



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ
КАТЕДРА „ОРГАНИЧЕН СИНТЕЗ И ГОРИВА”

инж. Ивайла Недялкова Динчева

АНАЛИЗ НА ФЕНОЛНИЯ СЪСТАВ И БИОЛОГИЧНА
АКТИВНОСТ ПРИ ДИВИ ЯГОДОПЛОДНИ ВИДОВЕ
ОТ РОД *VACCINIUM* L.

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”
по научна специалност 7.3 Фармация (Фармацевтична химия)

Научни ръководители: Проф. дхн инж. Владимир Божинов
Доц. д-р Виолета Кондакова

Научно жури:

1. Проф. дхн Владимир Божинов - председател
2. Чл. - кор. дтн Атанас Павлов - рецензент
3. Доц. д-р Анелия Маврова - рецензент
4. Проф. дсн Росица Бъчварова
5. Доц. д-р Иван Цветков

София, 2016

Дисертационният труд е написан на 207 страници, съдържа 38 фигури, 36 таблици и 78 приложения. Цитирани са 366 източника, от които 3 на кирилица.

Изследванията в настоящата дисертация са проведени в АгроБиоИнститут, The James Hutton Institute, Dundee, Scotland, Биологически Факултет на Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски”, Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Н. Пушкиров” и Институт по Микробиология „Акад. Стефан Ангелов”, БАН

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Органичен синтез и горива”, състояло се на 27.06.2016 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 28.10.2016 г. от 12 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересувашите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

На научните ми ръководители проф. дхн инж. Владимир Божинов и доц. Виолета Кондакова за възможността да бъда част от проектите (ФНИ № ДО02-334/20.12.2008 г., “Диворастящи ягодоплодни видове в България - ценен източник за човешкото здраве”) и (ЕЕА Grants, Norway Grants, № Д03-92/27.05.2015 г. „Генетично и фитохимично разнообразие на черна и червена боровинка с произход България и Норвегия и тяхната биологична активност във връзка с човешкото здраве”), които ми дадоха едни от най-ценните уроци, за тяхната всеотдайност и търпеливост.

На гл. ас. Илиян Баджаков за неговата подкрепа, приятелство, идеи и насърчаване, което ми помогна да преодолее трудностите, по време на това приключение “докторантура“.

На колегите Patricia Dobson, Gordon McDougall и Derek Stewart от The James Hutton Institute, Dundee, Scotland за съвместната ни работа при разработването на хроматографските методи.

На колегите prof. Rolf Nestby, NIBIO, Division for Food Production and Society Horticulture, Stjørdal, Norway и prof. Inger Martinussen, NIBIO, Division for Food Production and Society Horticulture, Tromsø, Norway за осигуряване на плодове от червена и черна боровинка от три естествени местообитания в Норвегия.

На проф. Иван Минков и гл. асистент Младен Найденов за топлия прием и предоставените ми условия за работа в катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология” към БФ на ПУ „Паисий Хилендарски.

На колегите от Институт по Микробиология „Акад. Стефан Ангелов”, БАН, които проявиха висок професионализъм, компетентност и акуратност при съвместната ни работа по антивирусните и антибактериалните изпитвания.

Не на последно място, изказвам искрени благодарности на моето семейство за разбирането и подкрепата в най-трудните моменти.



ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) - реактив за определяне на антирадикаловата активност

dw (dry weight) - сухо тегло

ESI (Electro - Spray Ionization) - електроспрей йонизация

Folin - Ciocalteu - реактив за определяне съдържанието на общи фенолни съединения по колориметричен метод

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) - желязо-редуцираща антиоксидантна сила

g (grams) - грамове

fw (fresh weight) - свежо тегло

GAE (Gallic acid equivalents) - еквиваленти галова киселина

GC-MS (Gas Chromatography - Mass spectrometry) газова хроматография - мас спектрометрия

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) - високоефективна течна хроматография

