутират връзка между хромозомното число на вида и потенциала за натрупване на хамазулен. Oswiecimska (1974) свързва наличието на хамазулен с тетраплоидното ниво (*A. collina* и *A. asiatica* Serg.). Тя разглежда хекса- (*A. millefolium* L.) и октаплоидните (*A. pannonica* Scheele) видове, като непродуциращи хамазулени видове, но не изключва наличието на тетраплоидни видове несъдържащи хамазулен. В етерични масла от *A. asiatica*, Yusubov et al. (2000) и Kalinkina et al. (2000) също установяват наличието на хамазулен. Освен тетраплоидни видове е установено, че и някои диплоидни, като *A. asplenifolia* and *A. roseo-alba* се характеризират с високо съдържание на хамазулен (Bugge, G. 1991). По време на своите изследвания Hofmann & Fritz (1993) не намират корелация между плоидно ниво и наличието на проазулени. Те само установяват намаляваща тенденция в съдържанието на хамазулен с нарастване на хромозомното число. Литовски автори съобщават за някои популации *A. millefolium* L. ssp. *millefolium*, че хамазулен е основен компонент. В други популации те намират, че хамазулен отсъства, но доминират различни монотерпеноиди (β -пинен, борнеол, 1,8-цинеол, камфор) (Mockutė & Judžentienė, 2002). В литературата има данни за съдържание на хамазулен в етерично масло от *A. millefolium* L., вариращо от 0 до 85%, което по-скоро говори за неточности в идентификацията на използвания растителен материал (Németh, 2005).

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

2.1. Материали и методи

2.1.1. Растителен материал

2.1.1.1. Лавандула

Настоящите изследвания са проведени със следните сортове лавандула: „Карлово” (SOM-Co 00407), „Дружба” (SOM-Co 00409), „Хемус” (SOM-Co 00408), „Юбилейна” (SOM-Co 00410), „Севтополис” (SOM-Co 00413), „Рая” (SOM-Co 00412) и „Хебър” (SOM-Co 00411). Насаждението е 4 годишно, намира се в близост до гр. Костинброд и е създадено с вегетативно размножен сертифициран сортов посадъчен материал.

Жътвата се извършва преди обяд (10 – 11 часа) след вдигане на росата в слънчеви и тихи дни, ръчно през няколко дни в периода на цъфтеж. Цветовете се жънат без листа, а дръжките са не по-дълги от 10 см. Фазата на цъфтеж е определена като процентното съотношение на цъфналите плюс прецъфтели цветчета към общия брой цветове и бутони. За целта се взимат 10 съцветия, на всяко съцветие се изброяват цъфналите, прецъфтелите пъпки, бутоните и се изчислява степента на цъфтеж. Получените резултати са усреднени.

2.1.1.2. *Achillea*

Настоящите изследвания са проведени с въздушно-сухи цветове от седем различни популации на *A. crithmifolia* (полски равнец), три популации *A. asplenifolia* Vent. (влаголюбив равнец), осем популации *A. collina* (обикновен равнец) и две популации *A. distans* Waldst. & Kit ex Willd. (горски равнец). Ботаническата идентификация е извършена от доц. д-р Антонина Виткова и проф. д-р Фридрих Ерендорфер. Хербарийни образци са депозираны в хербария на Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания - БАН. Информация за произхода на пробите и хербарийните номера са представени в Табл. 6.

Табл. 6. Използвани проби *Achillea*

Проба №	Хербариен №	Флористичен район	Произход
<i>A. collina</i>			
C1	Со 989	Софийски	Витоша, местн. „Бай Кръстьо“
C2	Со 992	Софийски	гр. Сливница
C3	Со 996	Софийски	с. Долни Лозен
C4	Со 997	Софийски	с. Безден
C5	Со 990	Софийски	Витоша, х. „Морени“
C6	Со 991	Софийски	Витоша, х. „Алеко“
C7	Со 1160	Черноморски	гр. Варна
C8	Со 995	Тракийска низина	гр. Хисаря
<i>A. asplenifolia</i>			
ASP1	162077	Софийски	с. Опицвет, нап. канал
ASP2	Со 988	Софийски	с. Опицвет, реката
ASP3	Со 988	Софийски	с. Опицвет, реката
ASP4	Со 1032	Софийски	с. Опицвет, източно от нап. канал
ASP5	Со 1033	Софийски	с. Безден, блатото
ASP6	Со 1335	Софийски	с. Кътина, влажни полета, западно от селото
ASP7	Со 1336	Софийски	с. Кътина, влажни полета, западно от селото
<i>A. crithmifolia</i>			
CRT1	Со 1009	Стара планина	м/у с. Мирково и с. Буново
CRT2	Со 1007	Тракийска низина	околностите на гр. Хисаря
CRT3	Со 1005	Тракийска низина	околностите на гр. Хисаря
CRT4	Со 1013	Тракийска низина	околностите на гр. Хисаря
CRT5	Со 1006	Тракийска низина	околностите на гр. Хисаря
CRT6	Со 1014	Стара планина	с. Буново, местн. „Ловна среща“
CRT7	Со 1008	Тракийска низина	околностите на гр. Хисаря

<i>A. distans</i>			
DIS 1	Со 1031	Стара планина	местн. „Беклемето“, паметника
DIS 2	Со 1649	Стара планина	местн. „Беклемето“, чешмата
DIS 3	Со 1031	Стара планина	връх „Юмрука“, местн. „Ветровити преслап“
DIS 4	Со 1100	Стара планина	под връх „Юмрука“

2.1.2. Изолитране на етеричното масло

2.1.2.1. Лавандула

Съдържанието на етерично масло в свежи съцветия е определено при лабораторни условия в 10 л. дестилационен апарат изработен от неръждаема стомана, снабден с 0,5 л стъклен флорентински съд, чрез дестилация на съцветията с директна пара с налягане 0,3 – 0,4 МРа. Дестилирани са трикратно по 1,7 – 3,0 кг съцветия. Дестилацията се провежда със скорост 10 % (1,0 л дестилат на час) с продължителност 90 минути. След приключване на дестилацията маслото се изважда от флорентинския съд и се измерва неговия обем (мл). Съдържанието на масло е дадено като процентно съотношение на обема масло към теглото на подложения на дестилация цвят, усреднено от трите дестилации в Табл. 7. Маслото се суши с безводен Na₂SO₄, филтрува се през нагънат филтър и до газ хроматографския анализ се съхранява на тъмно и студено (в хладилник) в пълни до горе, добре затворени стъклени съдове.

За целите на енантиселективния анализ е използвана търговска мостра лавандулово масло (979.14.05.202) предоставена от фирма „Булаттарс“ ООД, гр. София.

2.1.2.2. *Achillea*

Въздушно сухите цветове (100 гр) и 600 мл вода в 1 л колба се подлагат на водна дестилация в модифициран апарат на Клевенджер в продължение на 3 часа. След приключване на дестилацията и отчитане на обема на отделеното етерично масло в апарата се добавя 1 мл диетилов етер, за да се отмие полепналото по стените на апарата масло. Полученият разтвор се суши с безводен Na₂SO₄, филтрува се през нагънат филтър и до газ хроматографския анализ се съхранява на тъмно и студено (в хладилник) в пълни до горе, добре затворени стъклени съдове. Усреднените стойности от трикратно дестилация на въздушно сухи съцветия за съдържанието на етерично

масло в изследваните видове, изразено като отношение на обема на етеричното масло към теглото на растителния материал, е представено в Таблицы от 9 до 12.

2.1.3. Анализ на етеричните масла

Качественият състав на пробите е определен с помощта на газова хроматография (ГХ) по време на задържане и газова хроматография - мас спектрометрия (ГХ/МС) чрез сравняване на получените мас спектри с тези описани в литературата (Stenhagen, 1974; Adams, 1995; Joulain & Konig, 1998) и/или с наши библиотечни мас спектри. Количественото съдържание на компонентите в етеричните масла е определено с ГХ чрез автоматично интегриране на площите на газ хроматографските сигнали по метода на вътрешното нормиране. Резултатите от анализа са представени като средноаритметична стойност от три измервания и са с RSD < 10%.

Условия за ГХ анализ: газхроматограф - газов хроматограф Hewlett Packard 5890 с пламъчно-йонизационен детектор, газ носител азот и линейна скорост 25 см/с

Капилярни колони:

CP WAX 52 CB (полиетилен гликол, 30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм I.D.)

Температура на инжектора и детектора: 270 °C; температурен режим : 50 ° - 220 °C с 4 °C/мин. Рвх. 8 psi, сплит 1:150, инжектирано количество 0,25 мкл

HP-INNOWAX (полиетилен гликол, 30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм I.D.)

Температура на инжектора и детектора: 260 °C; температурен режим: 50 ° - 143 °C с 4 °C за минута, задържане за 1 мин. при 143 °C, повишаване до 220 °C с 4 °C/мин и задържане за 10 мин. при 220 °C. Рвх. 8 psi, сплит 1:150, инжектирано количество 0,25 мкл.

HP 5 MS (5 % фенилметилполисилоксан, 30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм I.D.).

Температура на инжектора и детектора: 260 °C; температурен режим : 50 ° - 230 °C с 4 °C/мин и задържане за 10 мин при 230 °C. Рвх 12 psi, сплит 1:100, инжектирано количество 0,25 мкл.

Условия за ГХ/МС анализ: газов хроматограф HP 6890 с мас селективен детектор HP 5973; газ носител хелий; колона и температурен режим както при съответния ГХ анализ.

Двудименсионална газова хроматография:

Енантиомерното разделяне и количествено определяне е осъществено с помощта на 2 газова хроматографа Hewlett Packard 6890, свързани посредством превключвател на потока тип GERSTEL и мас селективен детектор.

Предварително разделяне е проведено на капилярна колона HP-INNOWAX (полиетилен гликол, 60 м, 0,25 мм, 0,25 мкм I.D.) Температура на инжектора 40 °C, детектор 250 °C; температурен режим: 10 мин. при 60 °C, повишаване с 4 °C/мин до 220 °C, задръжка за 10 мин. при 220 °C, повишаване с 1 °C/мин. до 240 °C и задържане за 40 мин. при 240 °C. Сплит 1:10, инжектирано количество 0,1 µl, газ носител хелий.

Енантиоселективна колона Lipodex E, (октакис (3-О-бутирил-2,6-ди-О-пентил)-γ-циклодекстрин), (70% на OV1701), (25 м, 0,25 мм). Температурен режим: 34 мин. при 40 °C, повишаване с 1 °C/мин до 120 °C и задръжка за 6 мин при 120 °C.

Мас детектор – 70 eV, обхват 35-425 m/z.

2.1.4. Клъстерен анализ

За определяне степента на сходство между популациите е използван клъстерен анализ (Unweighted pair-group average linking and Pearson's index distance measure) със софтуерната програма Statistica 6 (StatSoft). За осъществяване на анализа е използван пълният набор от етеричномаслени компоненти във всяка изследвана проба.

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

3.1. Лавандула

3.1.1. Определяне химичния състав на лавандулови масла от различни сортове

Повишените изисквания през последните години към качеството, безопасността и автентичността на натуралните ароматични продукти могат да бъдат удовлетворени единствено с една достоверна и обективна качествена и количествена характеристика на химичният им състав.

За определяне на химичния състав на маслата са отдестилирани по три проби свеж лавандулов цвят от всеки сорт във фаза пълен цъфтеж (75%). Усреднените стойности от газ хроматографският анализ са представени в Таблица 7, където индивидуалните компоненти са подредени в последователността на тяхното време на задържане на полярна колона (полиетилен гликол) и количеството им е дадено в проценти чрез автоматично интегриране на площите на газ хроматографските сигнали по метода на вътрешното нормиране. От регистрираните 63 газ хроматографски пика в количество над 0,05% поне в една от изследваните проби са идентифицирани 49 индивидуални съединения. Тяхното общо количество възлиза над 97,8% (Табл. 7).

Всички изследвани сортове лавандула се характеризират с високо етерично маслено съдържание с изключение на сорт „Карлово” (1,1 %). При „Дружба” и „Хемус” то е съответно 1,9 % и 2,2 % и достига до 2,9 % и 3,1 % съответно за останалите четири сорта. От тук може да се направи заключението, че поради ниското си етерично-маслено съдържание, вече не е целесъобразно да се отглежда сорт „Карлово” за производство на масло, но и до сега той си остава ненадминат при производството на сушен цвят, благодарение на това, че запазва чистия си син цвят след изсушаване. При останалите сортове е нормално по-старите „Дружба” и „Хемус” да са с малко по-ниско съдържание на масло от останалите, които са селектирани след тях и единият от основните показатели при регистрацията им е бил точно по-високо съдържание на етерично масло от досега съществуващите сортове.

Таблица 7. Химичен състав на лавандулови масла от сортове „Рая”, „Юбилейна” (Ю-а), „Севтополис” (С-с), „Хебър” (Х-р), „Хемус” (Х-с), „Дружба” (Д-а) и „Карлово” (К-о).

Компонент	К.І.	Рая	Ю-а	С-с	Х-р	Х-с	Д-а	К-о
Пентанал	962	сл.	сл.	0,1	0,1	сл.	сл.	сл.
α -Пинен	1021	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
α -Туйен*	1030	сл.	0,2	0,1	сл.	сл.	сл.	сл.
Камфен	1076	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	сл.
β -Пинен	1111	0,1	сл.	сл.	сл.	0,1	сл.	сл.
Сабинен	1121	0,1	сл.	0,1	сл.	сл.	0,1	сл.
Δ^3 -Карен	1142	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1
Мирцен	1159	0,8	0,5	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5
α -Терпинен	1189	-	0,1	-	сл.	-	сл.	сл.
Лимонен	1193	0,6	0,2	0,8	0,4	0,2	0,3	0,4
1,8-Цинеол + β -Феландрен	1211	1,7	0,2	2,2	1,0	1,1	0,8	1,4
Z- β -Оцимен	1229	4,8	7,5	3,1	9,0	3,6	6,4	7,6
γ -Терпинен	1245	сл.	0,2	сл.	сл.	-	0,1	сл.
E- β -Оцимен	1251	2,5	4,5	2,9	4,5	2,2	0,9	0,9
3-Октанон	1268	2,3	1,3	2,5	1,6	2,6	0,1	0,3
p-Цимен	1270	0,3	0,4	0,6	0,6	0,3	0,7	0,6
Терпинолен*	1287	0,1	0,1	0,1	сл,	сл.	0,1	0,1
Хексанол*	1346	0,2	0,1	0,4	0,2	0,3	сл.	0,1

Октенил-3-ацетат	1374	0,9	0,9	1,6	0,9	0,8	1,5	1,5
Октанол + Галбанолен*	1536	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1
Гексил бутират*	1407	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
Z-Линалол оксид*	1432	0,1	0,2	сл.	0,1	0,1	0,1	0,3
Октен-3-ол	1428	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,5
E-β-Сабинен гидрат*	1462	сл.	0,2	сл.	сл.	сл.	сл.	сл.
E-Линалол оксид*	1462	0,1	0,1	сл.	сл.	0,1	0,1	0,2
Камфор	1517	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	сл.
Линалол	1574	29,0	19,1	22,3	23,1	31,8	30,4	27,5
Линалил ацетат	1554	37,7	42,7	35,6	43,5	39,1	43,8	41,2
α-Сантален	1583	0,4	0,4	0,6	0,3	0,3	0,5	1,3
Борнил ацетат	1586	сл.	сл.	сл.	сл.	сл.	сл.	0,1
α-Бергамотен	1574	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3
β-Кариофилен	1594	4,0	2,5	5,7	2,5	4,0	4,2	3,0
Терпинен-4-ол	1602	0,2	6,8	0,5	0,7	сл.	1,5	0,3
Лавандулил ацетат	1604	3,7	4,5	4,7	2,5	3,6	0,7	3,5
Криптон*	1642	0,1	сл.	0,1	0,1	0,1	сл.	0,1
E-β-Фарнезен	1668	2,3	1,2	5,2	2,5	2,6	0,5	1,2
Лавандулол	1682	0,8	0,6	1,3	0,5	0,8	0,4	0,8
α-Терпинеол	1690	0,8	0,7	0,9	0,7	0,8	0,9	0,7
Борнеол+ Гермакрен Д*	1696	1,6	0,8	2,0	0,8	1,1	0,7	1,3

Нерил ацетат	1721	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3
Геранил ацетат	1750	0,5	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,5
Кумин алдехид*	1759	0,1	сл.	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
Нерол	1780	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3
Гераниол	1844	0,4	0,2	0,4	0,3	0,2	0,4	0,4
Кариофилен оксид*	1977	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3
Т-Кадинол	2164	0,1	сл.	0,2	0,1	сл.	0,1	0,3
Монотерпени		9,8	14,2	9,0	15,5	7,2	9,5	10,3
Монотерпеноиди		77,4	76,9	71,0	74,0	79,5	80,8	78,9
Сескитерпени		7,1	4,3	11,8	5,5	7,2	5,4	5,8
Сескитерпеноиди		0,2	0,2	0,5	0,3	0,2	0,3	0,6
Други		4,0	2,8	5,4	3,3	4,4	2,3	2,9
Общо		98,5	98,4	97,7	98,6	98,5	98,3	98,5
Съдържание на масло, % (мл/гр)		2,9	3,1	3,0	3,0	2,2	1,9	1,1

сл. - следи (< 0.05 %); * - За първи път в българско лавандулово масло.

От Таблица 7 се вижда, че няма разлика в качествения състав на етеричните масла получени от изследваните сортове, а само известни количествени разлики на някои от характерните за лавандулово масло компоненти.

В съгласие с типичния химичен състав на лавандулово масло, основните компоненти в изследваните проби са естери и алкохоли, количеството на които варира в сравнително широки граници – 66,5% - 92,0%. От идентифицираните 22 терпенови въглеводорода с обща сума 12,9% - 20,1%, в по-значителни количества са само *Z*- и *E*- β -оцимен, β -кариофилен и *E*- β -фарнезен. Както е отбелязано в Таблица 7, 12 от

компонентите се откриват сега за пръв път в проби от българско лавандулово масло, а именно: α -туйен, терпинолен, хексанол, галбанолен (1,3,5-ундекатриен), хексилбутират, *Z*- и *E*-линалол оксид, *E*- β -сабинен хидрат, криптон, гермакрен Д, куминалдехид и кариофилен оксид. От особено значение за аромата на маслото са някои от тези микрокомпоненти, напр. оксидите на линалол и β -кариофилен. Интересно е да се отбележи, че някои компоненти, намирани преди в български лавандулови масла не са открити в изследваните проби дори и в следи. Това са кислородсъдържащите съединения хексенил ацетат (Бояджиева, 1975), цитронелол (Бояджиева, 1975; Димитров, 1985), терпинил ацетат (Nikolov et al., 1977), кумарин (Димитров, 1985), и сескитерпеновите въглеводороди *ar*-куркумен, β -сантален и γ -кадинен (Vlahov et al., 1967).

