ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ "ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ" ХИМИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ, КАТЕДРА "ОРГАНИЧНА ХИМИЯ"

Димитър Георгиев Божилов

ФИТОХИМИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ЕТЕРИЧНОТО МАСЛО И ПОЛИФЕНОЛНИЯ КОМПЛЕКС НА БЯЛ РАВНЕЦ, МЕНТА И ОГНИЧЕ

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен

"доктор"

област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика

професионално направление 4.2. Химични науки

<u>Научен ръководител</u>: доц. д-р Солея Запрянова Даньо

Рецензенти:

проф. д-р Пантелей Денев доц. д-р Румяна Милина-Димитрова

Пловдив, 2017 г.

Изследванията в дисертационния труд са извършени в катедрата по органична химия към Химически факултет при Пловдивски университет "Паисий Хилендарски", Агробиоинститут – София, и Биологически факултет при Пловдивски университет "Паисий Хилендарски".

Дисертационният труд е обсъден на катедрен съвет на катедра "Органична химия" при Пловдивски университет "Паисий Хилендарски" (Протокол № 283 от 05. 07. 2017 г.) и съдържа: 135 печатни страници, 34 схеми, 32 фигури, 15 таблици, 221 цитирани литературни източника.

Материалите по защитата са на разположение за интересуващите се в Централната библиотека на ПУ "Паисий Хилендарски".

Научно жури:

проф. д-р Пантелей Денев доц. д-р Румяна Милина-Димитрова доц. д-р Антоанета Трендафилова-Савкова доц. д-р Стела Статкова – Абегхе доц. д-р Солея Даньо

Използвани съкращения

Ш-11	Проба огниче от района на с. Шипка 2011г
Ш-12	Проба огниче от района на с. Шипка 2012г
К-12	Проба огниче от района на с. Калояново 2012г
Кр-12	Проба огниче от района на гр. Кричим 2012г
P-13	Проба огниче от района на с. Рогош 2013г
Пт-13	Проба огниче от района на гр. Пловдив-Тракия 2013г
У-13	Проба огниче от района на с. Устина 2013г
HPLC	Високоефективна течна хроматография
UHPLC	Ултрависокоефективна течна хроматография
GC-FID	Газова хроматография с пламъчно-йонизационен детектор
GC-MS	Газова хроматография с масселективен детектор
PDA	Детектор с диодна матрица
MS	Масселективен детектор
ESI	Електроспрей йонизация
RP C ₁₈	Обратна фаза C ₁₈
КХК	Кафеоилхинова киселина
диКХК	Дикафеоилхинова киселина
DM	Dry material (Сух материал)
TFA	Трифлуорооцетна киселина
AcOH	Оцетна киселина
t _R	Време на задържане
LOD	Граница на детектиране
LOQ	Граница за количествено определяне
IC ₅₀	Инхибираща концентрация
Da	Далтон
TIC	Total ion current (Общ йонен ток)
NCE	Нормализирана колизационна енергия
RDA	Ретро-Дилс-Алдер циклизация
m/z	Маса към заряд
CID	Колизия на индуцираната дисоциация
CGA	Хлорогенови киселини
Апг	Апигенин
Лут	Лутеолин

1 ВЪВЕДЕНИЕ

Сред огромното разнообразие на българската флора, от 3500 растителни вида, около 500 са известни като лечебни. В народната медицина има натрупана огромна информация за полезните качества на много от билките. Тяхната ограничена трайност и зависимостта им от сезона и почвено-климатичните условия на региона в който виреят, както и липсата на подробни данни за съдържанието на биологично активните вещества, могат да се посочат като основен недостатьк.

В народната медицина ментата, белия равнец и огничето се използват под формата на хранителни добавки и лекарства на билкова основа, които са известни с широк спектър на действие. Въпреки доказаната биологична активност на билките, информацията за биологично активните компоненти е непълна. В този смисъл представляват интерес изследванията относно състава на етеричното масло и полифенолния комплекс.

Развитието и модернизирането на методите за анализ предоставя нови възможности за получаване на информация за химичния състав на растенията. Найчесто във фитохимичните изследвания се прилагат хроматографски методи, чрез които се осъществява идентификация и количествено определяне на биологично активните вещества. В тази връзка не е намерена информация за хроматографския профил на полифенолния комплекс в огниче, получен в условията на HPLC-PDA и UHPLC-MS/MS. Не е изследван състава на полифенолите в култивирани видове мента и видове бял равнец в България. Не е намерена информация за компонентите на етеричното масло от огниче, култивираните *Mentha citrata* и *Mentha suaveolens*, в България.

Приложението на съвременните комбинирани хроматографски техники за идентификация и структурно характеризиране на компонентите на полифенолния комплекс се развива интензивно през последните години и възможностите на тези методи все още не са изследвани напълно. В този смисъл представлява интерес да изследваме състава на полифенолния комплекс от огниче, от три вида мента култивирани в България, както и във видове бял равнец.

4

2 ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ: Изследване състава на полифенолния комплекс във видове бял равнец, мента и огниче, както и компонентите на етеричното масло, получено от мента и огниче с помощта на комбинирани хроматографски методи.

ЗАДАЧИ:

За постигането на целта си поставихме следните задачи:

- Разработване на хроматографски профили "пръстов отпечатък" (fingerprints) на полифеноли в нехидролизирани екстракти от видове бял равнец, три вида култивирана мента и диворастящо огниче;
- Установяване на изменения в хроматографските профили на полифенолите в резултат на хидролиза на компонентите в екстракт от огниче;
- Идентификация и структурна характеристика на компонентите на полифенолния комплекс на изследваните билки;
- 4. Определяне на съдържанието на основни компоненти на полифенолния комплекс в нехидролизирани екстракти от билки;
- 5. Идентификация и количествено определяне на компоненти на етеричното масло от три вида култивирана мента и диворастящо огниче.

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

3.1 Материали и Методи

- 3.1.1 Растителен материал от огниче Растителният материал е идентифициран от доц. д-р Койчо Коев (катедра Ботаника към Биологически факултет на Пловдивски университет).
- 3.1.2 Растителен материал от три вида мента Разсадът от М. piperita идентифициран като сорт Зефир е предоставен от Институт по розата и етеричномаслените култури, Казанлък, България. Разсадът на M. citrata и M. suaveolens е предоставен от Martin Bauer GmbH & Co. KG, 91487 Vestenbergsgreuth, Германия.
- 3.1.3 Растителен материал от видове бял равнец Разсъдът от видовете бял равнец е отгледан в парници и след това растенията са засадени в експериментални полета на Институт по физиология на растенията и генетиката БАН София и в Южна Турция по проект Joint Research Project /Turkey ,TUBITAK Bulgaria, BAS/. "Comperative study of valuable medicinal plants of Achillea millefolium group: physiological and phytochemical approaches and practical applications." BG. Co-director: Prof. Sce. Aglica Edreva. 20.12.2008-20.12.2011. Assos. Prof. PhD Antonina Vitkova. Видовете бял равнец са идентифицирани от доц. д-р Антонина Виткова от Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания БАН София.

3.2 Методи за изследване на полифенолния комплекс

- 3.2.1 Екстракция с 70 % метанол
- 3.2.2 Хидролиза на полифеноли на екстракт от огниче
- 3.2.3 Фракциониране на компонентите на полифенолния комплекс с различни по полярност разтворители
- 3.2.4 Анализ на полифеноли с високоефективна течна хроматография с детектор с фотодиодна матрица (HPLC-PDA)
- 3.2.5 Анализ на полифеноли с ултрависокоефективна течна хроматография с Орбитрап масспектрометър (UHPLC-MS/MS)

3.3 Методи за изследване на етеричното масло

- 3.3.1 Изолиране на етерично масло от огниче и видове мента
- 3.3.2 Анализ на етеричното масло с газова хроматография
- 3.3.3 Идентифициране на компонентите на етеричното масло

4 РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

При изследването на полифенолния състав на огниче, мента и бял равнец бяха приложени експериментални подходи, които включват различни процедури на екстракция и методи за детектиране. Използвахме различни по полярност разтворители за екстрахиране на полифенолния комплекс и хроматографска апаратура HPLC-PDA и Orbitrap UHPLC-MS/MS.

4.1 HPLC-PDA анализ на полифеноли в нехидролизирани и хидролизирани екстракти

- 4.1.1 Хроматографски профили "пръстов отпечатък" (fingerprints) на нехидролизирани екстракти
- 4.1.1.1 Хроматографски профил на огниче (Chenopodium botrys)



Фиг. 1. Хроматографски профил на полифеноли в огниче на колони Kromasil и Purospher, метод TFA (A) и метод AcOH (B).

При разработването на хроматографските профили «пръстов отпечатък» целта е получаване на максимален брой пикове и възможно най-добро разделяне за всички компоненти на полифенолния комплекс. По този начин се улеснява адекватната идентификация и количествено определяне на съединенията. Използвахме хроматографски колони Kromasil и Purospher RP C₁₈ и подвижни фази с добавка на трифлуорооцетна (TFA) и оцетна киселини (AcOH) (**Фиг. 1**).

Основните пикове **11**, **12** и **13** разкриват хроматографски и UV характеристики типични за агликоните. От хроматографските и UV спектрални данни установихме, че хиспидулинът е основният флавон от групата на 6-метоксифлавони в пробите от огниче от Южна България (**Фиг. 2**). Резултатите показват наличието и на други метоксилирани флавони като непетин, яцеозидин, еупатилин, синесетин и нобилетин. Всичките 5 пика (**11**, **12**, **13**, **14** и **15**) представляват 95 % от общата площ на пиковете в хроматографския профил на полифенолите (**Фиг. 2**).