IC₅₀ (Concentration for 50% inhibition) - 50% инхибираща концентрация

LOD (Limit of Detection) - граница на откриване

LOQ (Limit of Quantification) - граница на количествено определяне

µg (micrograms) - микрограмаве

mg (milligrams) - милиграми

µL (microliters) - микролитри

mL (milliliters) - милилитри

[M-H] (Parent molecule less one hydrogen proton) - молекулна маса без един водороден протон

MS (Mass Spectrometry) - мас спектрометрия

MW (gram molecular weight) - молекулна маса

m/z (mass to charge ratio) - отношение маса - заряд

PDAD - (Photo-Diode Array Detector) - фотодиоден детектор

SD (Standard Deviation) - стандартно отклонение

TAC - (Total Antioxidant capacity) - обща антиоксидантен капацитет

TE (Trolox equivalents) - Тролокс еквиваленти

TPC - (Total Phenolic Content) - съдържание на общи фенолни съединения

TMA - (Total Monomeric Anthocyanins) - съдържание на общи мономерни антоциани

UV/VIS - поглъщане на ултравиолетови лъчи и видима светлина

ВЪВЕДЕНИЕ

„Природата е велика книга, открита за очите на всекиго!”

Жан-Жак Русо

Тя е неизчерпаем източник на уникални субстанции с разнообразна структура и биологична активност. Според оценка на Световната здравна организация 40 процента от използваните днес конвенционални лекарствени препарати са от растителен произход - неоспоримо доказателство за огромния потенциал на медицинските растения.

Лечебните свойства на боровинките са известни от антични времена. Многобройни съобщения през последните години потвърждават повишения интерес на водещи научни колективи от цял свят към качествата на дивите ягодоплодни видове, свързани с човешкото здраве.

Понастоящем червената и черна боровинка се отнасят към групата на функционалните храни, тъй като експерименталните проучвания доказват тяхното благоприятно въздействие върху отделни функции в организма, свързани с намаляване на риска от редица патологични състояния, включително социално-значимите рак, диабет, остеопороза. Освобождаването на големи количества свободни радикали в организма се свързва с редица дегенеративни заболявания на нервната система като болестта на Алцхаймер, Паркинсон, сърдечносъдова патология, атеросклероза. Антиоксидантите неутрализират действието на свободните радикали като взаимодействат с тях, в резултат на което понижават оксидативния стрес, поддържат функциите на клетките във физиологични параметри, забавят процесите, свързани със стареенето на мозъка, подобряват паметта, координацията и баланса на процесите в нервната система.

Превантивната и лечебна роля на антиоксидантите, съдържащи се в дивите горски плодове, ги прави обект за задълбочено изследване от учени, лекари, специалисти по хранене и технолози. Засилва се необходимостта от количествена и качествена оценка на полифенолния състав и антиоксидантен капацитет на плодовете, както и изясняване на физиологичното им въздействие.

С обогатяване на познанието за плодовете, като източник на биологично активни вещества, се търсят начини за разширяване на използването им и приложението им като естествени съставки в лекарствени препарати, храни и напитки с очакван здравословен ефект.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е комплексна оценка на диворастящи червена и черна боровинка - ценен източник на биологично активни вещества и генериране на познания за рационалното оползотворяване на природните ресурси при създаване на продукти в областта на фармацията, козметиката и средства за превенция на човешкото здраве.

За осъществяване на поставената цел са определени следните задачи:

1. Създаване на надежден и селективен GC-MS метод за определяне на свободни и свързани фенолни киселини в екстракти от плодове от червена и черна боровинка.
2. Разработване на чувствителни и бързи HPLC-UV и LC-ESI-MS/MS методи за определяне на флавоноли, флавонони, флавани, антоциани и проантоцианидини в екстракти от плодове от червена и черна боровинка.
3. Сравнителен качествен и количествен анализ на фенолния профил на екстракти от плодове от диворастящи червена и черна боровинка с произход от различни географски региони (България, Китай и Норвегия).
4. Почвено-климатична характеристика на естествените местообитания на червена и черна боровинка в България.
5. Оценка на фармакологичната активност на обогатени и пречистени фракции от плодове на червена и черна боровинка: антиоксидантен капацитет, антигъбно, антибактериално и антивирусно действие.