Линалол и линалил ацетат са двата основни компонента в лавандуловото масло. Сумарно те съставляват между 60 % и 75 % от маслото. Маслата от сортове „Рая”, „Хемус” и „Дружба” са с най-високо съдържание на линалол (29,0 – 31,8 %), като концентрацията му при останалите сортове не надвишава 23,1 % (Табл. 7). При линалил ацетата не се наблюдават значителни разлики в концентрацията му.

Терпинен-4-ол е нежелан компонент в лавандуловото масло поради неговия тръпчив, билков и с нотка на плесен мирис. Количеството му в изследваните проби варира от следи в маслото от „Хемус” до 1,5 % в маслото от „Дружба”. Изключение прави маслото от сорт „Юбилейна”, което се характеризира с високо съдържание на терпинен-4-ол достигащо 6,8%, което е с почти 30% по-високо от максимално допустимото количество според БДС ISO 3515:2004 (до 5%).

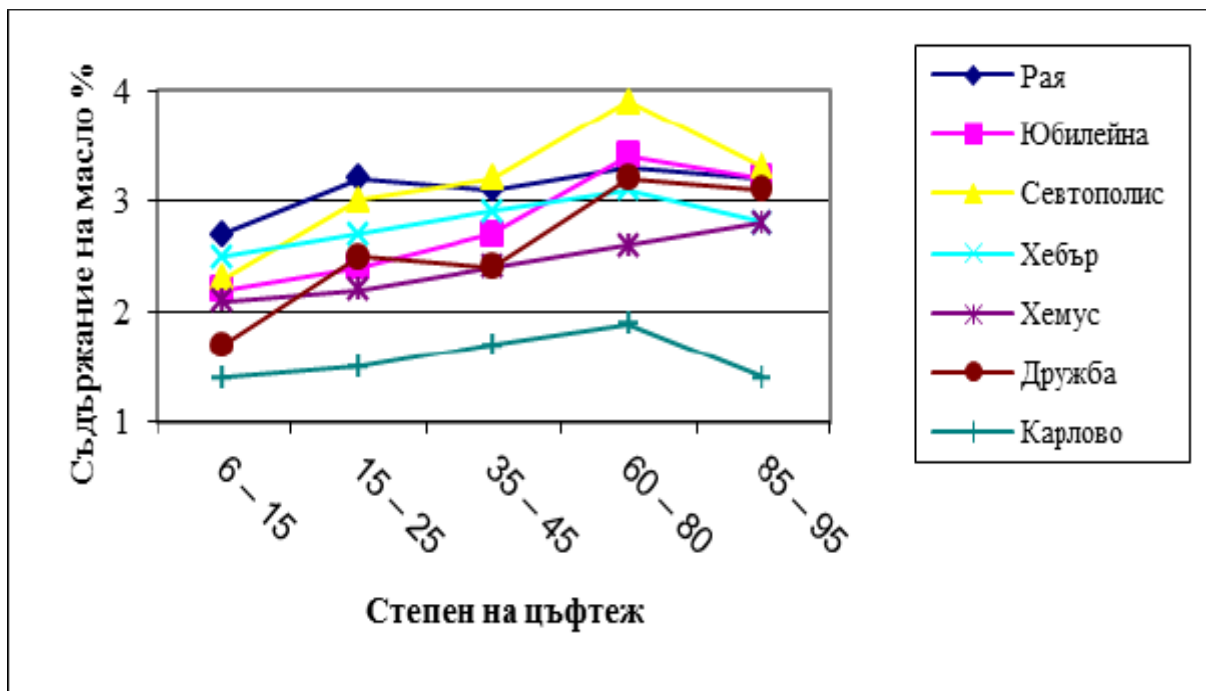
Количеството на *E*- β -фарнезен е най-малко (0,5%) в маслото от сорт „Дружба” и достига до 5,2% в маслото от сорт „Севтополис”, като неговата концентрация в маслата от сортове „Хемус”, „Рая”, „Юбилейна”, „Карлово” и „Хебър” се движи в интервала от 1,2% до 2,6%.

Количеството на *E*- β -оцимен е най-ниско в маслата от сортове „Дружба” и „Карлово” (0,9%), повишава се до 2,2% – 2,9% в маслата от сортове „Рая”, „Севтополис” и „Хемус” и достига до 4,5% в маслата от сортове „Юбилейна” и „Хебър”. Съдържанието на лавандулил ацетат е 0,7% в масло от сорт „Дружба”, 2,5% от сорт „Хебър” и достига до 3,5% – 4,7% в маслата от останалите сортове. 3-Октанон,

притежаващ характерен лавандулов аромат, е с най-ниска концентрация в маслото от „Дружба” (0,1%) и „Карлово” (0,3%) и варираща между 1,3% и 2,6% в маслата от останалите сортове.

3.1.2. Влияние на степента на цъфтеж на лавандуловите съцветия върху количеството и химичния състав на етеричното масло

3.1.2.1. Влияние на степента на цъфтеж на лавандуловите съцветия върху етерично масленото съдържание



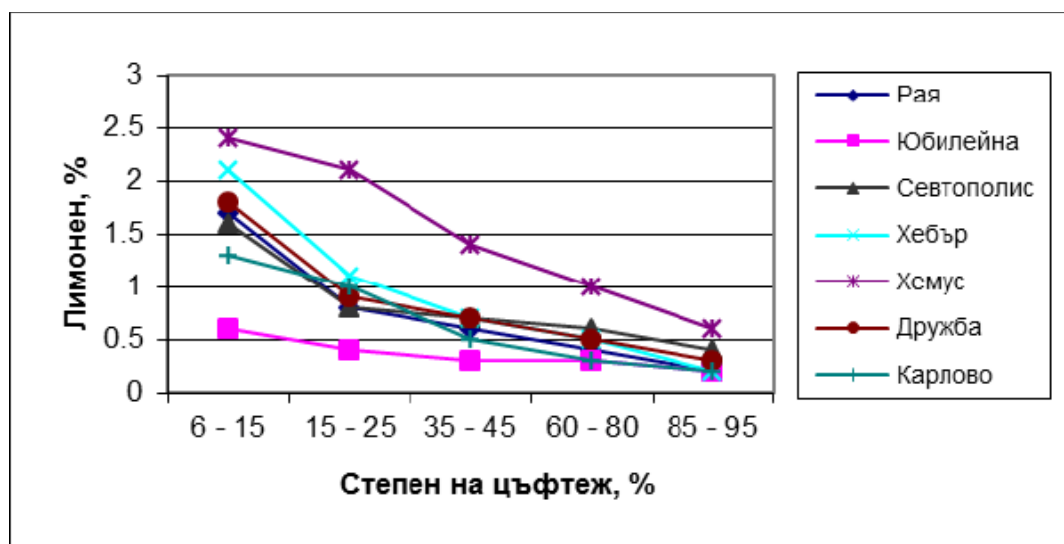
Фиг. 6. Промяна в етеричномасленото съдържание в зависимост от степента на цъфтеж.

Данните за изследваните сортове показват, че с изключение на сорт „Хемус“ максимум на натрупване на етеричното масло в свежа маса настъпва при 60 – 80 % фаза на цъфтеж (фиг. 6). За сортове „Рая” и „Хебър” се наблюдава високо етерично

маслено съдържание в много широк интервал в зависимост от степента на цъфтеж (от 15% до 95%), което е съответно 3,1% – 3,3 % („Рая“) и 2,7% – 3,1% („Хебър“). При останалите сортове се наблюдава подчертан максимум в интервала 60 – 80 % степен на цъфтеж с изключение на сорт „Хемус“, който с плавно нарастване на етеричномасленото си съдържание максимум в края на цъфтежа (85% – 95 %).

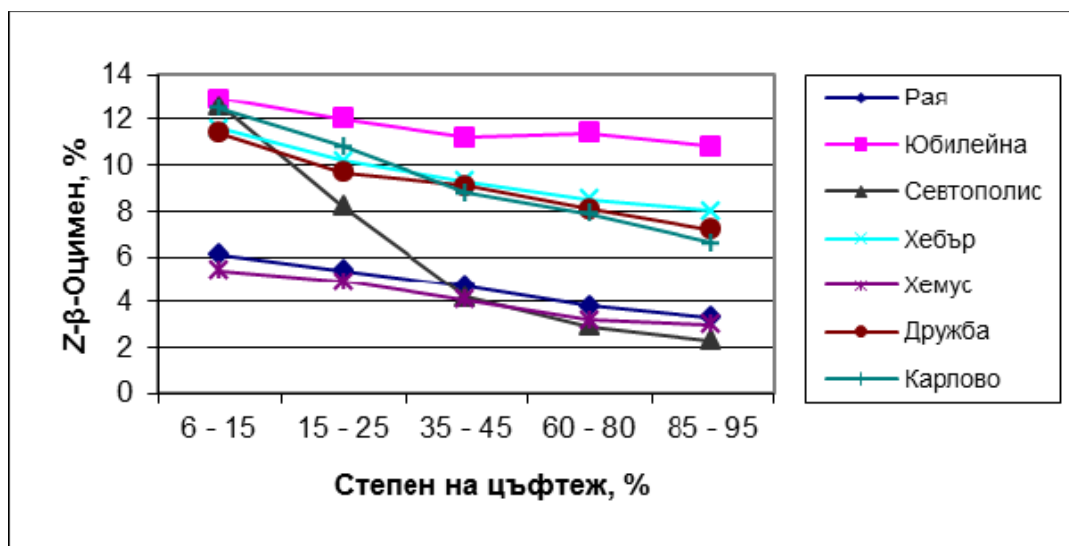
3.1.2.2. Влияние на степента на цъфтеж на лавандуловите съцветия върху количествения състав на характерни компоненти на етеричното масло

Като цяло за всички сортове в началото на цъфтежа е характерно високо съдържание (фиг. 7) на монотерпеновия въглеводород лимонен (1,3% – 2,4%), с изключение на маслото от сорт „Юбилейна“ (0,6%). С напредване на цъфтежа съдържанието му първоначално рязко намалява до 0,8 % – 1,1% при 15% - 25% степен на цъфтеж, след което плавно се понижава до 0,2% – 0,4% в края на цъфтежа с изключение на маслото от сорт „Хемус“, където съдържанието на лимонен първоначално плавно намалява до 2,1% (при 15% - 25%), а след това по-рязко спада и достига до 0,6 % при 85% - 95% цъфтеж.



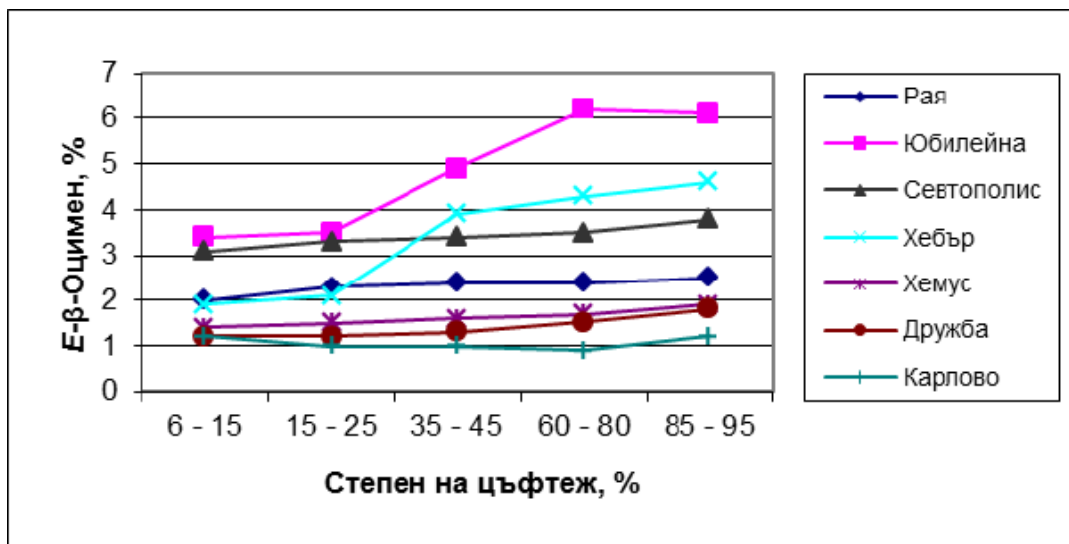
Фиг. 7. Промяна в съдържанието на лимонен в зависимост от степента на цъфтеж.

Съдържанието на Z - β -оцимен (фиг. 8) плавно намалява с напредване на цъфтежа с изключение на маслото от сорт „Севтополис“, при което съдържанието му рязко намалява от 12,6% до 4,2% при 35 - 45% степен на цъфтеж, след това плавно се движи надолу до 2,3%. Най-плавно намаление на съдържанието на Z - β -оцимен се наблюдава при маслото от сорт „Юбилейна“ от 12,5 % до 10,8 % и остава най-високо спрямо съдържанието му в другите сортове.



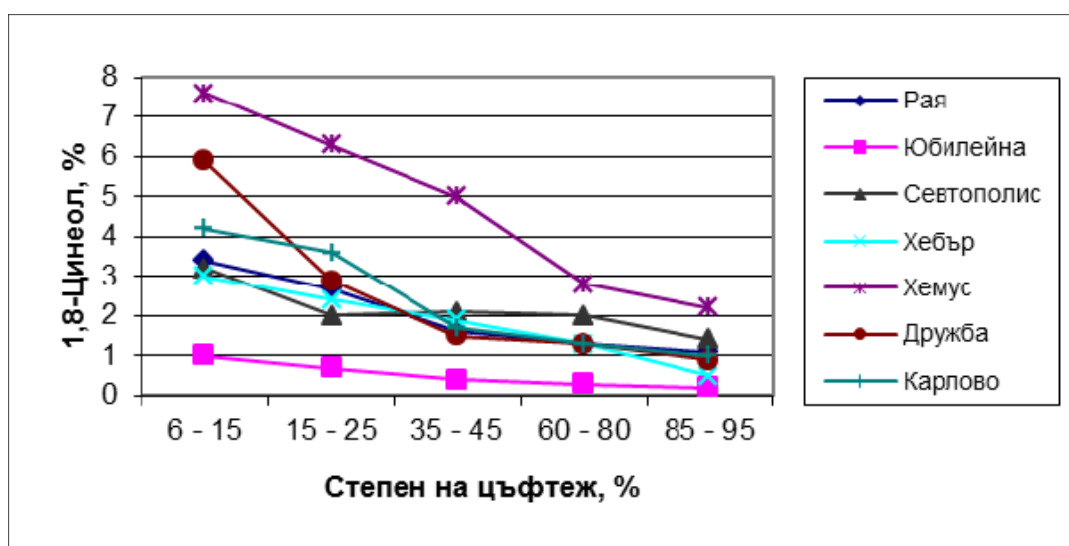
Фиг. 8. Промяна в съдържанието на Z - β -оцимен в зависимост от степента на цъфтеж.

С напредване на цъфтежа съдържанието на E - β -оцимен (фиг. 9) почти се запазва в маслото от сорт „Карлово“, макар и слабо се повишава от 1,2% - 3,1% до 1,8% – 3,8% за останалите лавандулови масла с изключение на маслата от сортове „Хебър“ и „Юбилейна“, при които съдържанието му от 2,1% - 3,5% след 15% - 25% степен на цъфтеж рязко се повишава до 4,6% - 6,1%.



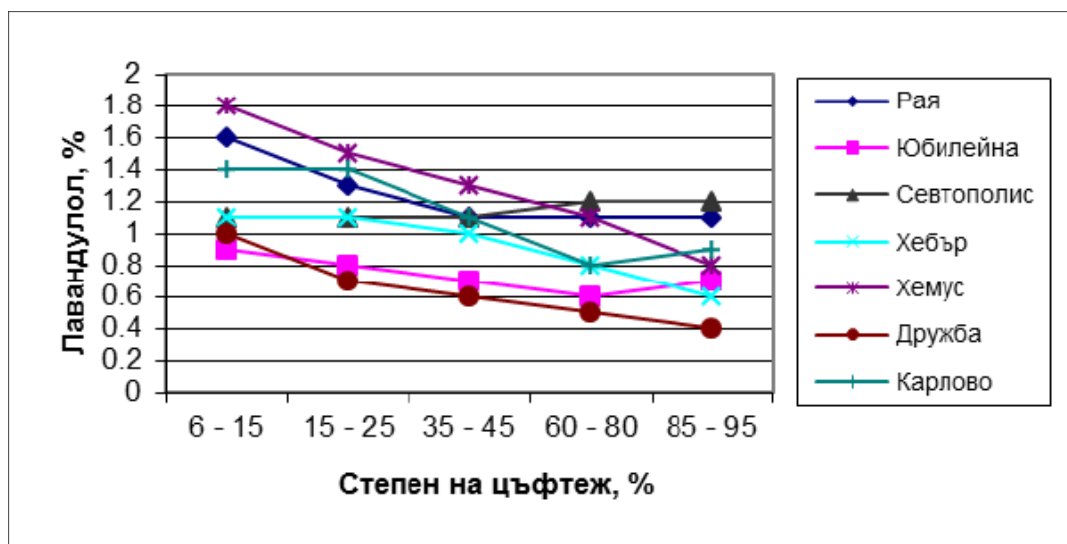
Фиг. 9. Промяна в съдържанието на E - β -оцимен в зависимост от степента на цъфтеж.

От кислород съдържащите съединения при 1,8-цинеол (фиг. 10) също така се наблюдава ясно изразена тенденция към намаляване на съдържанието му във всички лавандулови масла с напредване на цъфтежа.