Процентното съдържание на флавоноидни гликозиди, които установихме в огничето е ниско (пикове $1 \div 10$) (Фиг. 2). Установихме, че всички флавоноидни гликозиди показват абсорбция при λ max = 256, 267 и 355 nm, отговаряща на гликозидите на кверцетин.



Фиг. 2. Хроматографски профил и UV-спектрални данни на основните полифеноли в огниче, получен чрез HPLC-PDA.

4.1.1.2 Хроматографски профили на видове мента

В хроматографските профили на полифеноли в *M. piperita, M. citrata* и *M. suaveolens* се детектират два пика на лутеолинови гликозиди съответно с време на задържане $t_R = 18.4$ min и 21.4 min.



Фиг. 3. Хроматографски профили на полифеноли в *M. piperita, M. citrata* и *M. suaveolens*. В трите вида мента, съответно пик t_R =17.6 min, принадлежи на ериоцитрин, пик t_R = 18.4 min на лутеолин-7-*O*-рутинозид и пик t_R = 21.4 min на лутеолин-7-*O*-глюкозид. Пик t_R =30.7 min е идентифициран като розмаринова киселина. Пик с t_R =27.4 min в *M. citrata* и *M. piperita* е идентифициран като хесперидин

В хроматографския профил на *M. citrata* е идентифициран допълнителен пик съответстващ също на лутеолинов гликозид $t_R=14.4$ min. Ериоцитрин ($t_R=17.6$ min) и лутеолин-7-*O*-рутинозид ($t_R=18.4$ min) са основните компоненти, които са характерни в профила «пръстов отпечатък» на полифенолния комплекс в трите вида мента (**Фиг. 3**). В хроматографския профил на *M. suaveolens* идентифицирахме три апигенинови гликозиди, докато те са два в *M. piperita* и *M. citrata* (**Фиг. 3**).

4.1.1.3 Хроматографски профили на видове бял равнец

В хроматографските профили на полифенолите в Achillea collina, Achillea asplenifolia и cv. Proa идентифицирахме апигенин-7-О-глюкозид и апигенин-Оацетилгликозид. Кафеоилхиновите киселини (моно- и ди-) и флавоноидите лутеолин, апигенин и техните гликозиди преобладават в полифенолния комплекс на белия равнец (**Фиг. 4**). Те имат пикове с максимален интензитет съответно при 320 nm и 340 nm. В полифенолния комплекс на *A. collina* и *cv. Proa* не детектирахме пик за рутин, което показаха спектърът от PDA детектора, MS спектъра и стандарт на рутин. Резултатите от изследването с HPLC-PDA корелират с данните, които получихме от UHPLC-MS/MS анализа.



Фиг. 4. Хроматографски профил «пръстов отпечатък» на полифенолите на *A. asplenifolia* 10403. Елуиране на компонентите на полифенолния комплекс описани в полето оцветено в син цвят. Пик-1-неохлорогенова киселина; 2-хлорогенова киселина; 3-4-*O*-КХК; 8-рутин; 10-лутеолин-7-*O*-гликозид; 12-3,5-*O*-диКХК; 13-апигенин-7-*O*-гликозид; 15-4,5-*O*-диКХК; 17-апигенин-*O*-ацетилгликозид; 18-лутеолин; 20-апигенин; 21-диосметин.

От направените експерименти можем да обобщим следните изводи:

- Оптимизирахме условията за HPLC анализ с използването на различни колони и подвижни фази за получаване на хроматографски профили "пръстов отпечатък" на полифенолите в нехидролизирани екстракти на огниче, мента и бял равнец;
- Представена е важна информация за разпределението на компонентите на полифенолния комплекс в изследваните от нас медицински растения;
- За първи път нагледно се представят основните компоненти на полифенолния комплекс: в огниче основно метоксилирани флавони; в *Mentha* spp. гликозиди на ериодиктиол, апигенин и лутеолин, както и розмаринова киселина; в белия равнец - моно- и ди- КХК и гликозиди на апигенин и лутеолин.

4.1.2 Изменения в хроматографските профили на полифенолите в резултат на хидролиза на компонентите

4.1.2.1 Хидролиза на полифенолите в огниче

Киселинната хидролиза на екстракта от полифеноли е един от основните методи за анализ. Този подход от една страна помага за идентифицирането на агликоните и от друга за определяне общото количество на гликозидите. С тази цел направихме киселинна хидролиза на екстракт от огниче. На **фигура 5** и **6** са представени хроматографските профили на нехидролизиран (контрола) и хидролизиран екстракт.



Фиг. 5. Хроматографски профил на нехидролизиран екстракт (контролна проба) от огниче.



Фиг. 6. Хроматографски профил на хидролизиран екстракт от огниче.

От хроматографските профили на фигура 5 и 6 става ясно, че пиковете 15, 16, 17, 18 и 19 (Фиг. 5) са метоксилирани агликони, които съответстват на пиковете от 1 до 5 на хидролизирания екстракт (Фиг.6). Хроматографският профил на хидролизирания екстракт показва, че само пик 1 (Фиг.6) се увеличава два пъти спрямо нехидролизираният екстракт (Фиг.5). Установихме, че времето на задържане (t_R) на кверцетин съвпадна с този на пик 1 (непетин) (Фиг. 6). Това означава, че агликоните непетин и кверцетин коелуират с едно и също t_R . От този резултат заключихме, че кверцетинът е агликонът, който участва в състава на гликозидите, което установихме и при UHPLC-MS/MS анализа.

4.1.2.2 Съдържание на основни компоненти в огниче

Установихме само количествени различия в профилите на полифенолите при 6те проби. Идентични по състав са хроматографските профили на полифенолния комплекс в огниче от 6 различни района на Южна България, представени на **Фиг. 7**.



Фиг. 7. Хроматографски профили на полифенолния комплекс в изследваните проби огниче, събирани от Южна България.

Хиспидулинът е доминантният компонент във всички проби огниче от Южна България. Количеството на хиспидулин в пробите варира от 2.5 mg.g⁻¹ DM до 4.8 mg.g⁻¹ DM (**Фиг.** 8).



Фиг. 8. Съдържание на полифеноли в огниче.

Съдържанието на рутинът варира от 0,24 mg.g⁻¹ до 0,79 mg.g⁻¹ DM в изследваните проби (**Фиг. 8**). Съдържанието на хиперозид и изокверцетин в изследваните проби варират съответно от 0,17 mg.g⁻¹ до 0,54 mg.g⁻¹ DM и от LOQ до 0,25 mg.g⁻¹ DM (**Фиг. 8**).

4.1.2.3 Съдържание на основни компоненти в Mentha spp.

Розмариновата киселина е основната фенолна киселина. Съдържанието на розмариновата киселина в *M. citrata* е най-високо 4.22 mg.g⁻¹DM. Отличителна черта за *M. citrata* е и най-високото съдържание на хесперидин (**Фиг. 9**). Биологично активните съединения, лутеолинови гликозиди, също са в по-големи количества в *M. citrata*. Найобщо съдържанието на полифеноли в *M. citrata* е най-високо. Данните показват големите различия в състава на полифенолите между *M. piperita* и *M. citrata*. Всички полифенолни съединения са в по-малко количество в *M. piperita* (**Фиг. 9**).



Фиг. 9. Съдържание на полифеноли в *M. piperita* (MP), *M. citrata* (MC), *M. suaveolens* (MS). ХК-хлорогенова к-на, РК-розмаринова к-на, ХСД-хеперидин, Л-Г*-лутеолинови гликозиди, А-Г*-апигенинови гликозиди*. *Съдържанието на Л-Г и А-Г е определено спрямо Лут и Апг.

4.1.2.4 Съдържание на основни компоненти в Achillea millefolium

В белия равнец най-разпространени са фенолните киселини. Моно- и диКХК (хлорогеновата, 3,5-*О*-диКХК) са в най-големи количества във всички проби бял равнец.

Съдържанието на хлорогенова киселина е в най-голямо количество спрямо нейните изомери във всички изследвани проби от бял равнец (**Фиг. 10**). Количеството варира в интервала от 2,5 до 5,7 mg.g⁻¹ DM за реколта 2009 и 3,9 до 6,6 mg.g⁻¹ DM за

реколта 2010. В изследваните от нас проби изомерите на хлорогеновата киселина са в малки количества, достигащи до следови за 4-*O*-кафеоилхиновата киселина.

От диКХК в белия равнец съдържанието на 3,5-*О*-диКХК е най-високо спрямо другите полифеноли в изследваните от нас проби (5.37-12.1 mg.g⁻¹ DM) като 3,5-*О*-диКХК е основен компонент в белия равнец (**Фиг. 11**).



Фиг. 10. Съдържание на монокафеоилхинови киселин в изследваните видове бял равнец (*Achillea asplenifolia, Achillea collina* и *cv.Proa*) събирани от България и Турция за реколта 2009 и 2010 год. ХлК-хлорогенова киселина; Нео-неохлорогенова киселина; 4-*O*-КХК-4-*O*-кафеоилхинова киселина



Фиг. 11. Съдържание на диКХК* в изследвани видове бял равнец (*Achillea asplenifolia, Achillea collina* и *cv.Proa*) събирани от България и Турция за реколта 2009 и 2010 год. *Съдържанието на диКХК е определено спрямо ХлК.

Резултатите за съдържанието на 4,5-*О*-диКХК показват, че в турските проби тя количествено доминира над българските (**Фиг. 11**). Тази тенденция е много добре изразена в пробите бял равнец от реколта 2009 година. Съдържанието на 4,5-*О*-диКХК е ниско и максималната концентрация достига до 5,3 mg.g⁻¹ DM (**Фиг. 11**).