Номерациите на фигурите и таблиците в автореферата следват тези в дисертационния труд.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал

В проучването са използвани плодове от диворастящи червена и черна боровинка с произход от България, Китай и Норвегия (Табл. 1). Плодовете са набрани от предварително маркирани растения в средата на характерния за съответния район беритбен период. След сортиране за отстраняване на неузрели, презрели или наранени екземпляри, плодовете са замразени в течен азот, стрити в мелница и лиофилизирани.

Табл. 1 Местообитания на диворастящи червена и черна боровинка

№	Година	Местообитание	Географска ширина	Географска дължина	Надморска височина
(<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.), България					
1-5	2009-2013	местност Беклемето, Стара планина	42°47'0.05"N	24°37'34.84"E	1470
6-10	2009-2013	над с. Бозево, Родопи	41°55'54.43"N	23°46'16.40"E	1390
(<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.), Китай					
11	2009	предоставена от фирма "Цима" гр. Пловдив			
(<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.), България					
12	2015	местност Беклемето, Стара планина	42°46.460'N	24°37.000'E	1470
13	2015	край хижа Васильов, Стара планина	42°52.753'N	24°28.968'E	1360
14	2015	Мусаленска пътека, Рила	41°37.967'N	24°33.183'E	1780
15	2015	подножието на връх Перелик, Родопи	41°36.400'N	24°35.805'E	1970
16	2015	край крепост "Традище" над с. Гела, Родопи	42°13.924'N	23°35.561'E	1740
17	2015	над хижа Алеко, Витоша	42°34.767'N	24°17.403'E	2060
(<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.), Норвегия					
18	2015	Gol (Gutigard skog)	60°40.305'N	08°48.507'E	270
19	2015	Stjørdal (Rådal)	63°29.440'N	10°52.620'E	240
20	2015	Bardu	68°43.515'N	18°32.625'E	107
(<i>Vaccinium myrtillus</i> L.), България					
21-25	2009-2013	местност Беклемето, Стара планина	42°46'44.12"N	24°37'50.88"E	1460
26-30	2009-2013	над с. Бозево, Родопи	41°55'51.73"N	23°46'14.98"E	1430
(<i>Vaccinium myrtillus</i> L.), Китай					
31	2009	предоставена от фирма "Цима" гр. Пловдив			
(<i>Vaccinium myrtillus</i> L.), България					
32	2015	местност Беклемето, Стара планина	42°46.873'N	24°37.355'E	1460
33	2015	край хижа Амбарица, Стара планина	42°45.301'N	24°46.721'E	1510
34	2015	Мусаленска пътека, Рила	42°13'53.61"N	23°35'24.56"E	1740
35	2015	подножието на връх Перелик, Родопи	41°36'30.52"N	24°35'49.76"E	1930
36	2015	край параклис "Св. Марина" над с. Гела, Родопи	41°38'40.56"N	24°33'23.44"E	1660
37	2015	над хижа Алеко, Витоша	42°34.767'N	23°17.436'E	1950
(<i>Vaccinium myrtillus</i> L.), Норвегия					
38	2015	Gol (Velta)	60°40.305'N	08°48.507'E	270
39	2015	Stjørdal (Rådal)	63°29.440'N	10°52.620'E	240
40	2015	Harstad (Bjørnråдалen)	68°53.771'N	16°30.438'E	206

Получаване на базови екстракти от плодове на червена и черна боровинка - 0.5 g лиофилизирана биомаса се екстрахира трикратно по 20 min на ултразвук при 22 °C с 80% v/v метанол и 0.1% мравчена к-на.

Определяне на общи фенолни съединения (TPC) - по метода на Folin-Ciocalteu.

Определяне на общи мономерни антоциани (TMA) - чрез pH-разграничаващия метод.

Определяне на металоредуцираща способност - FRAP тест.

Определяне на радикалоулавяща способност - DPPH тест.