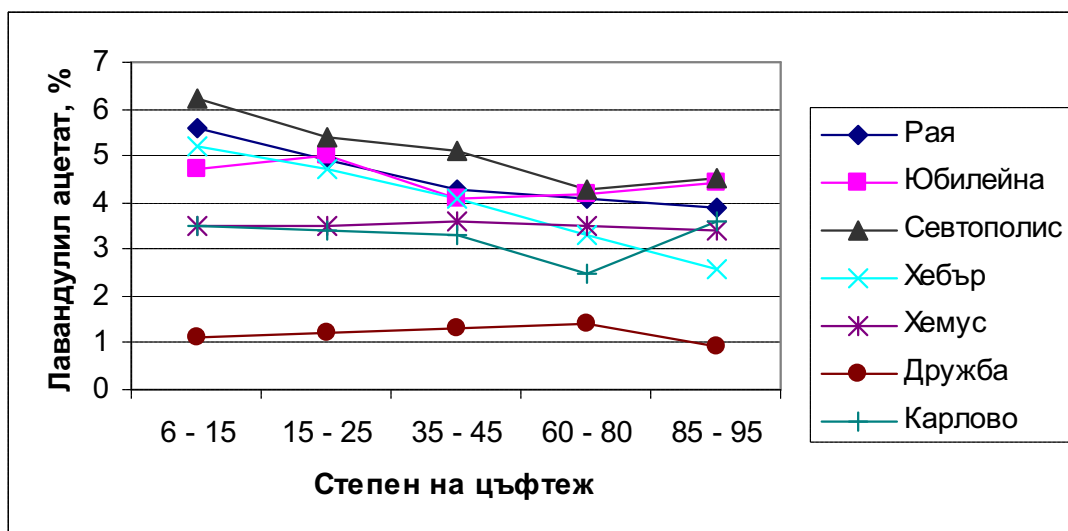
Фиг. 10. Промяна в съдържанието на 1,8-цинеол в зависимост от степента на цъфтеж.

За лавандулола (фиг. 11) е характерна тенденция за намаляване на съдържанието му в лавандулови масла от всички сортове до 60 – 80 % степен на цъфтеж, след което за сорт „Рая” се запазва, а за сортове „Юбилейна” и „Карлово” леко се повишава.



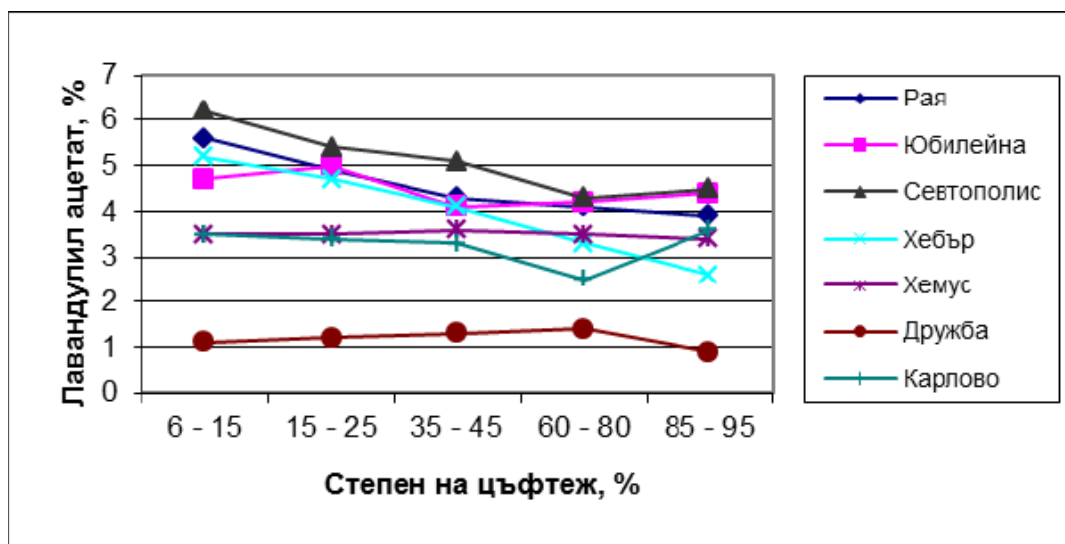
Фиг. 11. Промяна в съдържанието на лавандулол в зависимост от степента на цъфтеж.

Количеството на лавандулил ацетатът (фиг. 12) в зависимост от степента на цъфтеж варира различно при отделните сортове. Така при „Хемус” съдържанието му се запазва почти постоянно през целия период на цъфтеж, в „Рая” и „Хебър” плавно се понижава. В „Дружба” леко нараства, а в „Карлово” намалява с напредване на цъфтежа до 60 - 80%, след което съответно се понижава в „Дружба” и повишава в „Карлово” в края на цъфтежа.



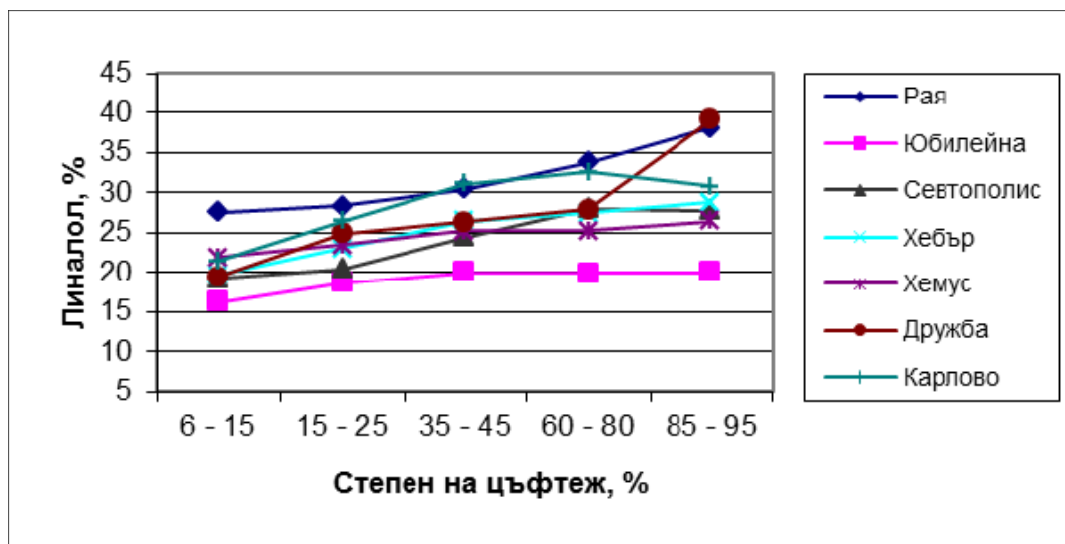
Фиг. 12. Промяна в съдържанието на лавандулил ацетат в зависимост от степента на цъфтеж.

За терпинен-4-ол (фиг. 13) се наблюдава повишение на съдържанието му при маслата от сортове „Дружба”, „Карлово” и „Юбилейна”, при останалите масла съдържанието му почти не се променя с напредване на степента на цъфтеж.



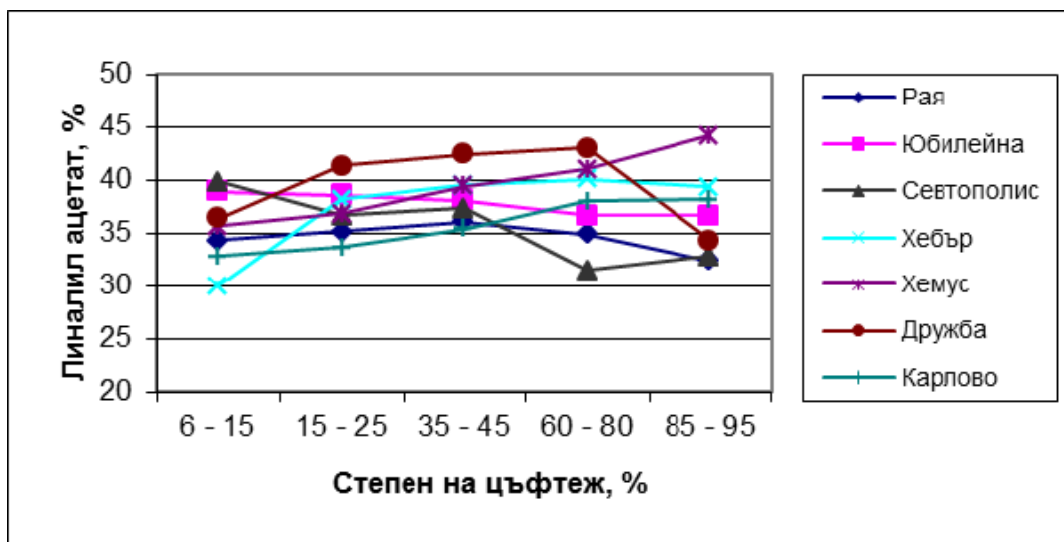
Фиг. 13. Промяна в съдържанието на терпинен-4-ол в зависимост от степента на цъфтеж.

Съдържанието на линалол (фиг. 14) в масла от сортове „Хемус“, „Карлово“, „Юбилейна“, „Севтополис“ и „Хебър“ нараства до 35 – 45% степен цъфтеж, след което се запазва приблизително еднакво. При „Дружба“ и „Рая“ съдържанието му расте през целия период на цъфтеж, като след 80 % цъфтеж рязко нараства.



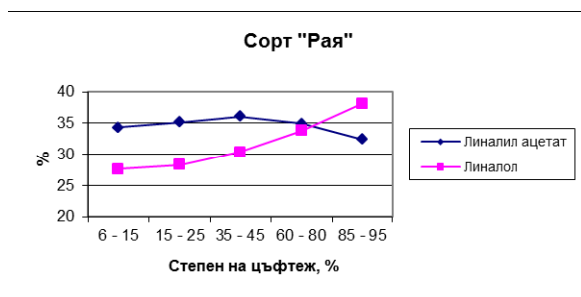
Фиг. 14. Промяна в съдържанието на линалол в зависимост от степента на цъфтеж.

Линалил ацетатът (фиг. 15) е компонентът, който варира в най-голяма степен. При маслата от сортовете „Хемус“, „Карлово“ и „Хебър“ съдържанието му нараства до 25% цъфтеж след което се запазва почти постоянно с максимум при 60 - 80% цъфтеж. Обратната тенденция се наблюдава при маслата от Юбилейна и Севтополис – максимум в началото и постепенно намаляване към края на цъфтеж.

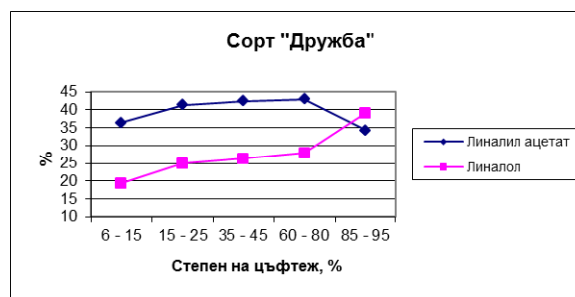


Фиг. 15. Промяна в съдържанието на линалил ацетат в зависимост от степента на цъфтеж.

При масла от „Рая” (фиг. 16) и „Дружба” (фиг. 17) линалил ацетатът нараства до 75% цъфтеж, след което рязко намалява. Това намаление в комбинация с увеличението на линалола води до нетипичното за лавандулово масло съотношение на линалол / линалил ацетат в края на цъфтежа.



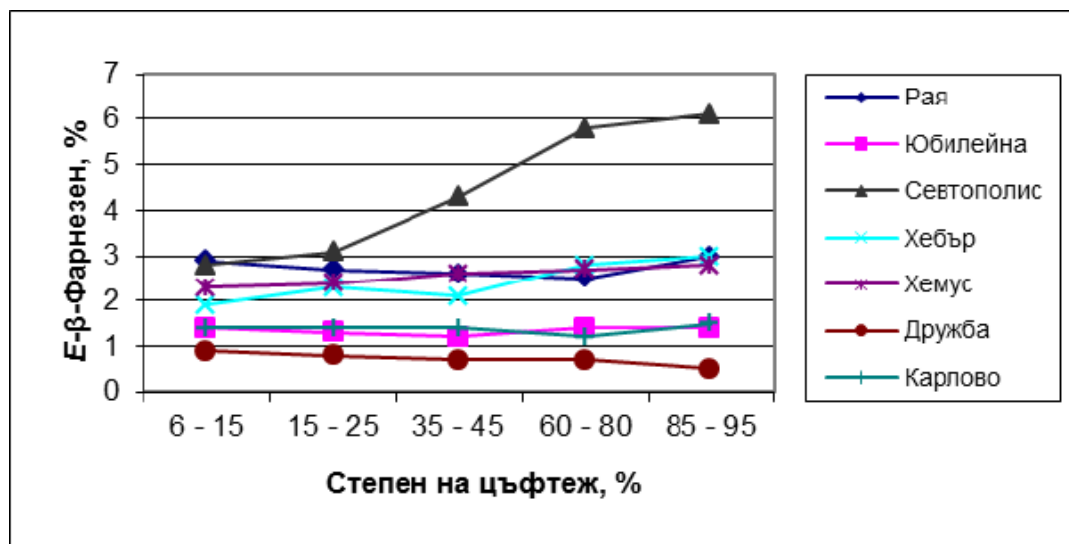
Фиг. 16. Съдържанието на линалол и линалил ацетат в зависимост от степента на цъфтеж.



Фиг. 17. Съдържанието на линалол и линалил ацетат в зависимост от степента на цъфтеж.

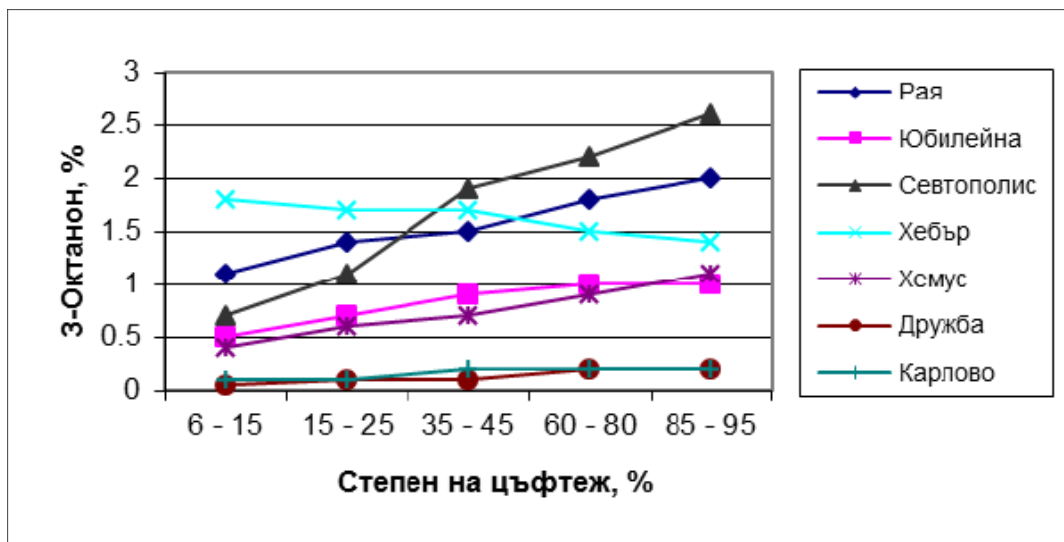
Тази тенденция много отчетливо е регистрирана през 2005 и 2006 година. Жътвата на лавандулата в цялата страна закъсня поради неблагоприятни климатични условия и

във всички търговски партии лавандулово масло концентрацията на линалола бе съизмерима или по-висока от тази на линалил ацетата.



Фиг. 18. Промяна в съдържанието на *E*- β -фарнезен в зависимост от степента на цъфтеж.

E- β -Фарнезенът (фиг. 18) е един от характерните компоненти за българското лавандулово масло, независимо че не фигурира в БДС ISO 3515:2004. Неговата концентрация не се влияе много в периода на цъфтеж: слабо намалява в масло от „Дружба”, слабо се увеличава в масло от „Хемус”, расте в масла от „Севтополис” и „Хебър” и се запазва почти постоянна в маслата от останалите сортове. Промяната в съдържанието на 3-октанон (фиг. 19) в маслата от различните сортове е различно. С напредване на цъфтежа се наблюдава слабо повишение на съдържанието му в масло от „Хемус” и „Юбилейна“, постоянно количество в масло от „Дружба” и „Карлово”, слабо намаление в масло от „Хебър” и рязко повишение в маслата от „Рая” и „Севтополис”.



Фиг. 19. Промяна в съдържанието на 3-октанон в зависимост от степента на цъфтеж.

Количеството на други два характерни компонента, камфор и α -терпинеол, определящи автентичността и ароматичните качества на лавандуловото масло се запазва постоянно за целия период на цъфтеж на растенията.

3.1.3. Енантиомерен състав на лавандулови масла

Липсват експериментални данни за енантиомерния състав на българско лавандулово масло. Енантиомерният състав на линалол и линалил ацетат вече е фармакопейно изискване (07/2010:1338) за лавандулово масло (*Lavandula angustifolia* Mill.). Разработен е общ ISO стандарт (ISO 22972:2004) за определяне на енантиомерния състав на компоненти в етерични масла с капилярни хирални колони, който е приет и в България (БДС ISO 22972:2006), след което следва разработването на стандарти и за конкретни етерични масла.

В това изследване са включени трите най-широко разпространени сорта в страната, формиращи характера на българското лавандулово масло. За сравнение е използвана една търговска мостра българско лавандулово масло с максимални гаранции по отношение на неговата автентичност.

От получените резултати (Табл. 8) се вижда, че няма значима разлика в енантиомерния състав на трите компонента между търговската и лабораторно дестилираните проби. Това означава, че стандартната технология за производство на лавандулово масло не оказва съществено влияние върху съотношението на енантиомерите, основно на линалола. (*R*)-(-)-Линалил ацетат е основния енантиомер в лавандуловото масло, като съдържанието му е не по-малко от 99 %. Възможната хидролиза на естера до линалол в резултат на прекалено дълга парна дестилация (>1.5 часа), водна дестилация или на други странични фактори не променя неговата енантиомерна чистота. Наличието на (*S*)-(+)-енантиомера над 1 % е сигурен признак за наличие в лавандуловото масло на синтетичен линалил ацетат, който е рацемат. Полученият линалол в резултат на хидролиза е рацемат поради преминаването през карбокатион. Съдържанието на (*S*)-(+)-енантиомера на линалол при нормална парна дестилация достига до 5 %, при водна или по-продължителна парна дестилация до 8 % при допустими според Европейската фармакопея до 12 %. Концентрация над 12 % със сигурност се дължи на наличие в лавандуловото масло на синтетичен линалол. Камфорът е един от характерните компоненти, отличаващи лавандуловото от лавандиново и спиково масло, като в последните той е с висока концентрация. Литературните данни за енантиомерното съдържание на камфор в лавандулово масло са ограничени. Съобщава се както за проби с висока енантиомерна чистота на (*R*)-(+)-камфор така и с високо съдържание на (*S*)-(-)-камфор. В изследваните проби преобладава (*S*)-(-)-енантиомера с изключение на „Дружба”, където двата са в съотношение приблизително 1:1.