От анализа с UHPLC-MS/MS и HPLC-PDA установихме, че във всички проби бял равнец пробладават апигенинови гликозиди. Освен тях, установихме и наличието на лутеолин и лутеолин-7-*O*-глюкозид. Най-високо е съдържанието на лутеолин-7-*O*глюкозид в *Achillea collina* 102 от България (**Фиг. 12**). Съдържанието на лутеолин-7-*O*глюкозид варира от 0,63 до 1,92 mg.g⁻¹ DM за двете реколти. Най-високо съдържание на апигенин-7-*O*-глюкозид установихме в *Achillea asplenifolia* 9602 от България. Количеството му за реколта 2009 и 2010 съответно е 2,71 mg.g⁻¹ DM и 4,5 mg.g⁻¹ DM (**Фиг. 13**).



Фиг. 12. Съдържание на лутеолин (Лут) и лутеолин-7-*О*-глюкозид (Л7Г)* в изследваните видове бял равнец (*Achillea asplenifolia, Achillea collina* и *cv.Proa*) събирани от България и Турция за реколта 2009 и 2010 год. *Съдържанието на Л7Г е определено спрямо Лут.



Фиг. 13. Съдържание на апигенин (Апг) и апигенин-7-*О*-глюкозид (А7Г)* в изследваните видове бял равнец (*Achillea asplenifolia, Achillea collina* и *cv.Proa*) събирани от България и Турция за реколта 2009 и 2010 год. *Съдържанието на А7Г е определено спрямо Апг.

От резултатите става ясно, че съдържанието на 7-*О*-гликозидите на апигенина и лутеолина доминират над агликоните (**Фиг. 12, 13**). Съдържанието на апигенин-Оацетилгликозид във всички изследвани проби за двете реколти варира от 0,25 до 1,74 mg.g⁻¹ DM.

Рутин установихме само в пробите от *A. asplenifolia* (българската и турската). Рутин не беше идентифициран в *A. collina* и *cv Proa*. Съдържанието на рутин в пробите от *A. asplenifolia* варира от 0.56 до 1.49 mg.g⁻¹ DM.

От експериментално получените данни става ясно, че фенолните киселини преобладават в състава на полифенолния комплекс. По отношение на състава на флавоноидите, пробите от бял равнец се характеризират с количественото доминиране на апигенин-7-*О*-глюкозид и лутеолин-7-*О*-глюкозид.

От количествения анализ на полифенолите в огниче, мента и бял равнец установихме:

- 6-метоксифлавонът хиспидулин е основният компонент в огниче (2.5 4.8 mg.g⁻¹ DM);
- ниско съдържание на кверцетин-*О*-гликозиди като рутин, изокверцетин и хиперозид в огниче;
- по-високо съдържание на розмаринова киселина и лутеолинови гликозиди в *M*. *citrata* и *M. suaveolens* отколкото в *M. piperita;*
- *M. citrata* се отличава съществено от *M. suaveolens* и *M. piperita* по съдържание на хесперидин;
- във всички проби бял равнец приемуществено преобладават фенолните киселини, от които хлорогеновата и 3,5-О-диКХК са основни компоненти. От гликозидите в белия равнец преобладават апигенинови гликозиди;
- В A. asplenifolia се съдържа рутин, докато той не се регистрира в A. collina и cv. Proa.

4.2 Идентификация на полифеноли чрез UHPLC-MS/MS

4.2.1 Идентификация на полифеноли в огниче

Изясняването на структурата на полифенолните компоненти беше осъществено чрез сканиране на молекулния йон и чрез MS/MS експерименти. MS и MS/MS анализите позволяват да се установи молекулната маса на компонентите на полифенолния комплекс и да се получи подробна структурна информация.

17

В настоящото изследване, ESI-MS/MS анализът показа по-добри резултати при йонизация в негативен режим за кверцетинови гликозиди и полиметоксилираните флавони синенсетин и нобилетин. Молекулните йони $[M-H]^-$ бяха взети като прекурсори и дадоха спектър, съответстващ на депротонирате агликони. Йонизацията в негативен режим (от 20 eV до 50 eV) беше тествана и за 6-метоксифлавони. При този режим на йонизация фрагментирането на депротонирания молекулен йон $[M-H]^-$ показа, че интензитетът на получените характеристични фрагментни йони ${}^{1.3}$ A⁻ и ${}^{1.3}$ B⁻ е по-нисък в сравнение с проведената йонизация в позитивен режим. Затова изследването на 6-метоксифлавоните беше проведено при йонизация в позитивен режим. И двата режима на йонизация са важни, защото дават специфична и полезна информация за фрагментирането на молекулния йон като цяло и за характеристичните фрагментни йони (${}^{i.j}$ A и ${}^{i.j}$ B).

4.2.1.1 Структурно характеризиране на агликони в огниче

Структурно характеризиране на 6-метоксифлавони проведохме в условията на електроспрей йонизация в позитивен режим.

Фиг. 14А показва общият йонен ток (TIC) на шест метоксилирани агликони в огниче. В хлороформената фракция от огниче установихме и идентифицирахме метоксилирани флавони (Фиг. 14А).

Оптимизираните от нас хроматографски условия позволиха добро разделяне на всички компоненти. От хроматограмата става ясно, че полиметоксилираните флавони сисненсетин и нобилетин са в много малки количества (**Фиг. 14A**). Масспектърът на основния 6-метоксифлавон хиспидулин, получен при фрагментирането на молекулния йон $[M+H]^+$ в условия на йонизация в позитивен режим и ESI-MS/MS експеримент е представен на **Фиг. 14B**.

18



Фиг. 14. Общ йонен ток (TIC) на метоксилирани флавони в хлороформената фракция (**A**) от *C. botrys*. Масспектър на хиспидулин получен от протонирания йон $[M+H]^+$ чрез ESI-MS/MS експеримент(**B**).

От масспектралното изследване на 6-метоксифлавони предлагаме номенклатура за разкъсване на пръстен С в условията на ESI-MS/MS в позитивен режим. На схема 1А е представена структурата на 6-метоксифлавони. Номенклатурата приета за ретро-циклизационно разскъсване на пръстен С в настоящето изследване е представена на схема 1В.



Схема 1. Структура на 6-метоксифлавони (А); Номенклатура за различно ретроциклизационно разкъсване на пръстен С в позитивен режим на йонизация чрез ESI-MS/MS (B).

На **схема 1В** обозначенията ^{i,j}A и ^{i,j}B се отнасят за фрагментите, съдържащи съответно пръстените A и B, докато горните индекси i и j показват мястото на разскъсване на връзките в пръстен C. Фрагментните йони ^{i,j}A⁺ и ^{i,j}B⁺ претърпяват допълнително

фрагментиране, свързано със загуба на метилова група (-CH₃) или на малки неутрални молекули като СО.

Фрагментирането на протонирания хиспидулин в условията на ESI-MS/MS експеримента е представено на Схема 2. То е свързано с разкъсването на две С–С връзки в позициите 1/3 и 0/2 в пръстен С и дава структурна информация за получените фрагментни йони ^{i,j}A⁺ и ^{i,j}B⁺ (Схема 2).

Интензитетът на фрагментните йони зависи от колизационната енергия. Установихме, че 60 eV е оптималната стойност на колизационната енергия за йонизиране и фрагментиране на непетин, хиспидулин и яцеозидин и 50 eV за еупатилин.



Схема 2. Схема за фрагментиране на протониран хиспидулин при NCE 60 eV.

Основният пик, който се получава при фрагментацията на протонирания хиспидулин е йон с m/z 286, дължащ се на загуба на метилов радикал 15 Da (**Фиг. 14B**, **Схема 2**). Същият фрагментен йон [M+H–CH₃]⁺⁺ губи неутрална молекула СО и с това се обяснява образуването на йон с m/z 258. Ретро-Дилс-Алдер циклизацията на хиспидулин води до образуването на фрагментните йони ^{1.3}A⁺ и ^{1.3}B⁺ (**Схема 2**). При висока колизационна енергия масспектърът на хиспидулин (**Фиг. 14B**) показва, че йонът с m/z 168 се приписва на фрагмента –CH₃^{1.3}A⁺. Той се характеризира с директна загуба на метилов радикал и е с висок интензитет. Йонът с m/z 119 е с нисък интензитет и отговаря на фрагмента ^{1.3}B⁺. Полученият фрагмент –CH₃^{1.3}A⁺ систематично

претърпява загуба на СО, което води до последователно образуване на йон с m/z 140 и йон с m/z 112 (**Фиг. 14В, Схема 2**). Тези йони образуват специфична триада за хиспидулин, които са характерни за заместителите в пръстен А от една страна и от друга допринасят за идентификацията на 6-метоксифлавони. Освен това фрагментът – $CH_3^{1.3}A^+$ допълнително претърпява загуба на водороден протон и следваща ретроциклизация, което води до образуването на йони с m/z 99 и с m/z 68 (**Фиг. 14В, Схема** 2). Следващата ретро-циклизация на хиспидулин води до образуването на фрагментен йон $^{0.2}B^+$ с m/z 121 (**Фиг. 14В, Схема 2**). Тези йони дават информация, че в пръстен А се съдържат две хидроксилни групи и една метокси група и една хидроксилна група в пръстен В. Тези заместители в пръстените А и В са характерни за протонирания молекулен йон на хиспидулин.



Фиг. 15. Масспектри на непетин, яцеозидин и еупатилин получени от протонирания йон $[M+H]^+$ чрез ESI-MS/MS експеримент.