Фракциониране на базовите екстракти от плодове на червена и черна боровинка за определяне на свободни и свързани фенолни киселини - съгласно процедурата, описана от Zadernowski *et al.* (2005).

Получаване на екстракти от плодове на червена и черна боровинка за определяне съдържанието на флавоноли, флавони и флаванони - 0.5 g лиофилизиран плод се екстрахират с 80% метанол на ултразвук при 45 °C за 15 min.

Получаване на екстракти от плодове на червена и черна боровинка за определяне съдържанието на антоцианидини - 0.5 g лиофилизиран плод се кипят с 2 M HCl в метанол при 90 °C на обратен хладник за 60 min.

Фракциониране на базовите екстракти от плодове на червена и черна боровинка за изпитване на биологичната им активност - получаването на отделни фракции от базовите екстракти се осъществява посредством твърдофазова екстракция с колонки, съдържащи обърната C₁₈ фаза (Phenomenex) и последователно елуиране с 0.1% (v/v) мравчена киселина във вода, етилацетат и 0.1% (v/v) мравчена киселина в метанол. Изолят се три отделни фракции: „А” (органични и аминокиселини, захари), „В” (фенолни киселини, танини) и „С” (антоцианови съединения).

Определяне на свободни и свързани фенолни киселини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез GC-MS - използван е газов хроматограф Agilent GC 7890A, свързан към мас спектрален детектор Agilent MSD 5975C в режим на електронен удар 70 eV и диапазон на сканиране на мас детектора m/z = 50 – 500; колона HP-5MS с параметри: дължина 30 m, диаметър 0.32 mm и дебелина на филмовото покритие 0.25 mm.

Валидиране на метода за определяне съдържанието на свободни и свързани фенолни киселини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка - методът за определяне съдържанието на свободни и свързани фенолни киселини е валидиран за

селективност, линейност, прецизност, повторимост и правилност. Определени са LOD и LOQ.

Определяне на антоцианидини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез HPLC-UV - използвана е система Waters 1525 binary HPLC pump, Waters 2487 Dual Absorbance Detector, хроматографска колона Inertsil ODS-4 (3µm x 4.6 x 150 mm), пред колона (MetaGuard Pursuit C18, 5 µm x 4.6 mm).

Валидиране на метода за определяне съдържанието на антоцианидини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка - методът за определяне съдържанието на антоцианидини е валидиран за селективност, линейност, прецизност и повторимост. Определени са LOD и LOQ.

Определяне на флавоноли, флавони и флаванони в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез HPLC-UV - хроматографска система Waters 1525 binary HPLC pump, Waters 2487 Dual Absorbance Detector, хроматографска колона Discovery® HS C18 (5µm x 4.6 x 250 mm) Supelco, пред колона (MetaGuard Pursuit C18, 5 µm x 4.6 mm).

Валидиране на метода за определяне съдържанието на флавоноли, флавони и флаванони в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез HPLC-UV - методът за определяне съдържанието на антоцианидини е валидиран за селективност, линейност, прецизност и повторимост. Определени са LOD и LOQ.

Определяне на атоциани в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез LC-PDA-ESI-MS - използван е течен хроматограф, UHPLC помпа Accela, autosampler, мас спектрален детектор с висока резолюция/акуратна маса (HRMS “Q-Exactive”), технология Orbitrap™ в режим на електроспрей йонизация при позитивна полярност (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); колона Kinetex 2.6 µm C18 100 Å, 150 x 2.1 mm.

Валидиране на метода за определяне съдържанието на атоциани в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез LC-ESI-MS - методът за определяне съдържанието на антоциани е валидиран за селективност, линейност, прецизност и повторимост. Определени са LOD и LOQ.

Определяне на проатоцианидини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез LC-ESI-MS - използван е течен хроматограф, UHPLC помпа Accela, autosampler, мас спектрален детектор с висока резолюция/акуратна маса (HRMS “Q-Exactive”), технология Orbitrap™ в режим на електроспрей йонизация при негативна

полярност (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); колона Kinetex 2.6 μ m C18 100 Å, 150 x 2.1 mm.