Детайлните стереохимични изследвания на етеричните масла могат да дадат отговор на много въпроси свързани с хемотаксономията на растителния материал и по-голяма обективност при извършването на качествения контрол.

Таблица 8. Енантиомерен състав (%) на линалол, линалил ацетат и камфор

Проба	Линалол		Линалил ацетат		Камфор	
	(<i>S</i>)-(+)	(<i>R</i>)-(-)	(<i>S</i>)-(+)	(<i>R</i>)-(-)	(<i>R</i>)-(+)	(<i>S</i>)-(-)
Търговска	4,9	95,1	0	100	34,1	65,9
„Дружба”	3,4	96,6	0	100	52,2	47,8
„Хемус”	5,0	95,0	0	100	36,8	63,2
„Рая”	3,8	96,2	0	100	27,4	78,6

3.2. *Achillea*

3.2.1. Определяне на химичния състав на видове от род *Achillea*

3.2.1.1. *A. crithmifolia*

Етеричните масла получени чрез водна дестилация на въздушно сухи цветове от *A. crithmifolia* от седем различни популации (CRT 1 – CRT 7), са анализирани с ГХ и ГХ-МС и 40 компонента, съставляващи 75,9% до 96% от маслото са идентифицирани. Качественият и количествен състав, както и етеричномасленото съдържание на изследваните проби са представени в Таблица 9 по реда на тяхното елуиране върху колона HP-5MS.

Етеричномасленият състав на изследваните проби се характеризира с ниско съдържание на сескитерпеноиди (2,3 – 9,7%), пълна липса на хамазулен и значително вариране в количественото съдържание на кислородсъдържащите монотерпеноиди (64,2 - 81,2%), които имат отношение към аромата на маслата. Например, артемизиа алкохол (0 - 46,2%), йомоги алкохол (0 - 10,4%), 1,8-цинеол (1,9 – 46,9%), линалол (1,0 - 17,5%), хризантенон (0 – 10,3%), камфор (0,5 - 36,3%), *транс*-хризантемил ацетат (0 - 21,9%) варират в широки граници в различните проби.

Съгласно приложения клъстерен анализ, представен чрез дендрограма (Фиг. 20) етеричните масла се разделят на две основни групи.

За първата група, включваща проби CRT1 и CRT2 е характерно високо съдържание на артемизиа алкохол (23,5% и 46,2%). Друг неправилен монотерпеноид, йомоги алкохол също е намерен в не малко количество (съответно 3,2% и 10,4%). Трябва да се отбележи, че тези два компонента отсъстват в останалите пет проби. Те не са типични компоненти за етерични масла от равнец и досега са намирани само в *A. millefolium* subsp. *millefolium* (17,7% и 37,2%) (Karamenderes et al., 2002), *A. ageratum* (16,5- 22,3% и 2,7-7,6%) (Muselli et al., 2007, Puerta et al., 1996, Maffei et al., 1993), *A. filipendulina* (Sharapov & Setzer, 2010, Sadirberov, 2006) *A. serbica* и *A. fragrantissima* (3,3-4,4% и 0,3-0,8%) (Aboutabl et al., 1986, El-Shazly et, 2004). Присъствието на β -туйон (1,8% и 1,1 %) и 1-епи-кубенол също отличават тези две проби от останалите пет, в които тези съединения не са регистрирани даже в следи. *E*-хризантенил ацетат е също характерен компонент на двете масла и достига 21,9% в CRT1, но освен в тях е открит и в CRT6 (3,1%). Проби CRT1 и CRT2, макар че произхождат от различни райони (Софийски район и Тракийска низина) имат много общи химически характеристики, които ги причисляват към един хемотип, съдържащ неправилни монотерпеноиди.

Втората група, включваща CRT3-CRT7 имат много общи компоненти, чиито количества обаче са много различни. Тези проби могат да бъдат разделени допълнително на 3 подгрупи в зависимост от концентрацията на камфор. Една от подгрупите има един представител, проба CRT6, която е най-бедна на камфор (5,6%) и се отличава с максимално съдържание на линалол (17,5%), хризантенон (10,3%) и *транс*-сабинен хидрат ацетат (5,5%). Втората подгрупа включва проби CRT3 и CRT4 (Тракийска низина) с максимално количество на камфор съответно 36,3% и 33,6%. Друг компонент с високо съдържание в тези проби е линалол (11,3% и 7,6%), следван от борнеол (10,1%) в CRT3 и терпинен-4-ол (10,1%) в CRT4. Съдържанието на 1,8-цинеол и *цис*-сабинен хидрат също е различно в тези две масла. Докато 1,8-цинеол е в по-висок процент в CRT3, *цис*-сабинен хидрат е в по-висока концентрация в CRT4. Отсъствието на хризантенон отличава тези две проби от останалите. Въпреки дискутираните разлики между CRT3 и CRT4, етеричномасления профил на тези проби демонстрира тяхната близост.

Останалите две проби, CRT5 и CRT7 формират третата подгрупа с умерено съдържание на камфор (15,9 и 13,4%). Други характерни компоненти са 1,8-цинеол и α -терпинеол. Сантолина триен и α -туйен присъстват само в тях. В CRT5 количеството на 1,8-цинеол и камфор е от един порядък (15,4 и 15,9%), докато в CRT7 1,8-цинеолът е базов компонент, достигащ 46,9%.

В изследваните от нас проби съдържанието на монотерпенови въглеводороди е сравнително ниско и достига до 14,1 %, за разлика от други етерични масла от *A. crithmifolia* (Maffei et al., 1994), за които е намерено двойно по-високо количество, достигащо до 31,9 %. От друга страна монотерпеновият алкохол ахиленол, който е основен компонент на един хемотип от унгарски произход (Héthelyi et al., 1989) не е намерен в изследваните от нас проби.

Намерените досега данни за състав на етерични масла от *A. crithmifolia* показват, че видът с произход Сърбия (Palic et al., 2003) е с относително високо съдържание на *транс*-хризантенил ацетат (16,6%), ниско съдържание на сантолина триен (0,8%) и основни компоненти са камфор (27,6%) и 1,8-цинеол (26,5%). В етерични масла от полска *A. crithmifolia* (Kowalczyk et al., 2003) също е установено значително количество *транс*-хризантенил ацетат (14,9% и 10,2%) и основните компоненти са камфор, 1,8-цинеол и допълнително β -туйон и борнеол. За разлика от гореспоменатите европейски произходи в етерично масло от *A. crithmifolia*, от Турция (Karamenderes et al., C. 2002) е

намерено високо съдържание на хризантенон (13,5%), като основните компоненти са аскаридол (27,2%) и камфор (18,8%). Характерно за този вид е отсъствие на хамазулен.

Въз основа на получените резултати може да се обобщи, че етеричните масла от *A. crithmifolia* са от монотерпенов тип. Като основни типове преобладават монотерпеноиди с камфанов и р-ментанов въглероден скелет следвани от пинанови и туйанови монотерпеноиди. За две от пробите са характерни „неправилните“ монотерпеноиди.

Според Radulovich, (2007) най-често срещаният на Балканския полуостров тип етерични масла от равнец е 1,8-цинеол-камфор-борнеолов. Резултатите от нашите изследвания не определят еднозначно нито една от пробите към този тип. В CRT5 и CRT7 1,8-цинеол-камфор са основни компоненти, но трети е терпинен-4-ол. Качествените и количествени разлики в етерично-масления състав демонстрират значителна вътревидова изменчивост.

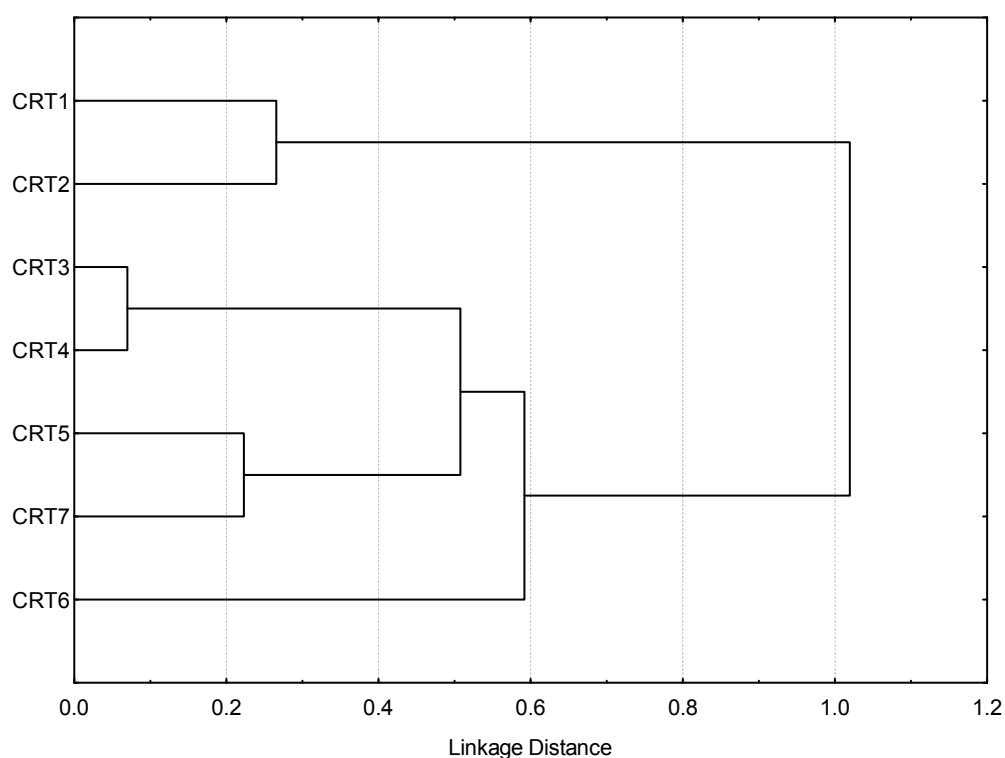
Таблица 9 Химичен състав на етерични масла от *A. crithmifolia* (%)

Компонент ^a	К.И.	CRT 1	CRT 2	CRT 3	CRT 4	CRT 5	CRT 6	CRT 7
Сантолина триен	908	3,1	4,9	0,1	-	0,7	-	0,3
α-Туйен	931	-	-	0,3	0,1	0,1	-	0,1
α-Пинен	939	0,4	0,3	2,3	1,4	1,0	0,6	1,6
Камфен	953	0,1	0,1	4,9	2,9	1,5	0,3	0,7
Сабинен	976	0,4	1,2	0,3	0,3	1,1	0,6	5,9
β-Пинен	980	0,1	0,2	1,0	0,7	0,7	0,2	1,6
Йомоги алкохол	998	3,9	10,4	-	-	-	-	-
α-Терпинен	1018	4,9	1,6	0,3	1,2	2,0	3,0	1,2
ρ-Цимен	1026	1,3	0,5	2,1	3,2	3,3	0,9	0,6
Лимонен	1031	0,1	0,1	0,3	0,2	0,5	сл,	сл.
1,8-Цинеол	1033	2,9	10,7	7,5	1,9	15,4	12,4	46,9
γ-Терпинен	1062	0,6	0,4	0,4	1,4	1,3	0,2	0,6
цис-Сабинен хидрат	1068	0,2	0,3	0,8	6,7	1,7	0,9	0,8
цис-Линалол оксид	1074	-	-	0,6	0,2	сл,	0,2	-
Артемизия алкохол	1083	23,5	46,2	-	-	-	-	-
транс-Линалол	1088	-	сл.	0,5	0,3	0,1	0,2	0,1

оксид								
Линалол	1098	1,0	1,6	11,3	7,6	1,0	17,5	2,1
α -Туйон	1102	0,3	сл.	0,7	сл.	сл.	0,9	сл.
β -Туйон	1114	1,8	1,1	-	-	-	-	-
<i>цис</i> - ρ -мент-2-ен-1-ол	1121	0,5	0,4	0,4	0,8	0,3	0,6	0,3
Хризантенон	1123	3,9	0,3	-	-	сл.	10,3	сл.
α -Камфоленал	1125	-	0,1	0,4	0,1	0,1	сл.	0,5
Камфор	1143	0,7	0,5	36,3	33,6	15,9	5,6	13,4
Борнеол	1165	1,3	1,4	10,1	3,7	6,1	1,7	2,8
Терпинен-4-ол	1177	0,2	0,5	3,2	10,1	4,0	1,8	2,2
α -Терпинеол	1189	0,3	1,5	1,3	0,8	10,1	2,6	7,5
<i>транс</i> -Хризантенил	1235	21,9	2,8	-	-	-	3,1	-
ацетат								
<i>транс</i> -Сабинен	1253	3,1	1,0	1,4	3,1	1,3	5,5	0,8
гидрат ацетат								
Борнил ацетат	1285	1,2	0,3	1,0	1,0	3,6	0,5	0,4
Евгенол	1356	0,2	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4
Жасмон *		0,1	1,7	0,7	1,3	4,0	1,0	0,8
β -Кариофилен	1418	0,3	0,2	0,1	1,1	1,2	0,5	1,1
Гермакрен Д	1480	0,6	1,0	0,3	2,5	2,2	1,9	1,2
β -Селинен	1485	-	-	0,2	0,1	0,3	0,1	-
α -Турмерол	1578	0,4	0,5	0,3	0,5	1,0	0,2	0,3
Кариофилен оксид	1581	1,0	0,3	1,0	2,0	5,0	1,1	1,7
1-эпи-Кубенол	1627	2,0	1,9	-	-	-	-	-
Эйдесмол *		0,2	0,2	0,4	0,4	0,7	0,2	0,1
Валеранон	1672	сл.	сл.	сл.	сл.	сл.	0,8	сл.
Гексадеканова		0,3	0,1	0,2	1,4	0,1	0,1	0,2
киселина *								
Монотерпени		11,0	9,3	12,0	11,4	12,2	5,8	12,6
Монотерпеноиди		66,7	79,1	75,5	69,9	59,6	63,8	77,8
Сескитерпени		0,9	1,2	0,6	3,7	3,7	2,5	2,3
Сескитерпеноиди		3,6	2,9	1,7	2,9	6,7	2,3	2,1

Други		0,6	2,1	1,3	3,0	4,6	1,5	1,4
Общо:		82,8	94,6	91,1	90,9	86,8	75,9	96,2
Съдържание	на	0,31	0,40	0,39	0,16	0,18	0,29	0,25
масло, % (мл/гр)								

^a Ред на елуиране на колона HP-5MS; сл.=следи (<0,1%); * С неопределена стереохимия.



Фиг. 20. Дендрограма на етерични масла от *A. crithmifolia*

3.2.1.2. *A. asplenifolia*

Резултатите от ГХ и ГХ-МС анализи на качествения и количествен състав на седем етерични масла от *A. asplenifolia* от три различни популации са представени в Таблица 10. Идентифицирани са 26 компонента, съставляващи над 72,8 % от маслото. Количеството на монотерпените варира от 9,8 до 51%, а това на сескитерпените - от 12,7 до 74,6%. Съдържанието на кислородсъдържащи моно- и сескитерпеноиди е значително по-ниско. Трябва да се отбележи, че с изключение на една (ASP6) всички проби етерични масла са богати на хамазулен. Други характерни компоненти в

изследваните проби са монотерпените сабинен и β -пинен като преобладава единия или другия. В зависимост от тяхното количество, етеричните масла от *A. asplenifolia* могат да бъдат групирани в две основни групи, както е показано на дендрограмата на Фигура 21.

В първата група са включени проби ASP1, ASP3, ASP4, ASP5 и ASP7 богати на хамазулен. ASP1 и ASP4 съдържат най-много хамазулен - над 59,0%, каквото количество се установява за първи път в изследвания вид, а сабинен и β -пинен са в умерени концентрации (2,2; 6,1% в ASP1 и 4,2; 4,0% в ASP4). Тези проби формират подгрупа, към която се причислява и ASP3. В последната е регистрирано също високо съдържание на хамазулен (44,3%), но също така и значително количество β -пинен (16,7%). Втората подгрупа (ASP5 и ASP7) се характеризира с умерено съдържание на хамазулен (25,6% и за двете проби) и максимално количество на β -пинен (21,4 и 43,6%). Тези две проби се отличават от останалите и по най-високо съдържание на α -пинен и 1,8- цинеол.

Към втората група принадлежат пробите ASP2 и ASP6, в които сабинен е основен компонент, регистриран в количества 39,2 и 28,7%, съответно. Струва си да се отбележи, че според някои литературни източници, това характерно за вида съединение, не се открива дори и в следи в таксони *A. asplenifolia* (Héthelyi et al., 1989).

Други вещества присъстващи във всички анализирани масла в концентрация над 1% са сескитерпеноидите β -кариофилен, гермакрен Д, α -зингиберен и кариофилен оксид. Същите съединения са основни компоненти в етерично масло от диворастяща *A. asplenifolia* от бивша Югославия (Simic et al., 2002). За диворастяща *A. asplenifolia* от северна Италия (Maffei et al., 1993) е съобщено високо съдържание на хамазулен (27,9%), зингиберен (5,2%) и гермакрен Д (4,8%), а сабинен и β -пинен - в следи. Rauchsteiner et al., (2002) намират, че за *A. asplenifolia* е характерно доминиране на β -пинен и високо съдържание на сабинен и β -кариофилен.