Освен хиспидулин в хлороформената фракция бяха регистрирани молекулни йони с m/z 317, 331 345, отговарящи съответно на непетин, яцеозидин и еупатилин (**Фиг. 15**). Тяхната фрагментация води до формирането на специфични йони с m/z 168, 140, 112, 99 и 68 (**Таблица 1**). Това показва, че заместителите в пръстен А са еднакви като тези във флавона хиспидулин. Съществени различия се появяват в пръстен В. В действителност масспектърът на непетин е подобен с този на хиспидулин, с изключение, че пръстен В показва йон, който се измества с 16 Da, дължащ се на една допълнителна хидроксилна

група. Двата фрагментни йона с m/z 137 и m/z 135 наблюдавани в масспектъра отговарят съответно на ${}^{0.2}\text{B}^+$ и ${}^{1.3}\text{B}^+$ (Фиг. 15, Таблица 1).

По същия начин бяха изследвани масспектрите на яцеозидин и еупатилин. Фрагментните йони ${}^{0.2}B^+$ с m/z 151 и ${}^{1.3}B^+$ с m/z 149 показват наличието на една допълнителна метокси група и са характерни за флавона яцеозидин (**Фиг. 15, Таблица 1**). Йоните ${}^{0.2}B^+$ с m/z 165 и ${}^{1.3}B^+$ с m/z 163 показват наличието на две метокси групи и характеризират флавона еупатилин (**Фиг. 15, Таблица 1**).

Таблица 1. ESI-MS/MS фрагментни йони, получени от молекулния йон $[M+H]^+$ на 6-метоксифлавони в *C. botrys*

Фрагменти	Непетин	Хиспидулин	Яцеозидин	Еупатилин
$[\mathbf{M}_{+}\mathbf{H}]^{+}$	$317.0643(1)^{a}$	301.0704 (1.8)	331.0797 (1)	345.0966 (3.1)
	[5.68] ^b	[2.66]	[6.34]	[2.32]
[M+H_CH_1·+	302.0415 (30)	286.0467 (100)	316.0571 (55)	330.0729 (100)
	[3.97]	[3.5]	[3.8]	[3.33]
$[M+H-CH_4]^+$	_	_	_	329.0646 (10.4)
			201.0220 (20)	[4.56]
$[M+H-2CH_3]^{2,+}$	_	_	301.0338 (38)	315.0495 (13.2)
• • • •			[3.32]	[5.1/]
$[M+H-CH_4-CO]^+$	-	_	-	[2,99]
	274.0464 (4.8)	258.0524 (6)	288.0615 (4)	[=:>>]
[M+H–CH ₃ –CO]·*	[4.74]	[1.55]	[6.6]	—
$[M + H 2CH CO]^{2}$			273.0389 (78)	287.0545 (11.3)
$[M+H-2CH_3-CO]$	_	_	[3.66]	[3.83]
[M+H 2CH 2COl ² · ⁺			245.0440 (88)	259.0601 (2.7)
[1/1+11-20113-200]	_	—	[4.08]	[1.93]
ДРУГ ЙОН	186.0156 (52)	186.0157 (75)	186.0156 (42)	186.0156 (13.4)
				168.0051 (31)
$CH^{-1.3}A^+$	168.0051 (100)	168.0051 (100)	168.0051 (100)	[4.76]
-C113 A	[4.76]	[4.76]	[4.76]	169.0130 (87.7)
				[4.14]
$[-CH_{2}^{1.3}A-CO]^{+}$	140.0103 (8.6)	140.0103 (7.7)	140.0103 (9.6)	140.0103 (0.6)
	[5.0]	[5.0]	[5.0]	[5.0]
$0.2 \mathbf{R}^+$	137.0231 (29)	121.0285 (33)	151.0387 (32)	165.0545 (10.7)
В	[5.84]	[4.13]	[5.3]	[4.24]
$^{1.3}\mathbf{B}^{+}$	135.0440 (5.7)	119.0492 (8.6)	149.0595 (8)	163.0755 (12.8)
	[4.44]	[4.2]	[5.37]	[2.45]
$[^{1.3}B-H^{\bullet}-CH_{2}^{\bullet}]^{+}$	_	_	_	147.0439 (3.7)
				[4.76]
$[-CH_2^{1.3}A-2CO]^+$	112.0155 (17)	112.0155 (17.8)	112.0155 (21.5)	112.0155 (2.6)
	[4.46]	[4.46]	[4.46]	[4.46]
$C_4H_2O_2^+$	99.0079 (19)	99.0079 (16.7)	99.0079 (21.1)	99.0079 (3.6)
-4,~,	[3.03]	[3.03]	[3.03]	[3.03]
$C_3HO_2^+$	68.9978 (7.9)	68.9978 (5.6)	68.9978 (8)	68.9978 (0.75)
5 - 2	[-1.45]	[-1.45]	[-1.45]	[-1.45]

^аm/z (относителен интензитет)

^b[масова грешка, *Дт/z*, ppm]

4.2.1.2 Структурно характеризиране на гликозиди в огниче

В етилацетатната фракция регистрирахме наличието на кверцетинови гликозиди. От масспектъра установихме, че при фрагментирането на молекулния йон $[M-H]^-$ се получава йон, който се дължи на загуба на въглехидратни единици. Резултатите от фрагментирането бяха сравнявани с тези от фрагментацията на стандарти рутин, хиперозид и изокверцетин (**Таблица 2**). В ESI-MS спектъра се наблюдава молекулния йон на рутин $[M-H]^-$ с m/z 609. При фрагментирането му се получава йон с m/z 301 ($[M-H-146-162]^-$), което е свързано със загуба на дизахарида рутиноза (308 Da). Освен това регистрирахме и йон с m/z 463, който при фрагментирането му води до образуване също на йон с m/z 301, но в този случай се губи една въглехидратна единица от 162 Da (глюкоза, галактоза). Сравнявайки данните с тези от масспектрите на стандартите в пробите от огниче установихме наличието на изокверцетин и хиперозид (**Таблица 2**). ESI-MS/MS експериментът и фрагментирането на йон 301 показа образуването на йони с m/z 179 [$^{1.2}$ A⁻], m/z 151 [$^{1.2}$ A⁻-CO] и m/z 107 [$^{1.2}$ A⁻-CO-CO₂], които са характеристични за агликона кверцетин (**Таблица 2**).

Таблица 2. Хроматографски и спектрални характеристики на идентифицираните гликозиди и полиметоксилирани флавони синенсетин и нобилетин.

ИМЕ	t _{R,} min HPLC-PDA	t _R , min UHPLC-MS/MS	$\lambda_{\rm nm}$	[M–H] [–]	MS/MS
Рутин	12.8	13.8	256, 268, 352	609	301, 271, 255, 243, 179, 151, 107
Хиперозид	12.8	14.22	256, 267, 355	463	301, 300, 271, 255, 243, 179, 151, 107
Изокверцетин	13.4	14.31	256, 267, 355	463	301, 300, 271, 255, 243, 179, 151, 107
Синенсетин	20.5	26.86	222 222	371	356, 311, 297, 283, 255, 239, 227, 183, 163
Нобилетин	39.3	27.15	275, 552	401	386, 371, 343, 313, 298, 285, 271

Другите пикове от хроматограмата бяха сравнявани с ESI-MS/MS спектъра на рутин при което установихме, че в етилацетатната фракция се съдържат основно гликозиди на кверцетина с *m/z* 595, 709, 751, 793, 841, 853, 883 и 925.

От направените изследвания за структурно характеризиране на полифенолите в *C. botrys* следват следните изводи:

 полифенолният състав на огниче се характеризира основно с наличието на метоксилирани флавони, от които непетин, хиспидулин, яцеозидин и еупатилин са от групата на 6-метоксифлавони, както и полиметоксилираните флавони синенсетин и нобилетин;

- в огниче бяха идентифицирани само кверцетинови гликозиди -рутин, хиперозид и изокверцетин;
- за първи път е представен механизъм на фрагментация на 6метоксифлавони в условията на ESI-MS/MS в позитивен режим на йонизация.

4.2.2 Идентификация на полифеноли във видове мента

4.2.2.1 Характеризиране на флавоноидни гликозиди във видове мента

масспектрите флавоноидни От на гликозиди получени чрез тандем масспектрометрия, можем да извлечем информация за молекулния йон, структурата на агликона, за ацилиране на въглехидратни хидроксилни групи, метилиране или сулфатизация на агликонови хидроксилни групи и вида на въглехидратните пръстени. В настоящето изследване за идентифициране на флавоноидните гликозиди приложихме йонизация в негативен режим като варирахме два параметъра – колизационната енергия и колизия на индуцираната дисоциация (CID). Оптимизирането на тези параметри дава възможност да се определи структурата на агликона и видът на гликозида. В трите вида мента идентифицирахме гликозиди на лутеолин, апигенин, ериодиктиол и хесперетин (Фиг. 16).



Фиг. 16. Структура на идентифицирани флаванон- и флавон-О-гликозиди



Фиг. 17. Общ йонен ток (TIC) на флавоноидни гликозиди и фенолни киселини в *Mentha citrata*, установени в етилацетатната фракция.

Фрагментирането на *О*-гликозидите при ниска колизационна енергия е свързано с разкъсване на гликозидната връзка и загуба на 146 Da и 162 Da, които отговарят съответно на хексозите рамноза и глюкоза. В условията на CID експеримента допълнително се разкъсва и въглехидратната единица със загуба на 120 Da. Получените фрагменти доказват, че агликонът е свързан с дизахарида рутиноза. UV спектрите на гликозидите, получени чрез HPLC-PDA съвпадат с UV спектрите на самите агликони. На **Фигура 18** са представени масспектрите на идентифицираните флавоноид-7-О-гликозиди.



Фиг. 18. Масспектъри на флавоноид-7-*О*-гликозиди получени от депротонирания йон [M–H][–] чрез ESI-MS/MS експеримент.