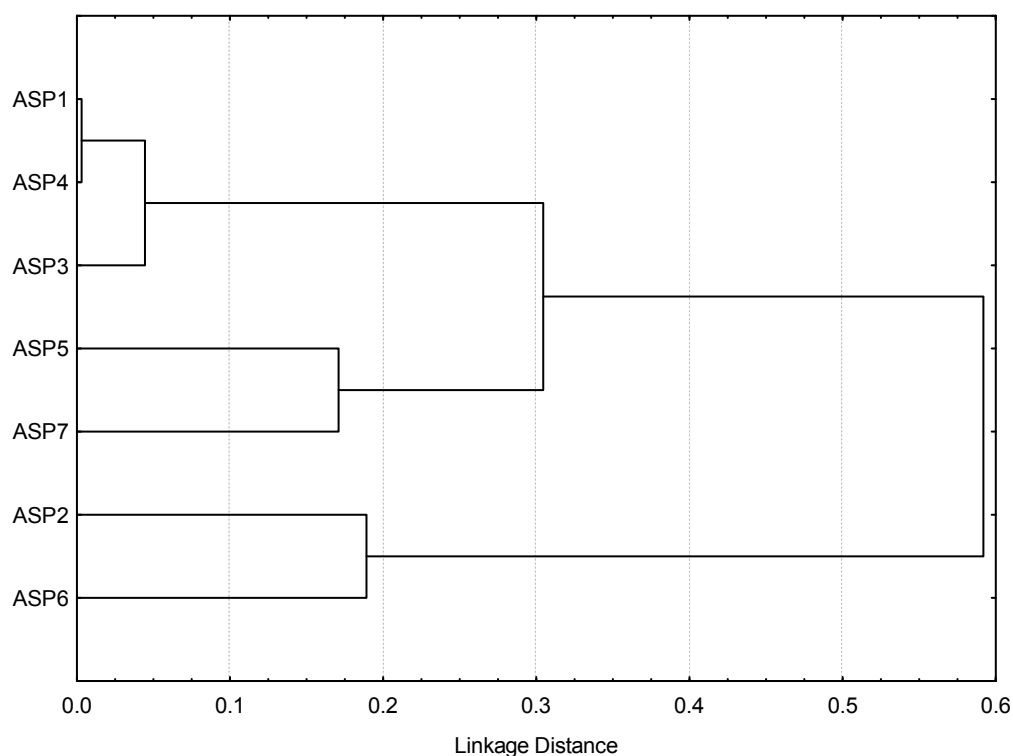
Най-общо от нашите резултати и публикуваните в литературата данни може да се каже, че въпреки наблюдаваната изменчивост, видът се характеризира с високо съдържание на хамазулен, сабинен и β -пинен, като не се наблюдава пряка зависимост в количеството на хамазулен и другите компоненти.

Таблица 10. Химичен състав на етерични масла от *A. asplenifolia* (%)

Компонент ^a	К.И.	ASP1	ASP2	ASP3	ASP4	ASP5	ASP6	ASP7
α-Туйен	931	сл.	сл.	сл.	сл.	0,3	0,2	сл.
α-Пинен	939	0,4	1,0	1,2	0,2	2,2	0,9	4,2
Камфен	953	-	-	-	-	-	-	0,1
Сабинен	976	2,2	39,2	2,1	4,2	15,9	28,7	сл.
β-Пинен	980	6,1	4,0	16,7	4,0	21,4	7,6	43,6
Мирцен	991	0,2	0,5	0,2	1,0	0,6	0,3	0,3
α-Феландрен	1005	-	-	-	-	0,5	0,2	1,1
α-Терпинен	1018	0,1	0,6	сл.	0,1	0,7	0,2	сл.
p-Цимен	1026	сл.	0,4	0,1	0,1	0,5	1,0	0,1
Лимонен	1031	0,3	0,3	0,6	0,3	0,1	сл.	0,1
1,8-Цинеол	1033	0,4	1,3	1,7	0,5	2,8	1,4	3,3
Z-β-Оцимен	1040	0,3	0,2	0,8	0,2	0,2	0,1	0,4
E-β-Оцимен	1050	0,1	1,1	0,1	0,2	0,6	0,3	0,9
γ-Терпинен	1062	-	0,1	-	-	0,8	-	0,1
Борнеол	1165	0,3	0,1	0,7	-	1,2	1,6	0,1
Терпинен-4-ол	1177	0,2	1,6	0,1	0,4	1,5	3,6	0,2
α-Терпинеол	1189	0,2	0,1	0,3	0,2	0,6	0,2	0,4
Лавандулил ацетат	1289	3,4	-	-	0,1	1,2	6,1	-
β-Кариофилен	1418	8,6	8,4	11,5	8,9	11,3	7,8	9,5
α-Хумулен	1454	1,1	1,0	1,5	1,1	1,3	0,8	1,0
Гермакрен Д	1480	2,4	1,2	4,0	3,0	3,2	2,5	1,9
α-Зингиберен	1495	1,3	1,4	2,0	1,7	1,7	1,3	1,9
δ-Кадинен	1524	0,4	0,4	0,7	0,5	0,7	0,3	0,4
Шпатуленол	1576	0,3	0,2	0,5	0,2	сл.	сл.	сл.
Кариофилен оксид	1581	1,6	1,3	1,9	1,7	1,9	1,2	1,3
Хамазулен	1725	59,0	29,8	44,3	59,4	25,6	3,7	25,6
Монотерпени		9,7	47,4	21,8	10,3	43,8	39,5	50,9
Монотерпеноиди		4,5	3,1	2,8	1,2	7,3	12,9	4,0
Сескитерпени		72,8	42,2	64,6	74,6	43,8	16,4	40,3

Сескитерпеноиди	1,9	1,5	2,4	1,9	1,9	1,2	1,3
Общо:	88,9	94,2	91,6	88,0	96,8	70,0	96,5
Съдържание на масло, % (мл/гр)	0,7	0,5	0,5	0,3	0,4	0,3	0,4

^a Ред на елуиране на колона HP-5MS; сл.=следи (<0,1%); * С неопределена стереохимия.



Фиг. 21. Дендрограма на етерични масла от *A.asplenifolia*

3.2.1.3. *A. collina*

Резултатът от ГХ и ГХ-МС анализа на 8 етерични масла от различни популации от *A. collina*, включващи компоненти над 0,1% са представени в Таблица 11. Идентифицирани са 75 компонента съставляващи от 69,0% до 95,6% от маслото. Основни компоненти (> 10% в поне едно от маслата) са β -пинен (17,6 и 20,2% в С5 и С6), 1,8-цинеол (21,3% в С7), α -туйон (16,1 в С2), камфор (17,8% в С7), борнеол (12,7, 15,5 и 13,0% съответно в С1, С2 и С3), лавандулил ацетат (11,1 и 10,2% в С1 и С4) гермакрен Д (10,1% в С5) и хамазулен, който присъства във всички проби без една (С2)

и достига 22,3% в С4. Тези съединения могат да се приемат като характерни за изследвания вид. Резултатите от проведения клъстерен анализ са представени на Фигура 22. Както се вижда от дендрограмата, изследваните масла могат да бъдат групирани в две основни групи А (С1, С3-6), и Б (С2, С7 и С8) в зависимост от количеството на хамазулен в тях.

Пробите включени в група А, се характеризират с високо съдържание на хамазулен (10,5-22,3%). Наблюдаваните качествени и количествени разлики между тези проби оформят две подгрупи. С1 и С4 се открояват с най-високо съдържание на хамазулен (20,8% и 22,3%), който е и основен компонент в тези етерични масла. Лавандулил ацетат е вторият характерен компонент (11,1% в С1 и 10,2% в С4). Този неправилен терпенов естер присъства макар и в ниски концентрации, в още 4 от изследваните масла. Наличието на последния в етерично масло от *A. collina* се съобщава за първи път още повече, че присъства в значително количество. Той е откриван в малки количества само в *A. millefolium* (Giorgi et al., 2005, Saeidnia et al., 2004) и *A. setacea* (Kusmenoglu et al., 1997). Двете проби се отличават помежду си по съдържанието на борнеол, който е 12,7% в С1 и едва 3,7% в С4. И в този случай, както много често, камфор съпътства присъствието на борнеол, но той е в много по-ниска концентрация и е едва 0,6% в С4. Други компоненти характеризиращи вида са β -кариофилен, който е в по-голямо количество в С1 (6,2%) и гермакрен Д, който е 7,7% в С4.

Проби С5 и С6 оформят втората подгрупа с умерено присъствие на хамазулен (около 14%) и основен компонент β -пинен (17,6 и 20,2%). α -Пинен, β -кариофилен, кариофилен оксид са общи за двете проби, регистрирани в съизмерими количества, докато 1,8-цинеол, камфор, борнеол са в пъти повече в С6 в сравнение с С5, а гермакрен Д е в по-голяма концентрация в С5. Изненадващо ниско за етерично масло от *A. collina* е съдържанието на камфор (0,6% и 4,6%) и борнеол (0,7% и 2,6%).

Проба С3 заема междинно положение в група А. Съдържанието на хамазулен е 10,5%, т.е. най-близко до това в подгрупата С5/С6. Много по-голямо, обаче е сходството на С3 с подгрупата С1/С4 по отношение на измереното количество на някои компоненти като α -пинен, β -пинен, борнеол, и гермакрен Д. С3 се отличава от пробите в група А по най-високо съдържание на камфор (7,7%), хризантемол (4,7%) и йомоги алкохол (2,0%). Последният е регистриран макар и в доста по-малко количество само в С8.

Пробите С2, С7 и С8, включени в група Б са бедни на хамазулен (0-2,6%). Други компоненти в приблизително еднакви концентрации в трите масла са само сабинен и терпинен-4-ол. Останалите варират в широки граници. Както се вижда от дендрограмата (Фиг. 21) С2, С7 и С8 се различават не само от тези в група А, но и помежду си. Маслото от проба С2 е единственото несъдържащо хамазулен, а основни компоненти са α -туйон (16,1%), борнеол (15,5%) и 1,8-цинеол (9,8%). Само в тази проба са регистрирани α -туйон (2,2%), *транс*-пиперитол (0,5%), *транс*-карвеол (0,3%), кумин алдехид (0,3%), *p*-цимен-7-ол (0,5%) и сескисабинен Б (0,2%). Единствено в проба С7 1,8-цинеол (21,3%) е базов компонент. С изключение на β -пинен (8,0%) и α -терпинеол (5,6%) всички останали вещества в маслото са в по-ниски концентрации.

Проба С8 е с най-високо съдържание на камфор (17,8%) от изследваните проби и сравнително високо съдържание на 1,8-цинеол (7,2%) и хризантемол (6,4%). В тази проба не се регистрира наличието на борнеол и β -кариофилен, което не е характерно за етерични масла от *A. collina*. От друга страна е установено наличие на *p*-мент-1,5-диен-8-ол (3,6%), *транс*-вербенол (2,5%), вербенол (0,7%), *транс*-сабинен хидрат ацетат (0,2%), хризантемол ацетат (3,4%) и сескицинеол (1,5%), които отсъстват в останалите проби.

Химичният състав на проба С2 е много близък до този съобщен за изследвана популация от Сърбия (Chalchat et al., 2000), в която също не е намерен хамазулен. Съществена разлика със сръбската проба се наблюдава във високото съдържание на хризантенол, който отсъства в проба С2 и не е характерен компонент в етеричните масла не само от *A. collina*, но и за представители на групата *Millefolium*.

Монотерпеноидите сабинен, β -пинен, 1,8-цинеол, камфор, борнеол, терпинен-4-ол и сескитерпеноидите гермакрен Д, β -кариофилен, кариофилен оксид и хамазулен са характерни за изследваните проби и се откриват в значителни концентрации, което е и в съгласие с литературните данни (Chalchat et al., 2000, Maffei et al., 1993, Hofmann et al., 1992) за този вид *Achillea*.

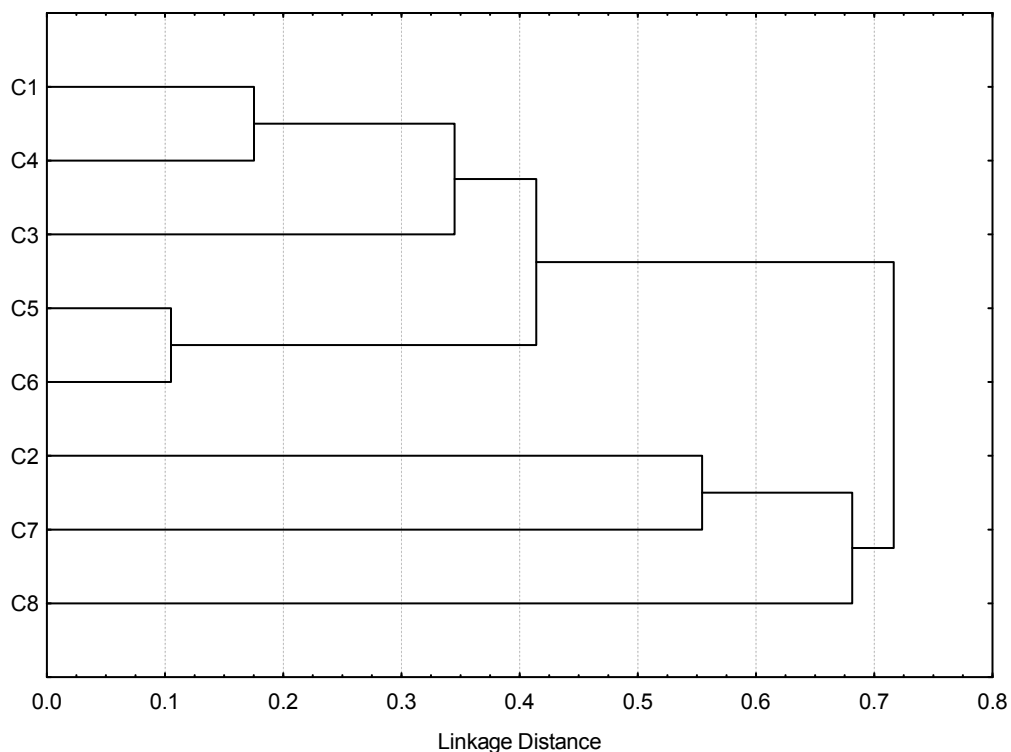
Таблица 11. Химичен състав на етерични масла от *A. collina* (%)

Компонент ^a	К.И.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Сантолина триен	908	-	0,2	0,4	-	0,1	-	-	0,8
Трициклен	926	0,1	0,1	-	-	сл.	-	-	сл.
α -Туйен	931	0,1	0,4	0,3	-	0,1	0,2	0,1	0,3
α -Пинен	939	1,7	0,6	1,2	сл.	4,8	6,5	2,3	2,6
Камфен	953	0,8	0,6	0,3	-	0,2	0,5	0,1	0,3
Сабинен	976	8,9	5,0	0,7	3,1	2,4	6,1	3,7	5,1
β -Пинен	980	5,8	1,8	3,9	4,3	17,6	20,2	8,0	2,1
Мирцен	991	0,2	0,3	0,1	сл.	4,1	0,2	0,1	сл.
1-Хептен-4-ол	995	-	-	0,1	сл.	сл.	-	-	-
Йомоги алкохол	998	-	-	2,0	-	-	-	-	0,3
α -Терпинен	1018	0,3	0,8	2,1	1,1	0,1	0,2	0,2	0,3
ρ -Цимен	1026	0,2	0,9	сл.	сл.	сл.	сл.	сл.	0,7
Лимонен	1031	сл.	сл.	0,4	0,4	0,7	0,6	0,3	0,6
1,8-Цинеол	1033	5,6	9,8	1,9	3,2	2,8	7,7	21,3	7,2
<i>цис</i> - β -Оцимен	1040	0,1	0,1	-	сл.	сл.	0,1	-	0,2
<i>транс</i> - β -Оцимен	1050	0,3	0,1	-	сл.	0,1	сл.	-	0,1
γ -Терпинен	1062	0,6	1,5	сл.	0,4	0,1	0,3	0,4	0,9
<i>цис</i> -Сабинен хидрат	1068	0,3	0,6	сл.	сл.	0,1	0,3	1,0	0,6
α -Терпинолен	1088	0,1	сл.	сл.	0,3	сл.	сл.	сл.	0,5
<i>транс</i> -Сабинен хидрат	1097	сл.	0,4	сл.	сл.	сл.	сл.	сл.	0,6
Линалол	1098	0,2	сл.	сл.	0,3	0,6	0,2	0,6	-
α -Туйон	1102	-	16,1	-	-	-	-	-	0,2
β -Туйон	1114	-	2,1	-	-	-	-	-	-
<i>цис</i> - ρ -Мент-2-ен-1-ол	1121	-	0,4	-	-	сл.	-	-	0,1
<i>транс</i> -Пинокарвеол	1139	0,1	-	0,4	-	-	-	-	-
<i>транс</i> -Сабинол	1140	-	1,2	-	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3
Камфор	1143	3,2	3,4	7,7	0,6	0,6	4,6	2,3	17,8

<i>транс</i> -Вербенол	1144	-	-	-	-	-	-	-	2,5
Хризантемол		сл.	-	4,7	-	-	-	-	6,4
Пинокарвон	1162	0,4	-	-	0,6	0,1	-	-	-
Борнеол	1165	12,7	15,5	13,0	3,7	0,7	2,6	3,1	-
<i>p</i> -Мент-1,5-диен-8-ол	1166	-	-	-	-	-	-	-	3,6
Терпинен-4-ол	1177	1,4	3,5	0,3	0,9	0,4	1,2	3,2	2,8
α -Терпинеол	1189	0,8	1,1	0,8	1,6	1,2	2,0	5,6	2,2
Миртенол	1194	0,1	0,8	0,5	0,5	0,2	0,2	-	-
Вербенон	1204	-	-	-	-	-	-	-	0,7
<i>транс</i> -Пиперитол	1205	-	0,5	-	-	-	-	-	-
<i>транс</i> -Карвеол	1217	сл.	0,3	-	-	-	-	-	-
<i>изо</i> -Борнил формат		-	0,2	сл.	сл.	0,1	-	-	-
<i>транс</i> -Хризантенил ацетат	1235	0,8	-	1,1	сл.	сл.	-	сл.	-
Кумин алдегид	1239	-	0,3	-	-	-	-	-	-
4-Туйен-2-ил ацетат	1253	0,1	0,3	-	-	-	-	-	-
<i>транс</i> -Сабинен гидрат ацетат	1253	-	-	-	-	-	-	-	0,2
<i>цис</i> -Хризантенил ацетат	1262	0,2	-	-	-	0,1	-	0,3	0,3
Хризантемол ацетат		-	-	-	-	-	-	-	3,4
Борнил ацетат	1285	0,6	0,3	-	0,8	0,2	-	0,4	-
<i>p</i> -Цимен-7-ол	1287	-	0,5	-	-	-	-	-	-
Лавандулил ацетат	1289	11,1	-	0,6	10,2	0,1	0,3	0,3	-
<i>p</i> -Мент-1,4-диен-7-ол	1332	-	0,3	сл.	сл.	0,1	0,1	-	0,1
<i>транс</i> -Карвил ацетат	1337	0,4	0,2	0,5	-	-	-	0,5	-
Нерил ацетат	1365	-	-	0,6	t	t	-	0,8	-
Терпинен-4-ол ацетат	1340	0,7	сл.	-	-	-	-	-	-

β-Бурбонен	1384	0,2	-	0,6	1,0	0,5	-	0,1	-
β-Кариофилен	1418	6,2	1,4	4,9	1,6	4,4	3,2	0,8	
Сескисабинен Б	1412	-	0,2	-	-	-	-	-	-
Аромадендрен	1438	0,2	-	-	-	-	-	-	-
α-Хумулен	1454	0,8	0,2	0,7	0,7	0,6	0,5	0,1	0,5
<i>allo</i> -Аромадендрен	1461	0,2	-	0,2	-	0,1	0,1	0,1	сл.
Гермакрен Д	1480	3,0	1,1	6,0	7,7	10,1	2,8	4,2	2,0
α-Зингиберен ⁺	1495	1,0	-	1,0	-	0,6	0,1	-	-
Бициклогермакрен									
α-Селинен	1494	0,1	сл.	-	-	0,6	0,2	0,7	-
γ-Кадинен	1513	0,2	-	-	-	-	-	-	-
Сескицинеол	1514	-	-	-	-	-	-	-	1,5
δ-Кадинен	1524	0,5	0,2	-	-	1,4	1,0	0,3	0,4
Гермакрен Д-4-ол	1574	0,2	-	-	-	-	-	-	-
Шпатуленол	1576	0,2	0,2	-	1,0	0,3	0,5	1,2	0,8
Кариофилен оксид	1581	2,0	5,9	3,3	2,5	3,3	2,0	2,7	2,1
Гуайол	1595	1,3	0,9	сл.	3,1	1,3	3,2	сл.	0,4
γ-Муролол	1641	0,7	1,2	0,1	0,1	-	сл.	сл.	0,1
Хамазулен	1725	20,8	-	10,5	22,3	13,8	14,2	2,6	1,8
Бизаболон*		0,1	-	сл.	2,6	0,4	0,1	1,5	0,6
Хексадеканова киселина		-	сл.	сл.	8,8	0,2	t	-	0,7
Монотерпени		19,2	12,4	11,4	9,6	30,3	34,9	15,2	14,8
Монотерпеноиди		38,7	57,5	32,1	22,5	7,5	19,3	39,5	49,0
Сескитерпени		33,2	3,1	23,9	33,3	32,1	22,1	8,9	4,7
Сескитерпеноиди		4,5	8,2	3,4	9,3	5,3	5,8	5,4	5,5
Други		-	0,3	0,1	8,8	0,2	-	-	0,7
Общо:		95,6	81,5	70,9	83,5	75,4	82,1	69,0	74,7
Съдържание на масло, % (мл/гр)		0,63	0,28	0,40	0,35	0,40	0,44	0,38	0,25

^a Ред на елуиране на колона HP-5MS; сл.=следи (<0,1%); * С неопределена стереохимия.