Таблица 3. Време на задържане, молекулен йон, фрагментни йони (UHPLC- MS/MS) и λ max (HPLC-PDA) на флавоноид-гликозиди и фенолни киселини, установени в етилацетатната фракция от *Mentha* spp. MP-*M. piperita*, MC-*M. citrata*, MS-*M. suaveolens*.

t _R	Съединения	UV, nm	[M-H] ⁻	ESI-MS/MS	MP	MC	MS
11.65	Ериоцитрин	284	595	329, 287, 151, 135, 125, 107	+	+	+
11.75	Лутеолин-7-О-рутинозид	254, 267, 348	593	447, 327,285, 151, 133, 107	+	+	+
12.15	Лутеолин-7-О-глюкозид	254, 348	447	327, 285, 256, 217, 199, 175, 151, 133, 107	+	+	+
13.34 14.20	Апигенин-7-О-рутинозид Хесперидин	267, 338 285, 340	577 609	269, 225, 197, 175, 159, 151, 117, 107 341, 301, 286, 258, 242, 227, 215, 199, 164,	+	+	+
	1			151, 134, 125, 107	+	+	-
13.45	4,5-диКХК	329	549	191, 179, 173, 161, 146, 135	-	-	+
14.54	Розмаринова киселина	329	359	197, 180, 179, 161, 135, 133, 123, 109, 107	+	+	+
14.95	Литосперминова киселин	327	537	357,197, 179, 161, 135, 133, 123, 109	-	+	+
15.05	Лутеолин-О-глюкозид-О-глюкоронид		623	447, 285, 241, 217, 199, 175, 151, 133	-	+	+

Пик 1 с t_R 11.65 min (Фиг. 17, 18, Таблица 3) беше идентифициран като ериоцитрин (ериодиктиол-7-*O*-рутинозид) (λ max 284 nm). При MS/MS експеримента молекулният йон *m/z* 595 се фрагментира на характерни йони *m/z* 287, *m/z* 151, *m/z* 135, *m/z* 125 и *m/z* 107, които съответно отговарят на следните фрагменти Y₀,([M–H–146–162][–]), ^{1.3}A[–], ^{1.3}B[–], ^{1.4}A[–] и [^{1.3}A-CO₂][–]. Пикове 2, 3 и 8 (Фиг. 17, 18, Таблица 3) с UV данни 254, 267, 348 nm бяха идентифицирани като производни на агликона лутеолин. Фрагментирането на молекулните йони с *m/z* 593, *m/z* 447 и *m/z* 623 показа един и същ агликон с *m/z* 285. При ESI-MS/MS експеримента на йон с *m/z* 107 ([^{1.3}A-CO₂][–]). Пик 4

(Фиг. 17, 18, Таблица 3) беше идентифициран като апигенин-7-*O*-рутинозид (λ max 267, 338 nm). При ESI-MS/MS експеримента молекулният йон *m/z* 577 се фрагментира на характерни йони *m/z* 269, *m/z* 151, *m/z* 117 и *m/z* 107, които съответно отговарят на фрагментните йони *Y*₀([M–H–146–162][¬]), ^{1.3}A[¬], ^{1.3}B[¬] и [^{1.3}A-CO₂][¬]. Пик 5 с t_R 14,20 min (Фиг. 17, 18, Таблица 3) показа молекулен йон *m/z* 609 и λ max 285 nm, 340 nm. При ESI-MS/MS експеримента молекулният йон се фрагментира на йони с *m/z* 301 ([M–H–146–162][¬]), *m/z* 164 (-CH₃ ^{1.4}B[¬]), *m/z* 151 (^{1.3}A[¬]), *m/z* 134 (-CH₃ ^{1.3}B[¬]) и *m/z* 107 ([^{1.3}A-CO₂][¬]), характерни за монометоксифлаванона хесперетин. От това следва, че молекулен йон с *m/z* 609 е хеспередин (хесперетин-7-*O*-рутинозид), сравнен със стандарт.

4.2.2.2 Характеризиране на фенолни киселини във видове мента

В трите вида мента беше идентифицирана розмаринова, в *M. citrata* и *M. suaveolens* беше идентифицирана литосперминова киселина (**Фиг. 19**). Фрагментирането на фенолните киселини се осъществява първоначално с разкъсването на естерната връзка.



Фиг. 19. Розмаринова киселина (А), Литосперминова киселина (В)



Фиг. 20. Масспектри на фенолни киселини идентифицирани в *Mentha* spp. при негативен режим на йонизация

При ESI-MS/MS експеримента на розмариновата и литосперминовата киселини се регистрират два йона на хидроксидехидрокафеена киселина и кафеена киселина съответно с m/z 197 и m/z 179 (**Фиг. 20**). При ESI-MS/MS кафеената киселина допълнително се фрагментира със загуба на неутрални молекули H₂O (m/z 161) и CO₂ (m/z 135) (**Фиг. 20**). Освен това получените продуктни йони систематично претърпяват загуба на CO и C₂H₂. Получените продуктни йоните с m/z 179, m/z 161, m/z 135, m/z 133 са характерни за наличието на кафеена киселина.

От групата на кафеоилхиновите киселини установихме наличието на 4,5-OдиКХК, която идентифицирахме в *M. suaveolens*. Характеристични йони за наличието на кафеоилхинова киселина са йоните с m/z 191 и m/z 173. Молекулният йон с m/z 191 отговаря на хиновата киселина. В условията на ESI-MS/MS експеримента той губи молекула вода до продуктен йон с m/z 173 (**Фиг. 20**).

4.2.2.3 Характеризиране на агликони във видове мента

В хлороформената фракция от трите вида мента бяха изолирани метоксилирани и неметоксилирани флавони и флаванони. На **Фиг. 21** е представен агликоновият профил на хлороформена фракция получена от *M. citrata*. На **Схема 3** са представени възможни пътища на ретро-циклизация на пръстен С съответно за флаванони и флавони.



Схема 3. Номенклатура за ретро-циклизация на пръстен С с йонизация в негативен режим чрез ESI-MS/MS на флаванони (А) и флавони (В).



Фиг. 21. Total ionic current (TIC) на хлороформена фракция от *M. citrata* изследвана чрез UHPLC-MS/MS

Характерните йони, които се получават при MS/MS експеримента на флавони и флаванони са описани в **схема 3**. Фрагментните йони с m/z 151, m/z 133 за лутеолин, m/z 117 за апигенин, m/z 135 за ериодиктиол и m/z 132 за диосметин отговарят съответно на фрагментите ^{1.3}A⁻, ^{1.3}B⁻ и -CH₃ ^{1.3}B⁻, които се образуват вследствие на ретро- Дилс-Алдер циклизация на пръстен С. Полученият фрагментен йон m/z 151 губи неутрална молекула CO₂ и води до образуването на йон с m/z 107 ([^{1.3}A–CO₂]⁻) (**Фиг 22**).



Фиг 22. Масспектри на флавоните лутеолин, апигенин и диосметин, идентифицирани в *Mentha* spp.

Йонът с m/z 149 е характеристичен само за апигенина, отговарящ на фрагмент [^{1.4}B + 2H]⁻. Освен това следва отцепване на CO, което води до образуването на фрагмент [^{1.4}B + 2H–CO]⁻ с m/z 121 (**Фиг 22**). Като цяло при фрагментирането на флавоните лутеолин и апигенин се отцепват и неутрални молекули като CO ([M–H–CO]⁻) и CO₂ ([M–H–CO₂]⁻) от пръстен C (**Фиг 22**). Също така от пръстен C се отцепва и C₂H₂O т.е 2/4 разцепване на пръстен C и се образува [M–H–C₂H₂O]⁻. Фрагментът [M–H–C₃O₂]⁻ е свързан с отцепването на 68 Da, който претърпява допълнителна загуба на 42 Da (C₂H₂O) и води до образуването на резултатния фрагментен йон [M–H–C₃O₂–C₂H₂O]⁻.

Диосметинът е монометоксифлавон и първоначално при фрагментирането се образува йон с m/z 284, което се дължи на загуба на метилов радикал (Схема 4, Фиг. 22). Същият фрагментен йон [M–H–CH₃]⁻ губи неутрална молекула СО и с това се обяснява образуването на йон с m/z 256, който е с висок интензитет (Схема 4, Фиг. 22). Йонът m/z 256 е прекурсор за образуването на резултатните йони m/z 227 и m/z 199, което се дължи на последователно отцепване на неутрална молекула СО. При разкъсването на пръстен С, фрагментните йони ${}^{1.3}$ A⁻ и -CH₃ ${}^{1.3}$ B⁻ са вследствие на ретро-Дилс-Алдер циклизацията на диосметин (Схема 4). Полученият фрагмент ${}^{1.3}$ A⁻ претърпява загуба на CO₂, което води до образуване на йон с m/z 107 ([${}^{1.3}$ A-CO₂]⁻).



Схема 4. Схема за фрагментиране на депротонирания йон [М–Н] на диосметин.

При флаваноните резултатните йони, образувани при рзцепване на пръстен C са ^{1.3}A⁻, ^{1.3}B⁻, $-CH_3$ ^{1.3}B⁻, $-CH_3$ ^{1.4}B⁻ и ^{1.4}A⁻. Фрагментите ^{1.3}A⁻ и $-CH_3$ ^{1.4}B⁻ претърпяват допълнително фрагментиране с отделяне на CO₂ и CO, което води до образуването съответно на йоните [^{1.3}A-CO₂]⁻ и [-CH₃ ^{1.4}B-CO]⁻ (**Фиг. 23**).

Различието между флаваноните ериодиктиол и хесперетин, е че ериодиктиолът не претърпява допълнително фрагментиране. Хесперетинът е монометоксифлаванон и при MS/MS есперимента губи метилов радикал (15 Da) и CH₄, като се образуват йоните

съответно с m/z 286 [M-H-CH₃]⁻ и m/z 285 [M-CH₄]⁻ (**Фиг. 23, Схема 5**). Йонът [M-H-CH₃]⁻ последователно губи неутрални молекули H₂O, CO и CO₂, което води до получаване на резултатните йони [M-H-CH₃-H₂O]⁻, [M-H-CH₃-CO]⁻ и [M-H-CH₃-CO₂]⁻. Неутрална молекула C₂H₂O се губи и от молекулният йон [M–H]⁻, което е свързано с разцепване на пръстен С т.е 2/4 фрагментиране и следва нова циклизация с пръстен В. Това води до образуването на изомерни йони [M–H–C₂H₂O]⁻ с m/z 259, които систематично губят неутрални молекули като CO₂ и CH₄ (**Схема 5**).



Фиг 23. Масспектри на флаваноните ериодиктиол и хесперетин, съдържащи се в *Mentha* spp.



Схема 5. Схема за фрагментиране на депротонирания йон [М–Н] на хесперетин.

Полиметоксилираните флавони бяха изследвани чрез йонизация в позитивен режим. При ретроциклизация на пръстен С и от фрагментите A и B се определя броя на –OH и –OCH₃ групи в молекулата. От RDA фрагменти ^{1.3}A⁺ се губят метилови групи и CO (**Схема 6**). Данните от масспектралното изследване на полиметоксилирани флавони са представени на **Таблица 4**. Идентификацията на полиметоксифлавони беше направена чрез сравняване на MS/MS и UV спектрални данни с литературата. Флавоните тимузин и тимонин са от групата на 5,6-дихидрокси-7,8-диметокси флавони. Резултатите от ESI-MS/MS експеримента потвърждават наличието на тези съединения.



Схема 6. Различни пътища за фрагментация при полиметоксилирани флавони

Фрагментният йон с m/z 213 (^{1.3}A⁺) получен вследствие на ретро-Дилс-Алдер циклизацията на пръстен С показва наличието на две хидроксилни и две метокси групи. Същият йон систематично губи неутрални молекули и метилов радикал, което води до образуването на йони с m/z 197 (^{1.3}A⁺ - CH₄), m/z 182 (^{1.3}A⁺ - CH₄ - CH₃*****), m/z 170 (^{1.3}A⁺ - CH₄ - CO) за тимузин и йони с m/z 198 (^{1.3}A⁺ - CH₃*****), m/z 185 (^{1.3}A⁺ - CO) за тимонин. Фрагментните йони с m/z 121 (^{1.3}B⁺) и с m/z 163 (^{0.4}B⁺) показват наличието на една хидроксилна група в пръстен В за тимузин. Йон с m/z 151 (^{1.3}B⁺) доказва една хидроксилна и една метокси група в пръстен В за тимонин.

Таблица 4. Хроматографски и спектрални данни на полиметоксилирани флавони, съдържащи се в хлороформената фракция, изолирани от *Mentha* spp.

t _R	Флавони	[M+Na] ⁺	$[M+H]^+$	MS/MS	MP	MC	MS
19.58	Тимузин	353	331	331, 316, 301, 298, 213, 197, 182, 170, 163, 121	+	+	+
20.30	Тимонин	383	361	361, 346, 331, 328, 313, 303, 256, 213, 198, 185, 151	+	+	+
22.35	Сидеритофлавон	383	361	361, 346, 331, 328, 313, 303, 300, 227, 179, 161, 137	+	+	+
23.94	Ладанеин	337	315	315, 300, 272, 183	-	+	-
24.62	Ксантомикрол	367	345	367, 345, 330, 315, 312, 297, 284, 227, 213, 198, 121	-	+	-

Флавоните сидеритофлавон и ксантомикрол са от групата на 5-хидрокси-6,7,8триметокси флавони. Резултатният йон от 1/3 разкъсването на пръстен С с m/z 227 ($^{1.3}$ A⁺) показва наличието на една хидроксилна и три метокси групи. Фрагментните йони с m/z 121 ($^{1.3}$ B⁺) и йоните с m/z 179 ($^{0.4}$ B⁺), m/z 161 ($^{0.4}$ B⁺ - H₂O), m/z 137 ($^{1.3}$ B⁺) съответно показват наличието на една хидроксилна група в пръстен В за ксантомикрол и две хидроксилни групи за сидеритофлавон. Освен това фрагментният йон $^{1.3}$ A⁺ при MS/MS експеримента при ксантомикрол последователно губи метилови радикали и образува йони с m/z 213 ($^{1.3}A^+$ - CH₃[•]), m/z 198 ($^{1.3}A^+$ - 2CH₃[•]) и m/z 183 ($^{1.3}A^+$ - 3CH₃[•]).

Диметоксифлавонът ладанеин се отнася към групата на 5,6-дихидрокси-7метокси флавони. ESI-MS/MS експериментът доказва наличието на заместителите с резултатния йон с m/z 183 ($^{1.3}$ A⁺).

Масспектралното изследване показва:

- фенолният състав в култивираните в България, неизследвани видове *Mentha* spp. е разнообразен;
- и в трите вида мента бяха идентифицирани розмаринова киселина, ериоцитрин, лутеолинови и апигенинови гликозиди, от агликоните флаванона ериодиктиол и от флавоните (метоксилирани и неметоксилирани) лутеолин, апигенин, тимузин, тимонин, сидеритофлавон. В *М. citrata* допълнително са идентифицирани агликоните хесперетин, диосметин, ксантомикрол и ладанеин, които не бяха регистрирани в *М. piperita* и *М. suaveolens*.
- в *M. suaveolens* не беше идентифициран хесперидин;
- за първи път е представен механизъм на фрагментация за хесперетин и диосметин в условията на ESI-MS/MS в негативен режим.

4.2.3 Идентификация на полифеноли в Achillea millefolium

Хроматографският профил получен, чрез UHPLC-MS/MS показва, че подвижната фаза е подходяща за разделяне на изомери и близки по полярност фенолни съединения (Фиг. 24, 25). С MS/MS експеримента бяха идентифицирани 14 фенолни съединения, представители на КХК (Схема 7), гликозиди на кверцетин, лутеолин и апигенин и ферулоилхинова киселина и нейни производни. Резултатите от проучването на компонентите, съдържащи се в етилацетатната фракция изолирани от *Achillea millefolium* са представени в Таблица 5.

Таблица 5. UV (HPLC-PDA) и масспектрални данни (UHPLC-MS/MS) на гликозиди и фенолни киселини, съдържащи се в етилацетатната фракция, изолирани от *A*. *asplenifolia* 9602

N⁰	Съединения	$\lambda_{ m max}$	[M-H] ⁻	MS/MS
1	Неохлорогенова киселина	327	353	191, 179, 173, 161, 135, 133
2	Хлорогенова киселина	327	353	191, 179, 173, 161, 135, 133
3	4-О-кафеоилхинова киселина	327	353	191, 179, 173, 161, 135, 133
4	Кверцетин-О-гликозид	282, 345	463	301, 271, 179, 151, 121, 107
5	Ферулоилхинова киселина		367	367, 193, 191, 179, 174, 161, 146, 135
6	Рутин	256, 268, 352	609	301, 271, 255, 243, 179, 151, 107
7	Лутеолин-7-О-глюкозид	254, 348	447	285, 241, 217, 199, 175, 151, 133, 107
8	3.5-О-диКХК	329	515	353, 191, 179, 161, 135
9	Апигенин-7-О-глюкозид	267, 337	431	269, 151, 149, 117, 107
10	4.5-О-диКХК	329	515	353, 191, 179, 161, 135
11	Апигенин-О-ацетилгликозид	267, 340	473	269, 240, 211, 151, 149, 117, 107
12	Ферулоилхинова киселина-О-гликозид		529	529, 367, 191, 179, 161, 135
13	Ферулоилхинова киселина-О-гликозид		529	529, 367, 191, 179, 161, 135
14	Апигенин-О-ацетилгликозид	267, 340	473	269, 240, 211, 151, 149, 117, 107



Фиг. 24. Total ionic current (TIC) на етилацетатна фракция от *A. asplenifolia* 9602 изследвана чрез UHPLC-MS.



Фиг. 25. Total ionic current (TIC) на хлороформена фракция от *A. asplenifolia* 9602 изследвана чрез UHPLC-MS.







1. Кафеена киселина

2. Ферулова киселина

Схема 7. Структура на хлорогеновите киселини

4-*O*-КХК (Схема 7) е идентифицирана чрез "дехидратиран" йон с m/z 173, получен при MS/MS експеримента като основен пик. Докато при фрагментирането на хлорогенова к-на се получава основен йон с m/z 191 и при MS³ основният йон е с m/z 85. Основният йон от фрагментирането на молекулния йон 367 е с m/z 191, според който се идентифицира 5-*O*-ферулоилхинова киселина.



Фиг. 26. Масспектри на диКХК, съдържащи се в Achillea millefolium.

В етилацетатната фракция бяха изолирани диКХК - 3,5-*O*-диКХК и 4,5-*O*-диКХК с m/z 515 (Схема 7). Интензитетът на характеристичните фрагментни йони зависи от позицията на кафеената киселина в пръстена на хиновата киселина. При MS/MS експеримента на диКХК първоначално се губи кафеена киселина в рзултат на което се получава интензивен йон с m/z 353. Фрагментацията на 4,5-*O*-диКХК дава основен фрагментен йон с m/z 173 (**Фиг. 26**). Този йон е характерен за изомерите на *vic*-диКХК, при които субституцията е на 4 позиция (Схема 7). Основният йон от фрагментирането на 3,5-*O*-диКХК е с m/z 191.



Фиг. 27. Масспектри на ферулоилхинови киселини-*О*-гликозиди, установени в етилацетатната фракция от *Achillea millefolium*.