Фиг. 22. Дендрограма на етерични масла от *A. collina*

3.2.1.4. *A. distans*

Резултатите от ГХ и ГХ-МС анализа на 4 етерични масла от *A. distans*, събрана от две местообитания в Стара планина - Беклемето (DIS1 и DIS2) и връх Юмрука (DIS3 и DIS4), включващи компоненти над 0,1 % са представени в Таблица 12. Идентифицирани са 44 компонента, съставляващи от 75,5% до 93,5% от маслото. Както се вижда, етеричните масла са богати на монотерпеноиди (58,8-82,7%) и сравнително бедни на сескитерпеноиди (6,2-13,5%). Кислород-съдържащите монотерпени преобладават и достигат до 60,5%, като основни сред тях са 1,8-цинеол (4,5- 22,1%) и камфор (1,9-6,8%). Сабинен (3,8-8,2%) и β -пинен (3,9-7,2%) пък са доминиращи сред монотерпеновите въглеводороди. Представените в Таблица 10 данни демонстрират сходство в качествения състав на пробите от едно и също местообитание, т.е. между DIS1 и DIS2 и съответно DIS3 и DIS4, но количествените разлики на характерни компоненти не позволяват групирането им по местообитание. Наблюдаваните зависимости между четирите изследвани проби е

отразено в дендрограмата на Фиг. 23. Както се вижда, пробите DIS3 и DIS4 са най-близко разположени по линията на сходство. В тези проби основният компонент е 1,8-цинеол (17,3 и 22,1%) следван от борнил ацетат (15,2% и 18,5%). Друга отличителна черта е по-високият процент на терпинен-4-ол (8,5% и 4,3%) и миртенол (8,5% и 5,1%), както и отсъствието на β -туйон, *цис*-*p*-мент-2-ен-1-ол, *p*-цимен-7-ол, *цис*- и *транс*-хризантенил ацетат и хамазулен. Високото съдържание на 1,8-цинеол (16,8%) доближава DIS2 до DIS3 и DIS4, но запазва относителна самостоятелност поради съществени различия в качествения състав, дискутиран по-горе. DIS1 е с най-голямо разстояние по линията на сходство от останалите проби (Фиг. 23). В нея не присъстват ясно изразени основни компоненти. Само α -туйон, камфор и неролидол са регистрирани в концентрации около 7%. Между пробите от Беклемето (DIS1 и DIS2) се наблюдава сходство в качествения състав, но някои количествени разлики не позволяват тяхното групиране като например 1,8-цинеол (4,5% в DIS1 спрямо 16,8% в DIS2), α -туйон (7,8 и 0,6%), неролидол (7,1 и 2,8%), β -ейдесмол (3,4 и 1,5%), β -туйон (4,7% и 9,8%) и др.

Както и при другите изследвани видове се наблюдава вътревидова изменчивост по отношение на етеричномасления състав на *A. distans*, но ограниченият брой изследвани проби не позволява извеждане на представителни хемотаксономични зависимости.

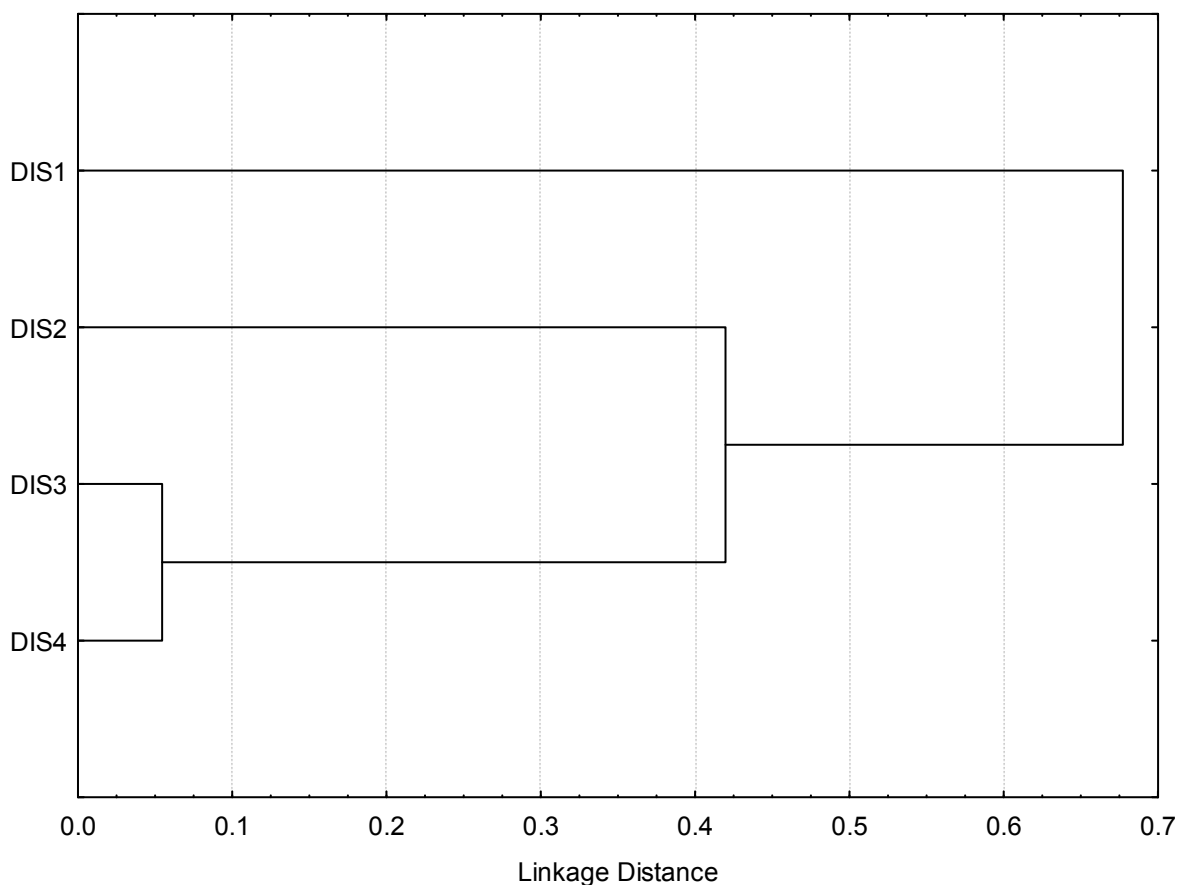
Всички идентифицирани компоненти в изследваните от нас етерични масла са открити и в етерично масло от *A. distans* от района на северна Италия (Maffei et al., 1993), но се наблюдават и известни различия. Така например, липсва бизаболол оксид в българските проби, а в италианската неговото съдържание е 30,2%. В четирите изследвани от нас проби се установява, макар и в неголеми количества, лавандулил ацетат (0,4 - 1,4%), докато в италианската този компонент напълно отсъства.

Таблица 12. Химичен състав на етерични масла от *A. distans* (%)

Компонент ^a	KI	DIS 1	DIS 2	DIS 3	DIS 4
Сабина триен	908	сл.	0,1	0,1	сл.
Трициклен	926	сл.	0,1	0,1	0,1
α -Туйен	931	0,1	0,4	0,1	-
α -Пинен	939	1,1	5,1	1,6	2,6
Камфен	953	0,8	1,9	1,9	2,5
Сабинен	976	5,5	8,2	3,8	7,8
β -Пинен	980	3,9	6,5	5,9	7,2
Мирцен	991	0,1	0,4	0,3	0,3
α -Феландрен	1005	0,3	0,1	0,3	0,4
α -Терпинен	1018	0,5	0,4	0,5	0,2
p-Цимен	1026	0,7	0,3	0,6	0,2
1,8-Цинеол	1033	4,5	16,8	17,3	22,1
γ -Терпинен	1062	0,5	1,0	0,7	0,5
Артемизия кетон	1062	сл.	0,3	-	-
<i>цис</i> -Сабинен хидрат	1068	0,4	0,3	0,7	1,0
Терпинолен	1088	0,1	0,2	0,1	0,1
Линалол	1098	3,3	2,1	0,7	0,3
α -Туйон	1102	7,8	0,6	0,1	0,3
β -Туйон	1114	4,7	9,8	-	-
<i>цис</i> -p-мент-2-ен-1-ол	1121	2,3	1,2	-	-
Хризантенон	1123	0,6	0,5	-	-
Терпинен-1-ол	1134	1,8	0,9	0,5	0,4
Камфор	1143	6,8	5,8	2,4	1,9
Борнеол	1165	4,0	7,5	0,9	0,9
Терпинен-4-ол	1177	1,1	1,6	8,5	4,3
α -Терпинеол	1189	2,7	3,0	4,3	2,3
Миртенол	1194	1,0	0,7	8,5	5,1
<i>цис</i> -Пиперитол	1194	1,4	0,7	0,7	0,8
<i>транс</i> -Хризантенил ацетат	1235	0,3	0,6	-	-

<i>цис</i> -Хризантенил ацетат	1262	сл.	2,3	-	-
Борнил ацетат	1285	0,8	1,6	15,2	18,5
p-Цимен-7-ол	1287	1,1	0,3	-	-
Лавандулил ацетат	1289	0,4	1,4	0,6	0,6
β -Кариофилен	1418	1,9	1,5	1,7	3,2
Гермакрен Д	1480	0,7	1,6	1,1	3,7
НерOLIDOL *		7,1	2,8	0,6	0,4
Шпатуленол	1576	-	0,4	0,7	0,3
Кариофилен оксид	1581	3,5	0,8	1,8	0,8
Виридифлорол	1590	сл.	0,2	0,3	сл.
γ -Ейдесмол	1630	сл.	1,0	2,7	1,1
ϵ - α -Муrolol	1641	-	0,5	0,4	-
β -Ейдесмол	1649	3,4	1,5	0,3	0,6
α -Кадинол	1653	-	0,3	0,1	-
Хамазулен	1725	0,3	0,5	-	-
Монотерпени		13,6	24,7	16,0	21,9
Монотерпеноиди		45,0	58,0	60,4	58,5
Сескитерпени		2,9	3,6	2,8	6,9
Сескитерпеноиди		14,0	7,5	6,9	3,2
Общо:		75,5	93,8	86,1	90,5
Съдържание на масло, % (мл/гр)		0,14	0,18	0,20	0,23

^a Ред на елуиране на колона HP-5MS; сл.=следи (<0,1%); * С неопределена стереохимия.



Фиг. 23. Дендрограма на етерични масла от *A. distans*

3.2.2. Влияние на методите за изолиране на етерични масла върху количеството и качеството на маслото

Начинът на получаване е съществен фактор, влияещ върху състава на някои етерични масла. Проведено е сравнително изследване на съдържанието и на химичния състав на етерични масла, изолирани чрез водна дестилация (ВД) по метода на Клевенджер, парна дестилация (ПД) и микродестилация с водна пара и едновременна непрекъсната екстракция на дестилата с диетилов етер (МЕ) по метода на Ликенс-Никерсон. Използван е култивиран растителен материал от *A. collina* в опитното поле на ИБЕИ-БАН, с цел избягване на вариации в химичния състав в резултат от вътревидова изменчивост или екологични условия при развитие на растенията. Получените резултати са представени в Табл. 13.

Съдържанието на етерично масло в зависимост от метода за дестилиране варира в тесни граници. Както може да се очаква, по метода на Ликенс-Никерсон е изолирано по-голямо количество масло (0,67%) в сравнение с другите два метода (0,58 и 0,50%).

Този резултат може да се обясни с това, че първото е екстракционно масло, а другите две са декантирани масла, т.е. при тях в дестилационните води остава разтворено или фино емулгирано масло, което не се разделя.

От получените резултати се вижда, че няма разлика в качествения състав (49 компонента) на получените етерични масла независимо от метода за изолирането им. Наблюдаваните разлики в количествения състав от практическа гледна точка може да се каже, че са незначителни. Така например съдържанието на хамазулен, важен компонент на етеричните масла от бял равнец е от един и същ порядък при двата вида дестилация (съответно 23,4 и 22,9% при водна и 21,1% при парна дестилация). Съдържанието на другият основен компонент, лавандулил ацетат също варира в тесни граници. Съдържанието му в маслото изолирано, чрез парна дестилация е малко по-високо (13,3%) за разлика от другите два метода (11,0 и 12,2%). При останалите основни компоненти на маслото също не се наблюдават големи вариации в съдържанието им – борнеол (13,1%, 12,2% и 14,1%), сабинен (9,2%, 8,9% и 8,1%), 1,8-цинеол (5,2%, 5,6% и 6,7%) и β -пинен (6,2%, 5,9% и 5,5%).

Може да се направи заключение, че в конкретния случай (етерично масло от *Achillea*) избора на метод за изолиране на етеричното масло не е от решаващо значение относно качествения и количествен състав на получената проба. Това дава възможност за сравняване на литературни данни от различни източници, провеждане на сравнителни изследвания на ниво растение, както и интерполация на получените резултати от отделните методи с висока степен на достоверност. Тези наши заключения са в съгласие с получените резултати от Tuberoso & Kowalczyk (2009), които провеждат сравнително изследване на водна дестилация, непрекъснатата дестилация и екстракция и микровълнова екстракция на етерично масло от *A. millefolium* L.

Таблица. 13. Химичен състав на етерични масла от *A. collina* получени по три различни метода за изолиране - водна дестилация (ВД), парна дестилация (ПД) и микродестилация екстракция (МЕ).

Компонент ^a	К.І.	ВД	ПД	МЕ
Трициклен	926	0,1±0,005	сл.	0,1±0,005
α-Туйен	931	сл.	сл.	0,1±0,005
α-Пинен	939	1,9±0,09	1,6±0,08	1,2±0,06
Камфен	953	1,0±0,05	1,2±0,06	0,5±0,02
Сабинен	976	9,2±0,46	8,9±0,44	8,1±0,40
β-Пинен	980	6,2±0,31	5,9±0,29	5,5±0,27
Мирцен	991	0,1±0,005	0,1±0,005	сл.
α-Терпинен	1018	0,5±0,02	0,7±0,03	0,3±0,01
p-Цимен	1026	0,1±0,005	0,1±0,005	сл.
Лимонен	1031	сл.	0,1±0,005	сл.
1,8-Цинеол	1033	5,2±0,26	5,6±0,28	6,7±0,335
<i>цис</i> -β-Оцимен	1040	0,2±0,01	0,3±0,01	0,1±0,005
<i>транс</i> -β-Оцимен	1050	0,4±0,02	0,6±0,03	0,3±0,01
γ-Терпинен	1062	0,8±0,04	0,9±0,04	0,5±0,02
<i>цис</i> -Сабинен хидрат	1068	0,4±0,02	0,3±0,01	0,4±0,02
α-Терпинолен	1088	0,1±0,005	0,3±0,01	сл.
Линалол	1098	0,2±0,01	0,1±0,005	0,6±0,03
<i>транс</i> -Пинокарвеол	1139	0,2±0,01	0,1±0,005	0,4±0,02
Камфор	1143	3,0±0,15	2,6±0,13	3,3±0,16
Хризантемол		сл.	сл.	0,2±0,01
Пинокарвон	1162	0,2±0,01	0,1±0,005	0,4±0,02
Борнеол	1165	13,1±0,65	12,2±0,61	14,1±0,70
Терпинен-4-ол	1177	1,1±0,055	1,2±0,06	1,4±0,07
α-Терпинеол	1189	0,9±0,045	0,6±0,03	1,2±0,06
Миртенол	1194	0,2±0,01	0,1±0,005	0,3±0,01
<i>транс</i> -Хризантенил ацетат	1235	0,6±0,03	0,8±0,04	1,1±0,055