Освен изомери на диКХК идентифицирахме и изомери на *O*-гликозиди на ферулоилхиновата киселина с m/z 529 и апигенин-*O*-ацетилгликозиди с m/z 473. Пик 12 и 13 (Фиг. 24, Таблица 5) показаха молекулен йон с m/z 529. От маспектъра и фрагментните йони установихме, че са изомери на *O*-гликозиди на ферулоилхиновата киселина. При MS/MS експеримента молекулните йони с m/z 529 губят 162 Da. Полученият йон 367 отговаря на ферулоилхинова киселина, който е прекурсор на поучените продуктни йони с m/z 193 ([Feruloyl–H]⁻), m/z 191 ([Quinic–H]⁻) m/z 179 ([Caffeoyl–H]⁻), m/z 161 ([Caffeoyl–H–H₂O]⁻), и m/z 135 ([Caffeoyl–H–CO₂]⁻) (Фиг. 27). Йонът 193 е с нисък интензитет, което се обяснява с факта, че с фрагментирането на ферулоилхинова киселина директно се губи и метилова група.



Фиг. 38. Масспектри на апигенин-*О*-ацетилгликозиди, установени в етилацетатната фракция от *Achillea millefolium*.

Пик 11 и 14 (Фиг. 24, Таблица 5) с идентични молекулни йони бяха идентифицирани като апигенин-*O*-ацетилгликозиди (λ max 267, 340). При MS/MS експеримента молекулният йон *m/z* 473 губи фрагмент C₂H₂O. Полученият продуктен йон с *m/z* 431, който отговаря на апигенин-*O*-гликозид се фрагментира до фрагментен йон ^{0.2}X₀ ([M–H–42–120][–]) с *m/z* 311 (Фиг. 28). Освен това се получават характерни йони за агликона апигенин с *m/z* 269 ([M–H–42–162][–]), *m/z* 151 (^{1.3}A[–],), *m/z* 117 (^{1.3}B[–]) и *m/z* 107 ([^{1.3}A-CO₂][–]).

В резултат на направения масспектрален анализ на видовете Achillea millefolium идентифицирахме моно- и ди-КХК, апигенин-7-*О*-глюкозид, лутеолин-7-*О*-глюкозид, агликоните апигенин, лутеолин и диосметин. Освен тях идентифицирахме и изомерите на *О*-гликозиди на ферулоилхиновата киселина и апигенин-*О*-ацетилгликозиди, което не беше възможно с помощта на HPLC-PDA. От този анализ установихме, че кверцетин не се съдържа в изследваните проби бял равнец. Гликозидът рутин беше идентифициран само в пробите *A. asplenifolia*.

4.3 GC-FID-MS анализ на етерично масло

4.3.1 Състав на етеричното масло от огниче

Резултатите от анализа на етеричното масло от огниче са представени в **Таблица 6 и Фиг. 29**. Добивът на етеричното масло от огниче варира от 0,6 до 1,3%, (**Таблица 6**). С най-висок добив на етеричното масло от огниче е получено от районите Устина и Рогош.

	С. botrys от различни райони и реколти, %						
Ш-11 Ш-12 К-12 Кр-12 Пт-13 У-13						У-13	P-13
Общ брой компоненти	54	53	53	53	53	53	53
Общ брой идентифицирани, %	91,24	91,32	86,24	100,01	88,9	90,17	90,11
Монотерпени, %	2,02	0,94	2,85	8,49	0,14	0,52	9,36
Кислородсъдържащи монотерпени,%	2,65	1,25	2,03	7,11	0,77	1,17	2,84
Сескитерпени, %	5,4	4,3	6,97	15,33	5,26	6,58	6,22
Кислородсъдържащи сескитерпени, %	81,17	84,83	74,39	69,08	82,73	81,9	71,69

Таблица 6. Съдържание на общ брой компоненти, добив [% V/W].

В етеричното масло от огниче от с. Шипка -2011 год. (Ш-11) идентифицирахме общо 54 съединения, които представляват 91,24 % от общия състав. Във всички проби от реколти 2012 и 2013 год. - Шипка (Ш-12), Калояново (К-12), Кричим (Кр-12), Устина (У-13), Рогош (Р-13) и Пловдив (Пт-13) идентифицирахме 53 съединения, които съставляват 86,24-100 % от общия състав на етеричното масло.

Етеричното масло е богато на кислородсъдържащи сескитерпени съставляващи 69,08-84,83 % от общия състав на маслото (**Таблица 6**). Основните компоненти на етеричното масло от огниче са елемолацетат (14,01-26,32 %), елемол (10,89-18,15 %), α -еудезмол (7,49-17,84 %), еудезм-7(11)-ен-4 α -ол (3,58-11,49 %), α -еудезмол ацетат (5,28-6,90 %), α -хеноподиол (4,04-6,40 %), β -хеноподиол (2,45-4,38 %), α -хеноподиол-6-ацетат (2,11-5,72 %), γ -костол (1,00-4,76 %), β -Хеноподиол-6-ацетат (1,05-2,14 %), гермакрен А (1,02-5,54 %), β -елемен (1,20-5,09 %), β -кариофилен (1,27-4,70 %), γ -еудезмол (1,00-1,76 %), мирцен (1,65-8,49 %), p-Мент-1-ен-9-ол (7,11 % за Кр-12) (**Фиг. 29**). Структурите на основните идентифицирани компоненти в маслата от огниче са представени на **Фиг. 30**.



Фиг. 29. Основни компоненти на етеричното масло от огниче



Фиг. 30. 1-мирцен; 2-β-елемен; 3-β-карифилен; 4-гермакрен А; 5-елемол; 6-γ-еудезмол; 7-γ-костол; 8-α-еудезмол; 9-елемол ацетат; 10-еудезм-7(11)-4-ол; 11-α-еудезмол ацетат; 12-α-хеноподиол; 13-α-хеноподиол-6-ацетат; 14-β-хеноподиол; 15-β-хеноподиол-6-ацетат.

Данните за етеричното масло, получено от огниче за периода 2011-2013 година показват предимно количествени разлики.



Фиг. 31. Различия в съсдържанието на основни компоненти на етеричното масло от огниче от различни реколти

В състава на етеричното маслото от Кричим, Пловдив и Устина преобладава елемолацетат, докато в Шипка, Калояново и Рогош елемолацетат и а-еудезмолацетат са в близки количества (**Фиг. 31**).

4.3.2 Състав на етеричното масло от видове мента

Резултатите от анализа на етеричното масло от *M. piperita, M. citrata* и *M. suaveolens* са представени в Таблица 7.

Таблица 7. Съдържание на	а общ брой компонен	нти [%], добив [[% V/W] и съ	държание на
карвон [mg/100g билк	а] в <i>Mentha piperita</i> ,	Mentha citrata 1	и Mentha sua	veolens

	M. piperita	M. citrata	M. suaveolens
Общо идентифицирани, %	98,48	97,16	92,66
Брой съединения	52	39	50
Добив [%, v/w]	0,9	0,5	1,2
Монтерпени, %	2,35	4,02	15,25
Кислород-съдържащи монотерпени, %	81,14	72,86	64,48
Сескитерпени, %	11,92	9,49	8,95
Кислород-съдържащи сескитерпени,%	2,65	10,49	3,17
Карвон [mg/100g]	66.29 ± 0.03	10.53 ± 0.06	419.9 ± 0.3

Добивът на етеричното масло от "пеперминт" е 0,9 %. В състава на етеричното масло от *М. piperita* бяха идентифицирани 52 съединения, които представляват 98,48 % от общия състав на етеричното масло. Етеричното масло от *М. piperita* е богато на кислородсъдържащи монотерпени 81,14 %, следвано от сескитерпени с 11,92 % (**Таблица 7**). С най-ниско съдържание са кислородсъдържащите сескитерпени и монотерпените, съответно с 2,65 % и 2,35 % (**Таблица 7**). Основните компоненти на етеричното масло изолирано от *М. piperita*, които съставляват 88.09 % от общия състав са ментол (20,55 %), β -линалол (17,19 %), ментон (16,8 %), карвон (8,23 %), гермакрен-D (4,05 %), 1,8-цинеол (3,98 %), β -кариофилен (3,95 %), ментил ацетат (3,74 %), изоментон (3,12 %), сабинен хидрат (2,03 %), неоментол (1,22 %), пиперитон (1,13 %), β -бурбонен (1,07 %), бициклогермакрен (1,03 %) (**Фиг. 32**). Останалите компоненти (29 съединения), съставляващи 10,29 % от общия състав са под 1 % и 8 съединения са под 0,1% т.е в следови количества.



Фиг. 32. Основни компоненти на етеричното масло от *Mentha piperita*

В етеричното масло от *Mentha piperita* установихме високо съдържание на линалол (17,19 %). Терпеноида карвон също е един от основните компоненти в етерично масло (8,23 %) не е характерен за състава на етеричното масло от *Mentha piperita*.

Добивът на етерично масло от *M. citrata* е 0,5 % (Таблица 7).

В състава на етеричното масло бяха идентифицирани 39 съединения, които съставляват 97,16 % от общия състав на етеричното масло, което също е богато на кислородсъдържащи монотерпени 72,86 % (**Таблица 7**). Основните компоненти, които съставляват 93,29 % от общия състав на етеричното масло от *M. citrata* са β -линалол (39,15 %), линалил ацетат (18,64 %) α -терпинеол (7,95 %), β -кариофилен (4,99 %), виридифлорол (4,57 %), геранил ацетат (3,4 %), гермакрен-D (2,46 %), карвон (2,29), 1,8-цинеол (2,03 %), нерол ацетат (1,82 %), β -мирцен (1,35 %), нерол (1,34 %), β -оцимен (1,3 %), *транс*-пренил лимонен (1,25 %) (**Фиг. 33**). Останалите компоненти (15 съединения), съставляващи 3,77 % от общия състав са под 1 %.