4-Туйен-2-ил ацетат	1253	сл.	0,1±0,005	0,1±0,005
<i>цис</i> -Хризантенил ацетат	1262	0,1±0,005	0,2±0,01	0,4±0,02
Борнил ацетат	1285	0,5±0,02	0,5±0,02	0,7±0,03
Лавандулил ацетат	1289	11,0±0,55	13,3±0,65	12,2±0,62
<i>транс</i> -Карвил ацетат	1337	0,3±0,01	0,5±0,02	0,3±0,01
Терпинен-4-ол ацетат	1340	0,5±0,02	0,8±0,04	0,3±0,01
β-Бурбонен	1384	0,1±0,005	0,2±0,01	0,2±0,01
β-Кариофилен	1418	7,1±0,35	8,2±0,41	5,1±0,25
Аромадендрен	1438	0,1±0,005	0,2±0,01	сл.
α-Хумулен	1454	0,7±0,03	0,9±0,04	0,5±0,025
<i>allo</i> -Аромадендрен	1461	0,3±0,01	0,1±0,005	0,1±0,005
Гермакрен Д	1480	4,0±0,02	5,3±0,26	2,9±0,14
α-Зингиберен+	1495	0,9±0,04	0,6±0,03	1,2±0,06
Бициклогермакрен				
α-Селинен	1494	0,1±0,005	сл.	0,1±0,005
γ-Кадинен	1513	0,1±0,005	сл.	0,2±0,010
δ-Кадинен	1524	0,2±0,01	0,5±0,040	сл.
Гермакрен Д-4-ол	1574	0,1±0,005	сл.	сл.
Шпатуленол	1576	0,3±0,01	0,2±0,010	0,5±0,025
Кариофилен оксид	1581	1,2±0,06	1,4±0,07	2,0±0,10
Гуайол	1595	1,0±0,05	0,8±0,04	1,3±0,06
γ-Муролол	1641	0,5±0,02	0,7±0,03	1,2±0,06
Хамазулен	1725	23,4±1,1	21,1±1,1	22,9±1,1
Бизаболон*		0,1±0,005	сл.	сл.
Съдържание на масло, % (мл/гр)		0,58	0,50	0,67

ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ

1. Получени и изследвани са етеричните масла от 7 сорта лавандула („Дружба“, „Хемус“, „Севтополис“, „Юбилейна“, „Хебър“, „Рая“ и „Карлово“), отгледани при еднакви почвени, агротехнически и климатични условия. Установено е, че всички те се характеризират с високо съдържание на етерично масло с изключение на сорт „Карлово“.
2. Изследван е детайлно химичният състав на етеричните масла от седемте най-разпространени български сорта лавандула. Идентифицирани са 46 съединения, от които 12 се съобщават за първи път като компоненти на българско лавандулово масло.
3. Фазата на цъфтеж на лавандуловите съцветия, след 30 – 40 % степен на цъфтеж не оказва съществено влияние на етеричномасленото съдържание при изследваните сортове лавандула, докато количествата на индивидуалните компоненти варира. Установено е, че съдържанието на терпинен-4-ол, е високо в етеричното масло от сорт „Юбилейна“.
4. Присъствието само на (R)-(-)-линалил ацетат и отсъствието на (S)-(+)-изомера в изследваните проби потвърждава, че високата енантиомерна чистота на линалил ацетата е обективен критерий за автентичност на лавандуловото масло.
5. Определен е химичният състав на етерични масла от четири вида бялоцъфтяща *Achillea* (*A. crithmifolia*, *A. asplenifolia*, *A. collina* и *A. distans*). Идентифицирани са общо 91 компонента в съдържание над 0,1%.
6. Установено е, че начинът на получаване на етеричното масло от *A. collina* не влияе върху количествения и качествения му състав.
7. Установена е значителна вътревидова изменчивост по отношение на химичния състав на етеричните масла за всеки изследван вид. Въпреки това, на база на качествени и количествени разлики в етеричномасления профил, във всички видове се наблюдават смесени многокомпонентни хемотипове.
 - *A. distans* – 1,8-цинеол / борнил ацетат и цинеол/камфор/борнеол

- *A. collina* – хамазулен/лавандулил ацетат; хамазулен/ β -пинен; 1,8-цинеол/камфор/бедни на хамазулен; несъдържащи хамазулен/ α -туйон/борнеол
- *A. asplenifolia* – чист хамазуленов хемотип (над 50% хамазулен); хамазулен/сабинен и или β -пинен.
- *A. crithmifolia* - артемизиа алкохол/ йомоги алкохол; 1,8-цинеол/камфор

ПРИНОСИ

1. Определено е количественото съдържание на етерично масло в българските сортове лавандула „Дружба“, „Хемус“, „Севтополис“, „Юбилейна“, „Хебър“, „Рая“ и „Карлово“. Ниското съдържание на масло в сорт „Карлово“ го прави неподходящ за промишлено производство на лавандулово масло.
2. Резултатите от детайлното изследване на етерични масла от 7-те сорта лавандула показват, че няма съществена разлика в качествения им състав. Установеното вариране в количествата на някои компоненти ще позволи предварително планиране на сортовия състав на новосъздавани насаждения.
3. Поради установеното високо съдържание на терпинен-4-ол в масло от сорт „Юбилейна“, последния не се препоръчва за масово отглеждане, тъй-като този компонент влошава ароматичните качества на маслото.
4. Изследването на количеството етерично масло в зависимост от фазата на цъфтеж показва, че стартирането на жътвата може да започне при 30-40% степен на цъфтеж, но по отношение на качествения състав на етеричното масло най-балансиран за сортове „Рая“ и „Дружба“ е при 50 – 75% степен на цъфтеж и 70 – 90 % за останалите сортове.
5. Резултатите показват, че с изключение на единични проби представителите на група *Millefolium* продуцират хамазулен, а *A. crithmifolia*, която е бялоцъфтяща, но не е в тази група не съдържа и следи от това вещество.
6. На базата на качествени и количествени разлики е установена значителна вътревидова изменчивост за всички изследвани видове. Най-изразена е при *A. collina*, вероятно поради най-широкото ѝ разпространение и склонност към хибридизация с други видове *Achillea*.
7. За пръв път е установено в представител на група *Millefolium* (*A. asplenifolia*) със съдържание на хамазулен в етеричното масло над 59%.
8. Установено е, че количеството на хамазулен в етеричното масло се запазва независимо от начина на дестилация (парна и водна).

4. ЛИТЕРАТУРА

Анчев, М. 1989. Род ЛАВАНДУЛА – LAVANDULA L. - Велчев, В., и Кузманов, Б. А. (ред.). Флора на НРБ, том **IX**, 257 – 258, Изд. БАН, София.

БДС ISO 2004, Лавандулово масло (*Lavandula angustifolia* Mill.), БДС ISO 3515, Български институт за стандартизация, София.

БДС ISO 2006, Етерични масла. Анализ чрез газова хроматография с хирална капиллярна колона. Общ метод, БДС ISO 22972, Български институт за стандартизация, София.

Бояджиева, Б. 1975. Проучвания върху биологическите и стопански особености на някои местни, интродуцирани и селектирани сортове лавандула, с оглед използването им за нуждите на производството и селекцията. Дисертация, д-р, ВСИ „Васил Коларов“ – Пловдив.

Георгиев, Е. 1980. Технология на естествените и синтетични ароматични продукти. Ръководство за лабораторни упражнения. ВИХВП, Пловдив.

Георгиев, Е., Стоянова, А. 2006. Справочник на специалиста от ароматичната промишленост. – Изд. БНАЕМПК, Пловдив.

Георгиев, Е., Балинова-Цветкова, А. и Христова, П. 2007. Влияние на някои технологични фактори върху добива и качеството на лавандуловото масло. – Научни трудове на УХТ, **5(1)**: 275-280

Димитров, Д., Димитров, З., Стоянова, М. и Стоянов, Е. 1981. Оптимизиране на сортовата структура на лавандуловите насаждения с цел подобряване на качеството на българско лавандулово масло. – Растениевъдни науки, **18**: 70-74.

Димитров, Д. 1986. Възможности за получаване на оптимални смеси от ароматични вещества – парфюмни композиции и типизирани партиди от лавандулово масло. – Дисертация, д-р, София, Фармацевтичен факултет.

Илиева, С., Димитрова, С., Христова, А. и Золотчович, Г. 1955. Принос към проучване на лавандулата у нас. – Списание на научно-изследователските институти при М-во на земеделието, **2**: 31-46.

Иринчев, И. и Георгиев, К. 1959. Лавандула и производство на лавандулово масло в България. Изд. на ЦКС, София.

Кузманов, Б. и Анчев, М. 2012. Род РАВНЕЦ – ACHILLEA L. – Йорданов, Д., Пеев, Д., Кожухаров, Сл и Анчев, М. (ред.). Флора на Република България, том **XI**, 326 – 361, Академично издателство „Проф. Марин Дринов“, София.

Стайков, В., Чингова, Б. 1969. Изучение динамики цветение лаванды. – БРЕМП, **5**: 11-23.

Стайков, В., Чингова-Бояджиева, Б., Иринчев, И. и Божков, Г. 1973. Лаванда – производство лавандовых продуктов в Болгарии. СО „Фармахим“, София.

Стоянова, А., Балинова-Цветкова, А. и Георгиев, Е. 2009. Лавандула. Получаване на етеричномаслени продукти в България. Изд. Агенция 7Д, Пловдив.

Ткачѐв, А.В. 2008. Исследование летучих веществ растений. Издательско-полиграфическое предприятие „Офсет“, Новосибирск.

Янкулов, Й. 2000. Основни ароматни растения – 19 съвременни технологии за култивиране. Изд. Еньовче, София.

- Aboutabl, E., Soliman, F., El-Zalani, S., Brunke, E. & El-Kersh, T. 1986. Essential oil of *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. – J. Pharm. Sci., **27**: 37-41.
- Adam, K., Sivropoulou A., Kokkini, S., Lanaras, T. & Arsenakis, M. 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticose* essential oils against human pathogenic fungi. – J. Agr. Food Chem. **46(5)**: 1739-1745.
- Adams RP. 1995. Identification of essential oils components by gas chromatography and mass spectroscopy. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Bader, A., Flamini, G., Cioni, P. & Morelli, I. 2003. Essential oil composition of *Achillea santolina* L. and *Achillea biebersteinii* Afan. collected in Jordan. – Flavour Fragr. J., **18**: 36-38.
- Baser, K.H.C., Demirci, B., Demirci, F., Kocak, S., Akinci, C., Malyner, H. & Guleryu, G. 2002. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*.
- Biste, C. 1978. Zytotaxonomische untersuchungen des formenkreises *Achillea millefolium* (Asteraceae) in der DDR. – Feddes Repertorium, **88**: 533-613.
- Boelens, M. & Sindreu, R. 1988. Essential oils from Seville bitter orange (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L.). – In: Lawrence, B., Mookherjee, B. & Willis, B. Developments in Food Science 18. Flavors and Fragrances: A World Perspective. Proseedings of the 10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavors, Washington, DC, USA, 16-20 November 1986. Elsevier Science Publishers, Amsterdam-Oxford-New York-Tokio, Nederland.
- Boskovic, Z., Radulovic, N. & Stojanovic, G. 2005. Essential oil composition of four *Achillea* species from the Balkans and its chemotaxonomic significance. - Chem. Nat. Comp, **41(6)**: 674-678.
- Buchbauer, G. 2002. Lavender oil and its therapeutic properties. - In: Lis-Balchin, M. Lavender. The Genus Lavandula.
- Bugge, G. 1991. Untersuchungen der sippen des *Achillea millefolium* komplexes auf azulengehalt und ploidiegrad. – Angew. Botanik, **65**: 331-339.

- Chalchat, J., Gorunovic, M. & Petrovic, S. 1999. Aromatic plants of Yugoslavia. I. Chemical composition of oils of *Achillea millefolium* L. ssp. *pannonica* (Scheele) Hayak, *A. crithmifolia* W. et K., *A. serbica* Nym. and *A. tanacetifolia* All. – J. Essent. Oil Res., **11(3)**: 306-310.
- Chalchat, J., Gorunovic, M., Petrovic, S. & Zlatkovic, V. 2000. Aromatic plants of Yugoslavia. II. Chemical composition of essential oils of three wild *Achillea* Species: *A. clavенаe* L., *A. collina* Becker and *A. lingulata* W. et K. – J. Essent. Oil Res., **12(1)**: 7-10.
- Charles, D.J. 2013. Lavender. In: Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. Springer Science+Business Media New York.
- Clevenger, J. 1928. Apparatus for the determination of volatile oil. – Journal of the American Pharmaceutical Association, **17(4)**: 345-349.
- Dabrovska, J. 1977. Observations of the fruit size of nine taxons of *Achillea* L. representing natural di-, tetra-, hexa- and octaploids. – Herba Pol., **28(23)**: 55-56.
- Danihelka, J. & Rotreklová O. 2001. Chromosome numbers within the *Achillea millefolium* and *Achillea distans* groups in the Czech republic and Slovakia. – Folia Geobotanica, **36**: 163-191.
- Degenhardt, J., Köllner, T. & Gershenzon, J. 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. – Phytochemistry, **70**: 1621-1637.
- Dewick, P. 2002. The biosynthesis of C₁₅-C₂₅ terpenoid compounds. – Nat. Prod. Rep., **19**: 181-222.
- Ehrendorfer, F. 1998. Die systematik der *Millefolium* gruppe. – Drogenreport, **11**: 30-44.
- Ehrendorfer, F. 1963. Probleme, methoden und ergebnisse der experimetellen systematik. – Planta Med., **3**: 234-251.
- El-Shazly, A., Hafez, S. & Wink, M. 2004. Comparative study of the essential oils and extracts of *Achillea fragrantissima* (Frossk.) Sch. Bip. and *Achillea santolina* L. (Asteraceae) from Egypt. – Pharmazie, **59**: 226-230.
- Feizbakhsh, A., Tehrani, M., Rustaiyan, A. & Masoudi, S. 2003. Composition of the essential oil *Achillea albicaulis* C.A. Mey. – J. Essent. Oil Res., **15(1)**: 21-22.

Giorgi, A., Bononi, M., Tateo, F. & Cocucci, M. 2005. Yarrow (*Achillea millefolium* L.) growth at different altitudes in central Italian alps: Biomass yield, oil content and quality. – Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, **11(3)**: 47-58.

Greuter, W. 2006+: Compositae (pro parte majore). – In: Greuter, W. & Raab-Straube, E. von (ed.): Compositae. Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. <http://ww2.bgbm.org/euroPlusMed/PTaxonDetail.asp?NameId=7001079&PTRefFk=7000000>

Guinea, E. 1972. 38 *Lavandula* L. – In: Tutin T. G. & al. (Eds). Flora Europea, **3**: 187-188. Univ. Press, Cambridge.

Gurevitch, J. 1988. Variation in leaf dissection and leaf energy budgets among populations of *Achillea* from altitudinal gradient. – Amer. J. Bot., **75(9)**: 1298-1306.

Héthelyi, É., Dános, B. & Tétényl, P. 1989. Phytochemical studies on the essential oils of species belonging to the *Achillea* genus by gas chromatography/mass spectrometry. – Biomed. Environm. Mass Spectr., **18**: 629-636.

Hofmann, L., Fritz, D., Nitz, S. & Drawert, F. 1992. Essential oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium* “Complex”. Phytochemistry, **32(2)**: 537-542.

Hofmann, L. & Fritz, D. 1993. Quality of essential oil of different types of the *Achillea millefolium* “Complex”. – Acta Hort., **330**: 153-156.

ISO 2002, Oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.), ISO 3515, 3rd edition, International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 2004, Essential oils -- Analysis by gas chromatography on chiral capillary columns -- General method, ISO 22972, International Organization for Standardization, Geneva.

Joulain, D. & König, W. 1998. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E.B.-Verlag, Hamburg.

Judzentiene, A. & Mockute, D. 2010. Essential oil composition of two yarrow taxonomic forms. – Cent. Eur. J. Biol., **5(3)**: 346-352.

- Kalinkina, G., Dembisky, A., & Berezovskaya, T. 2000. Chemical composition of essential oils of *Achillea* species from Siberia. – *Khimiya Rastitelnogo Syrja*, **3**: 13-18.
- Kalinkina, G & Berezovskaya, T. 1974. Study of the essential oil of *Achillea asiatica*. – *Chem. Nat. Comp.*, **10(5)**: 693.
- Karamenderes, C., Karabay, N. & Zeybek, U. 2002. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of some *Achillea* L. species in Turkey. – *Acta Pharmaceutica Turcica*, **44**: 221-225.
- Kastner, U., Saukel, J., Zitterl-Eglseer, K., Länger, R., Reznicek, G., Jurenich, J. & Kubelka, W. 1992. Atherisches Öl – ein zusätzliches Merkmal für die Charakterisierung der mitteleuropäischen Taxa der *Achillea millefolium*-Gruppe. – *Sci. Pharm.*, **60**: 87-99.
- Kindlovits, S., Radácsi, P., Sárosi, Sz., Inotai, K., Nagy, E. & Németh, É. 2014. Effect of weather conditions on the morphology, production and chemical composition of two cultivated medicinal and aromatic species. – *Europ. J. Hort. Sci.*, **79(2)**: 76-83
- Kokkalou, E., Kokkini, S. & Handlidou, E. 1992. Volatile constituents of *Achillea millefolium* in relation to their infraspecific variation. – *Biochem Syst. Ecol.*, **20(7)**: 665-670.
- Kowalczyk, A., Dabrowska, J. & Nosal, A. 1998. Comparative analysis of the composition of volatile oil of yellow-flowered yarrow *Achillea ageratum* L. and *Achillea compacta* Willd. – *Herba Pol.*, **44(2)**: 114-120.
- Kowalczyk, A., Dabrowska, J. & Cisowski, W. 2003. Comparative analysis of the composition of the volatile oils of two forms of *Achillea crithmifolia* W. et. K. – diploid and tetraploid. – *Z. Naturforsch.*, **58c**: 146-147.
- Kubeczka, K., H. 2010. History and sources of essential oil research. In: Baser, K.H.C. & Buchbauer, G. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York.
- Kusmenoglu, S., Baser, K.H.C. & Ozek T. 1997. Analysis of *Achillea setacea* Waldst. & Kitt. essential oil. 27th International Symposium on essential oils, 8-11. 09. 1996. Vienna, Austria, 201-203 (Eds. Franz Ch., A. Mathe G. & Buchbauer G.), Carol Stream, Illinois, USA, Allured Publishing Corporation.