Фиг. 33. Основни компоненти на етеричното масло от Mentha citrata



Фиг. 34. Основни компоненти на етеричното масло от *Mentha suaveolens*

Добивът на етерично масло от *M. suaveolens* е 1,2 % (Таблица 7).

При установените условия на разделяне на компонентите на етеричното масло хроматографският анализ позволи идентифицирането на петдесет съединения, които представляват 92,66% от общия химичен състав на етеричното масло от *M. suaveolens* (**Таблица 7**). Етеричното масло е богато на кислородсъдържащи монотерпени 64,48 % (**Таблица 7**). Значително е съдържанието на сескитерпени 8,95 % в етеричното масло от *M. suaveolens*, докато на кислород-съдържащите сескитерпени е по-малко 3,17 %.

Карвон е основният кислородсъдържащ монотерпен в етеричното масло на M. suaveolens (40.32 %), последван от D-лимонен (13,12 %), линалил ацетат (8,04 %), mpanc-карвеол (7,18 %), цис-дихидрикарвон (3,02 %), β -кариофилен (2,25 %), β бурбонен (2,24 %), гермакрен-D (2,02 %), пиперитон (1,35 %), β -линалол (1,17 %), виридифлорол (1,16 %), β -пинен (1,05 %). Те съставляват 84,81 % от общия състав на маслото (**Фиг. 34**). В *M. suaveolens* количествено определихме съдържанието на карвон 419,9 mg/100 гр билка (**Таблица 7**). Очевидно е, че от това проучване следва да заключим, че изследваната *M. suaveolens* се отнася към хемотип с най-високо съдържание на карвон.

В етеричните масла от трите вида мента идентифицирахме общо 74 съединения (Таблица 7). При *M. suaveolens* получихме най-висок добив на етерично масло 1,2 %. Добивът на етеричното масло от *M. piperita* и *M. citrata* е по-малко от 1,0 %. Само четири компоненти (β -линалол, карвон, β -кариофилен и гермакрен D) бяха регистрирани в забележими количества (> 1 %) в етеричните масла от трите вида мента. Значително количество карвон установихме и в етеричното масло на *M. piperita* (8.23 %) и 2,29 % в *M. citrata*.

От направеното изследване на етеричното масло от огниче и видове мента можем да направим следните изводи:

- за първи път е изследван състава на етеричното масло от диворастящо огниче в България;
- за първи път в състава на маслото е идентифициран у-костол;
- кислородсъдържащите сескитерпени елемол, елемолацетат, α-еудезмол и еудезм-7(11)-ен-4α-ол са основните компоненти на етеричното масло от диворастящо огниче;
- за първи път е изследван състава на етеричното масло от *M. suaveolens* и *M. citrata*, култивирани в България;
- *M. suaveolens* e богата на карвон;
- в състава на маслото от *M. piperita* са установени значителни количества нетипични за нея компоненти линалол и карвон.

5 ОБОБЩЕНИ РЕЗУЛТАТИ

- 1. Разработени са хроматографски профили "пръстов отпечатък" на полифеноли в огниче, мента и бял равнец чрез HPLC-PDA с обратна фаза на нехидролизирани екстракти;
- За първи път нагледно е представено разпределението на основните компоненти на полифенолния комплекс в изследваните медицински растения;
- 3. Метоксилирани флавони (95% от общото съдържание), главно хиспидулин, са основните компоненти на полифенолния комплекс в огниче;
- 4. В огничето установихме само кверцетинови гликозиди;

- 5. За първи път е представен механизъм на фрагментация на 6-метоксифлавони в условията на ESI-MS/MS в позитивен режим;
- 6. Гликозиди на ериодиктиол, апигенин и лутеолин, както и розмаринова киселина са основните компоненти (над 90 %) на полифенолния комплекс в трите вида мента;
- 7. С най-високо съдържание на лутеолинови гликозиди (6.52 mg.g-1 DM), хесперидин (1.53 mg.g-1 DM) и розмаринова киселина (4.22 mg.g-1 DM) се отличава *M. citrata*;
- 8. За първи път е представен механизъм на фрагментация за хесперетин и диосметин в условията на ESI-MS/MS в негативен режим.
- 9. Моно- и ди- КХК са основни компоненти в белия равнец с над 70% от общото съдържание на полифеноли;
- 10. *А. asplenifolia* съдържа рутин, докато той не се регистрира в *А. collina* и *cv. Proa*;
- За първи път е изследван състава на етеричното масло от диворастящо огниче в България като кислородсъдържащите сескитерпени елемол, елемолацетат, α-еудезмол и еудезм-7(11)-ен-4α-ол са основните компоненти;
- 12. За първи път в състава на маслото е идентифициран у-костол;
- 13. За първи път е установен състава на етеричното масло от *M. suaveolens* и *M. citrata*, култивирани в България и е определено, че основния компонент на маслото от *M. suaveolens* е карвон.

6 ПРИНОСИ

- **1.** Установен е методологичен подход за изследване на полифеноли чрез HPLC-PDA и UHPLC-MS/MS;
- **2.** Предложен е механизъм за фрагментация на 6-метоксифлавони, хесперетин и диосметин в условията на ESI-MS/MS;
- **3.** Изяснен е състава на полифенолния комплекс на диворастящо огниче, което до този момент не е бил обект на изследване в България;
- Установен е състава на етеричното масло от диворастящо огниче в България и за първи път у-костол е идентифициран в състава на етеричното масло;
- **5.** За първи път е установен състава на етеричното масло от *M. suaveolens* и *M. citrata*, култивирани в България

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ

 Dagnon, S., Ivanov, I., <u>Bojilov, D</u>., Docheva, M., Statkova, S. (2013). Evaluation of the Main Polyphenolic Compounds in Aromatic Plants of Asteraceae and Solanaceae Families of Bulgarian Origin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), 76–84.

Цитирана от:

- Pilard, S., Attoumbr, J., Hassan-abdallah, A., Cailleu, D., Wadouachi, A., Baltora-rosset, S. (2014). 5-O-Caffeoylshikimic acid *from Solanum somalense* leaves : Advantage of centrifugal partition chromatography over conventional column chromatography. J. Sep. Sci., 37, 2331–2339. (IF = 2.741)
- 2. Saxena, H. O., Maolankar, S., Madave, R., Soni, A., Gupta, R. (2015). Quantification of phenolic acids in fruits of *Solanum xanthocarpum* from three agroclimatic regions of Madhya Pradesh using HPLC. *Indian J. Trop. Biodiv.*, 23(1), 46–52.
- <u>Bojilov, D</u>., Dagnon, S., Ivanov, I. (2017). New insight into the flavonoid composition of *Chenopodium botrys. Phytochemistry Letters*, 20, 316-321. (IF = 1.418)
- Bojilov, D., Dagnon, S., Ivanov, I., (2017). Constituent composition of *Chenopodium botrys* essential oil. *Bulgarian Chemical Communications*, 49(Special Issue G), 124–129. (IF = 0.238)

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ

А. Участие в международни конференции

- Dimitar Bojilov, Soleya Dagnon, Iliyan Ivanov, (2015), Characterization of methoxyflavonoids and flavonoid glycosides in *Chenopodium botrys* by HPLC-DAD and ORBITRAP UHPLC-MS. 2nd International Conference on Natural Products Utilization From Plants to Pharmacy Shelf, 14-17 October, Plovdiv, Bulgaria. (Постер)
- Bojilov D., Dagnon S., Ivanov I., (2016), LC approach for identification and quantification of polyphenols in medicinal plants. 10th International Symposium On Chromatogrphy Of Natural Products The Application Of Analytical Methods For The Development Of Natural Products. June 6-9, Lublin, Poland. (Постер)

В. Участие в Български конференции

- Edreva A., Vitkova A., Gesheva E., Dagnon S., Konakchiev A., Bojilov D., (2014). Fieldcultivated medicinal plants of *Achillea millefolium* group: a reach source of bioactive compounds. *Scientific Conference Plant Physiology and genetics Achievements and Challenges*. 24-26 September. Sofia, Bulgaria. (Постер)
- 4. Д. Божилов, С. Даньо, Ил. Иванов. (2014). Химичен състав на етеричното масло на *Chenopodium botrys* и класификация по местонахождение чрез метода за разпознаване на образи. Съюз на учените в България – Пловдив. Научна сесия с международно участие, посветена на 70-годишнината на съюза на учените в България. 31 Октомври, Пловдив, България. (Постер)
- 5. S. Dagnon, **D. Bojilov**, A. Ustichkov, K. Koev, I. Dincheva. (2014). Comparative characterization of essential oil and polyphenols in *Mentha piperita*, *Mentha citrata* and *Mentha suaveolens*. *Научна конференция* "Предизвикателства в химията. 21 22 Ноември, Пловдив, България. (Постер)
- 6. Данъо С., Д. Божилов, (2015), Изследване на полифенолния комплекс и прилагане на МРО за разграничаване на представители от вида бял равнец (Achillea millefolium L.) отгледани в България и Турция, Трета научна конференция за студенти и докторанти "Предизвикателства в химията", 26-27 Ноември, Пловдив, България. (Постер)
- Dimitar Bojilov, Soleya Dagnon, Koicho Koev, Iliyan Ivanov, (2016), Polyphenols in cultivated plants of *Mentha piperita*, *Mentha citrata* and *Mentha suaveolens*. 10CC, 9-11 Октомври, Пловдив, България. (Постер)
- 8. **D. Bojilov**, S. Dagnon, I. Ivanov, (**2016**), Composition of the essential oil from *Chenopodium botrys* L. *10CC*, 9-11 Октомври, Пловдив, България. (Постер)