- Lawrence, B. 1993. Progress in Essential Oils: Lavender oil. – Perf. & Flavor., **18(1)**: 58-61.
- Lawrence, B. 1996. Progress in Essential Oils: Lavender oil. – Perf. & Flavor., **21(3)**: 66-67.
- Lawrence, B. 2000. Progress in Essential Oils: Lavender oil. – Perf. & Flavor., **25(4)**: 66-69.
- Lawrence, B. 2004. Progress in Essential Oils: Lavender oil. – Perf. & Flavor., **29(3)**: 70-84.
- Lis-Balchin, M. 2002. Lavender: The genus *Lavandula*. Taylor and Francis Inc., New York, NY.
- Maffei, M., Chialva, F. & Codignola, A. 1989. Essential oils and chromosome numbers from Italian *Achillea* species. – J. Ess. Oil Res., **2(2)**: 57-64.
- Maffei, M., Germano, F., Doglia, G. & Ghialva, F. 1993. Essential oils, chromosome numbers and uaryotypes from Italian *Achillea* species. Part II – J. Essent. Oil Res., **5(1)**: 61-70.
- Maffei, M., Mucciarelli, M. & Scannerini, S. 1994. Essential oils from *Achillea* species of different geographic origin. – Biochemical Systematics and Ecology, **22(7)**: 679-687.
- Magiatis, P., Skaltsounis, A. Chinou, I. & Haroutounian, S. 2002. Chemical composition and *in-vitro* antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species. – Z. Naturforsch., **57c**: 287-290.
- Mastelić, J., Miloš, M. & Kuštrak, D. 2000. Free and glycosidically bound volatiles of *Mentha citrata* Ehrh. – Croatica Chemica Acta, **73(3)**: 781-789.
- Milhou, G., Valentin, A., Benoid, F., Mallie, M., Baslide, J-M., Pellissier, V. & Bessiere, J-M. 1997. In vitro antimalarial activity of eight essential oils. J. Essent. Oil Res., **9(3)**: 329-333.
- Mockutė, D. & Judžentienė, A. 2002. Chemotypes of the essential oils of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium* growing wild in Eastern Lithuania. – Chemija, **13(3)**: 168-173.
- Mondello, L., R. Shellie, A. Casilli, P. Marriott & Dugo, G. 2004. Ultra-fast essential oil characterization by capillary GC on a 50 µm ID column. J. Sep. Sci., **27**: 699–702.
- Motl, O., Ochir, G. & Kubeczka, K. –H. 1990. Composition of *Achillea asiatica* Serg. Essential oil. – Flavour and Fragrance Journal, **5(3)**: 153-155.

- Muselli, A., Desjobert, J.-M., Bernardini, A.-F. & Costa, J. 2007. Santolina alcohol as component of the essential oil of *Achillea ageratum* L. from Corsica Island. – J. Essent. Oil Res., **19(4)**: 319-322.
- Naef, R. & Morris, A. 1992. Lavender – lavandin – a comparison. Rivista Italiana EPPOS, (Numero speciale), 364-377.
- Németh, É., Bernáth, J. & Héthelyi, É. 2000. Chemotypes and stability in *Achillea crithmifolia* W. et K. populations. – J. Essent. Oil Res., **12(1)**: 53-58.
- Németh, É. 2005. Essential oil composition of species in the genus *Achillea*. – J. Essent. Oil Res., **17(5)**: 501-512.
- Nikolov, N., Tsoutsoulova, A., Apostolova, A. & Ivanov, I. 1977. VII International Congress of Essential Oils, October 7-11, 1977, Kyoto, Japan, 155-159.
- Ognyanov, I. 1984. Bulgarian lavender and Bulgarian lavender oil. – Perf. and Flav., **8(6)**: 29-41.
- Orth, M., Juchelka, D., Mosandl, A. & Czygan, F. 2000. Enantiomere monoterpene im atherischen oil von *Achillea millefolium* s. I. – eine zusatzliche taxonomische Bestimmungshilfe. - Pharmazie, **55(6)**: 456-459.
- Oswiecimska, M. 1974. Korrelation zwischen chromosomenzahl und prokamazulenen in *Achillea* von Osteuropa. – Planta Med., **25**: 389-394.
- Ozen, H., Toker, Z., Clery, R. & Owen, N. 2003. Composition of the essential oil of *Achillea pseudoaleppica* Hub. -Mor. – J. Essent. Oil Res., **15(2)**:
- Palić, R., Stojanović, G., Nasković, T. & Renelović, N. 2003. Composition and antibacterial activity of *Achillea crithmifolia* and *Achillea nobilis* essential oils. – J. Essent. Oil Res., **15(6)**: 434-437.
- Ph. eur. 07/2010:1338. Lavender oil. European Pharmacopoeia 8.0, Strassbourg, Council of Europe, 2014, 1291-1292.
- Poulter, C., Marsh, L., Hughes, J., Argyl, C., Satterwhite, D., Goodfellow, R. & Moesinger, S. 1977. Model studies of the biosynthesis of non-head-to-tail terpenes. Rearrangements of the chrysanthemyl system. – JACS, **99(11)**: 3816-3823.

- Prusinowska, R. & Smigielski, K. 2014. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) A review. – *Herba Polonica*, **60(2)**: 56-66.
- Puerta, R., Sáenz, M. & Garcia, M. 1996. Antibacterial activity and composition of the volatile oil from *Achillea ageratum* L. – *Phytother. Res.*, **10**: 248-250. – *Nat. Prod. Commun.*, **2(4)**: 453-474.
- Radulovich, N., Zlatkovich, B., Palic, R. & Stojanovich, G. 2007. Chemotaxonomic significance of the Balkan *Achillea* volat
- Rauchensteiner, F., Nejati, S., Werner, I., Glasl, S., Jurenitsch, J. & Kulelka, W. 2002. Determination of taxa of the *Achillea millefolium* group and *Achillea crithmifolia* by morphological and phytochemical methods. I. Characterization of Central European taxa. – *Sci. Pharm.*, **70**: 199-230.
- Richardson, I. B. 1976. 58 *Achillea* L. – In Tutin T. G. & al. (Eds). *Flora Europea*, **4**: 159-165. Univ. Press, Cambridge.
- Rustyan, A., Komeilizadeh, H., Shariatpanahi, M., Jassbi, A. & Masoudi, S. 1998. Comparative study on the essential oils of tree *Achillea* species from Iran. – *J. Essent. Oil Res.*, **10(3)**: 207-209.
- Ruzicka, L., 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. – *Experientia*, **9**: 357-396.
- Sadirberov, D., Suleimenov, E., Tikhonova, E., Atazhanova, G., Tkachev, A. & Adekenov, S. 2006. Component composition of essential oils from four species of the genus *Achillea* growing in Kazakhstan. – *Chemistry of Natural Compounds*, **42(3)**: 294-297.
- Saedidnia, S., Yassa, N. & Rezaeipoor, R. 2004. Comparative investigation of the essential oils of *Achillea talagonica* Boiss. and *A. millefolium*, chemical composition and immunological studies. – *J. Essent. Oil Res.*, **16(3)**: 262-265.
- Saukel, J & Lange, R. 1992. *Achille pratensis* Saukel & Langer, spec. nova, eine tetraploide sippe der *Achillea millefolium*-Gruppe. – *Phyton (Horn, Austria)*, **32(1)**: 159-172.
- Schmidt, E., 2003. The characteristics of lavender oils from eastern Europe: Ukraine, Moldova and Bulgaria. – *Perf. & Flav.* **28(4)**: 48-60.

- Sharapov & F. Setzer, W. 2010. Composition of the essential oil of *Achillea filipendulina* Lam. from Tajikistan. – *Der pharma Chemica*, **2(6)**: 134-138.
- Shellie, R., Mondello, L., Marriott, P. & Dugo, G. 2002. Characterisation of lavender essential oils using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. – *J. of Chromatogr. A*, **970**: 225-234.
- Simic, N., Palic, R., Vajs, V., Milosavljevic, S. & Djokovic, D. 2002. Composition and antibacterial activity of *Achillea asplenifolia* Essential Oil. – *J. Essent. Oil Res.*, **14(1)**: 76-78.
- Simonsen, H., Weitzel, C. & Christensen, S. 2013. Guaianolide sesquiterpenoids: Pharmacology and biosynthesis. In: Ramawat, K. & Mérillon, J. (Eds). *Natural Products*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Smelcerovic, A., Lamshoeft, M., Radulovic, N. & Palic, R. 2010. LC-MS Analysis of the essential oils of *Achillea millefolium* and *Achillea crithmifolia*. – *Chromatographia*, **71(1/2)**: 113-116.
- Steinlesberger, H. 2002. Investigations on progenies of crossing experiments of Bulgarian and Austrian yarrows (*Achillea millefolium* Agg. *Compositae*) with focus on the enantiomeric ratios of selected monoterpenes. PhD Thesis, Veterinarmedizinische University, Vienna.
- Stenhagen, E., Abrahamsson, S. & McLafferty, F. 1974. *Registry of Mass Spectral Data*. John Wiley & Sons, New York.
- Toker, Z., Ozen, H., Clery, R. & Owen, N. 2003. Essential oils of two *Achillea* species from Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, **15(2)**: 100-101.
- Tuberoso, C. & Kowalczyk, A. 2009. Chemical composition of the essential oils of *Achillea millefolium* L. isolated by different distillation methods. *J. Essent. Oil Res.*, **21(2)**: 108-111.
- Tzakou, O., Loukis, A. & Argyriadou, N. 1993. Volatile constituents of *Achillea crithmifolia* flowers from Greece. – *J. Essent. Oil Res.*, **5(3)**: 345-346.
- Unlu, M., Daferera, D., Dönmez, E., Polissiou, M., Tepe, B. & Sökmen, A. 2002. Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea terenifolia* (Compositae). *J. Ethnopharmacol.*, **83**: 117-121.

- Venskutonis, P., Dapkevicius & Baranauskiene, M. 1997. Composition of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) from Lithuania. J. Essent.Oil Res., **9(1)**: 107-110.
- Vlahov, R., Ognyanov, I., Ivanov, D. & Ganev, G. 1967. Sesquiterpene hydrocarbons in Bulgarian lavender oil. - Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., **20(12)**: 1303-1304.
- Yusubov, M.C., Kalinkina, G., Dragunova, L., Pokrovskij, L., Koroluk, E. & Tkachev, A. 2000. Chemical composition of essential oils from *Achillea millefolium* L. and *Achillea asiatica* Serg. - Khimiya Rastitelnogo Syrya, **3**: 25-32.
- Wagenitz, 1968/1979. *Achillea*. In: Illustrierte flora von Mitteleuropa (G. Hegi), 2. Aufl., **6(3)**: 287-349. Berlin-Hamburg.
- Wagner, H. & Bladt, S. 1996. Plant drug analysis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Zhekova, G. & Nedkov, N. 2010. Quantitative changes in major components of lavender oil during the distillation process. – Agricultural Science and Technology, **2(1)**: 26-28.
- Zheljazkov, V., Cantrell, Ch., Astatkie, T. & Jeliaskova, E. 2013. Distillation time effect on lavender essential oil yield and composition. – J. Oleo Sci., **62(4)**: 195-199.
- Zolotovitch, G. 1955. Some technological affecting the quality of lavender oil. - Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., **8(3)**: 9-12.

Публикации във връзка с дисертацията:

1. **A. Konakchiev**, M. Todorova, B. Mikhova, A. Vitkova, Hristo Najdenski, Composition and Biological Activity of *Achillea distans* W. et K. Essential Oil, Nat. Prod. Commun., **5** (3), 1-3, 2010. (IF: 0.92)
2. **A. Konakchiev**, M. Todorova, B. Mikhova, A. Vitkova, H. Najdenski, H. Duddeck, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from two *Achillea collina* Becker. Comptes rendus de l' Academie bulgare des Sciences., **59** (5), 505-510, 2006.
3. K.H.C. Baser, T. Ozek, **A. Konakchiev**, Enantiomeric distribution of linalool, linalyl acetate and camphor in Bulgarian Lavender oil, J. Essent. Oil Res., **17** (2), 135-136, 2005. (IF: 0.4)
4. A. Vitkova, M. Anchev, V. Goranova, M. Todorova, **A. Konakchiev**, *Achillea millefolium* group in Bulgaria. Pharmacia. v.**LII**, 1-2:60-63, 2005.
5. **A. Konakchiev**, B. Mikhova, M. Todorova, H. Najdenski, I. Tzvetkova, A. Vitkova, H. Duddeck, Composition of the essential oil of *Achillea asplenifolia* Vent. From Bulgaria. Journal of Essential Oil Bearing Plants, **8** (3), 318-323, 2005. (IF: 0.19)
6. **A. Konakchiev**, A. Vitkova, Essential oil composition of *Achillea crithmifolia* Waldst. et Kit, Journal of Essential oil Bearing Plants, **7** (1), 32-36, 2004. (IF: 0.19)
7. **A. Konakchiev**, E. Tsankova, Composition of essential oils of some Bulgarian Lavender sorts. "Food science, technique and technologies 2004", Plovdiv, October 27-29, 2004, Scientific works, **51** (3), 168-171, 2004.
8. J. Saukel, M. Anchev, Y. Guo, A. Vitkova, A. Nedelcheva, V. Goranova, **A. Konakchiev**, M. Lambrou, S. Nejati, F. Rauchensteiner, F. Ehrendorfer, Comments on the biosystematics of *Achillea* (*Asteraceae-Anthemideae*) in Bulgaria, Phytologia balcanica, **9** (3), 361-400, 2003.

Забелязани цитати:

Статия 1:

1. Benedec, D., Vlase, L., Oniga, I., Mot, A.C., Damian, G., Hanganu, D., Duma, M., Silaghi-Dumitrescu, R. 2013. Polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities for two Romanian subspecies of *Achillea distans* Waldst. et Kit. ex Willd. *Molecules*, **18 (8)**: 8725-8739.
2. Abad, M.J., Bedoya, L.M., Bermejo, P. 2013. Essential oils from the Asteraceae family active against multidrug-resistant bacteria. – In: Ray, M. & Kon, K. *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components*, 1st edition, Academic Press. 205-221.
3. Jemia, M.B., Rouis, Z., Maggio, A., Venditti, A., Bruno, M., Senatore, F. 2013. Chemical composition and free radical scavenging activity of the essential oil of *Achillea ligustica* growing wild in Lipari (aeolian islands, Sicily). *Nat. Prod. Commun.*, **8 (11)**: 1629-1632.
4. Abad, M.J., Bedoya, L.M., Apaza, L., Bermejo, P. 2012. The *Artemisia* L. genus: A review of bioactive essential oils. *Molecules*, **17 (3)**: 2542-2566.
5. Hussin, W.A., El-Sayed, W.M. 2011. Synergic interactions between selected botanical extracts and tetracycline against gram positive and gram negative bacteria. *Journal of Biological Sciences*, **11 (7)**: 433-441.

Статия 3:

1. Yang, D.S., Son, K.-C., Kays, S.J. 2009. Volatile organic compounds emanating from indoor ornamental plants. *HortScience*, **44 (2)**: 396-400.
2. Стоянова, А., Балинова-Цветкова, А. и Георгиев, Е. 2009. Лавандула. Получаване на етеричномаслени продукти в България. Изд. Агенция 7Д, Пловдив.
3. Георгиев, Е., Стоянова, А. 2006. Справочник на специалиста от ароматичната промишленост. – Изд. БНАЕМПК, Пловдив..

Статия 5:

1. Kindlovits, S., Németh, É. 2012. Sources of variability of yarrow (*Achillea* SPP.) essential oil. *Acta Alimentaria*, **41 (SUPPL. 1)**: 92-103.

Статия 6:

1. Kindlovits, S., Németh, É. 2012. Sources of variability of yarrow (*Achillea* SPP.) essential oil. *Acta Alimentaria*, **41 (SUPPL. 1)**: 92-103.

Статия 7:

1. Zhekova, G.& Nedkov, N. 2010. Quantitative changes in major components of lavender oil during the distillation process. – *Agricultural Science and Technology*, **2(1)**: 26-28.

2. Стоянова, А., Балинова-Цветкова, А. и Георгиев, Е. 2009. Лавандула. Получаване на етеричномаслени продукти в България. Изд. Агенция 7Д, Пловдив.

3. Георгиев, Е., Стоянова, А. 2006. Справочник на специалиста от ароматичната промишленост. – Изд. БНАЕМПК, Пловдив.

Статия 8:

1. Akyaçın, H., Arabacı, T., Yıldız, B. 2014. Pollen morphology of some *Achillea* L. sect. *Vabounya* (DC.) O. Hoffm. (Asteraceae) species from Turkey. *Acta Botanica Gallica*, **161 (2)**: 129-149.

2. Aksu, N., Inceer, H., Hayirlioğlu-Ayaz, S. 2013. Karyotype analysis of six *Achillea* L. (Asteraceae, Anthemideae) taxa from Turkey. *Caryologia*, **66 (2)**: 103-108.

3. Paule, J., Scherbantin, A., Dobeš, C. 2012. Implications of hybridisation and cytotypic differentiation in speciation assessed by AFLP and plastid haplotypes - A case study of *Potentilla alpicola* la Soie. *BMC Evolutionary Biology*, **12 (1)**, art. no. 132.

4. Dunkel, F.G., Gregor, T., Meierott, L. 2012. *Achillea roseoalba* - a long ignored relict in Germany. Feddes Repertorium, **122 (3-4)**: 268-274.
5. Ebrahim, F., Pakniyat, H., Arzani, A., Rahimmalek, M. 2012. Karyotype analysis and new chromosome number reports in *Achillea* species. Biologia, **67 (2)**:284-288.
6. Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., Saukel, J. 2011. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. Journal of Ethnopharmacology, **133 (3)**: 1051-1076.
7. Radulović, N.S., Blagojević, P.D., Skropeta, D., Zarubica, A.R., Zlatković, B.K., Palić, R.M. 2010. Misidentification of tansy, *Tanacetum macrophyllum*, as yarrow, *Achillea grandifolia*: A health risk or benefit? Natural Product Communications, **5 (1)**: 121-127.
8. Sheidai, M., Azanei, N., Attar, F. 2009. New chromosome number and unreduced pollen formation in *Achillea* species (Asteraceae). Acta Biologica Szegediensis, **53 (1)**: 39-43.
9. Kozuharova, E. 2009. New ex situ collection of rare and threatened medicinal plants in the Pirin Mts. (Bulgaria). Ekoloji, **19 (72)**: 32-44.
10. Çelik, N., Akpulat, H.A. 2008. *Achillea sivasica* (Asteraceae: Sect. Babounya (DC.) O. Hoffm.), a new species from Inner Anatolia, Turkey. Kew Bulletin, **63 (3)**: 485-489.
11. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Bogavac, M., Suvajdzic, L., Simin, N., Samojlik, I., Couladis, M. 2008. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* Scheele essential oils. Molecules, **13 (9)**: 2058-2068.
12. Kiran, Y., Arabaci, T., Sahin, A., Turkoglu, I. 2008. Karyological notes on another eight species of *Achillea* (Asteraceae) from Turkey. Biologia, **63 (3)**: 343-348.