Валидиране на метода за определяне съдържанието на проатоцианидини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез LC-PDA-ESI-MS - методът за определяне съдържанието на проатоцианидини е валидиран за линейност, прецизност и повторимост. Определени са LOD и LOQ.

Изпитване на базовите екстракти и получените от тях фракции „В” и „С”от плодове на червена и черна боровинка за антивирусна активност

Подбрани са следните вирусни модели:

- ❖ коксакивирус В1 (щам Connecticut) (CV-B1), човешки ентеровирус В (HEV-B) в род Enterovirus на сем. Picornaviridae;
- ❖ полиовирус 1 (PV-1) (щам LSc-2ab), човешки ентеровирус С (HEV-C) в род Enterovirus на сем. Picornaviridae;
- ❖ грипен вирус А/Aichi/2/68 (H3N2) от сем. Orthomyxoviridae;
- ❖ човешки респираторно-синцитиален вирус А2 (HRSV-A2) от род Pneumovirus на сем. Paramyxoviridae.

Антивирусният скрийнинг се провежда по метода на инхибиране на вирусния цитопатичен ефект в монослойни клетъчни култури, пермисивни за съответния изпитван вирус, като отчитането се извършва както микроскопски, така и чрез колориметрично измерване на степента на поглъщане на неутрално червено. Определят се следните параметри: 50% инхибираща концентрация (IC50), 50% цитотоксична концентрация (CC50), максимално поносима концентрация (MTC) и индекс на избирателност ($SI = CC50 / IC50$).

Изпитване на базовите екстракти и получените от тях фракции „В” и „С”от плодове на червена и черна боровинка за антибактериална и антигъбна активност

Използвани са лабораторни щамове от следните тест-бактерии: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus* (Грам-положителни), *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* (Грам-отрицателни) и гъбата *Candida albicans*. Определена е минимална инхибираща концентрация (МИК) по метода на микроразрежданията в течна хранителна среда.

Статистически анализ - всеки резултат се изразява като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение. Данните са анализирани с „one-way ANOVA” с последващ Tukey’s t-тест за статистически значима разлика. Р стойности < 0.05 се приемат за значими. Направен е анализ на главните компоненти (PCA) чрез Metavboanalyst 3.0.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Определяне на ТРС, ТМА, и ТАС на базовите екстракти от плодове на червена и черна боровинка

Данните за общото фенолно съдържание, мономерните антоциани и антиоксидантния капацитет на изследваните плодове са представени в Табл. 15а и 15b. Видът на диворастящите ягодоплодни от една страна и местонахождението от друга влияе съществено върху съдържанието на биоактивни компоненти, както следва: ТРС, ТМА, ТАС черна боровинка Родопи > черна боровинка Стара планина > червена боровинка Родопи > червена боровинка Стара планина по отношение на изследвания петгодишен период (2009-2013).

Табл. 15а ТРС, ТМА и ТАС на базовите екстракти от червена боровинка

Место обитание	Година	TPC (mg GAE/100g)	TMA (mg CGE/100g)	FRAP (μmol TE/g)	IC ₅₀ DPPH (μg/ml)
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.					
1	2009	744.32±24b	196.03±19a	65.15±1.6a	34.22±0.7a
2	2010	685.51±26b	179.17±18b	57.23±1.1a	35.25±1.0b
3	2011	739.74±21a	189.36±18a	60.25±1.3b	36.94±0.8a
4	2012	766.22±27a	200.45±20a	66.48±1.4a	33.18±1.1a
5	2013	758.41±25b	192.04±21b	62.35±1.1b	34.05±0.9b
6	2009	781.82±31a	223.44±22a	66.72±1.6b	32.77±0.8b
7	2010	768.53±35b	217.27±19a	61.45±1.5a	35.06±1.1a
8	2011	775.07±33a	220.25±15b	63.13±1.7b	34.22±0.7a
9	2012	800.04±38a	228.77±26a	70.08±1.9b	30.16±0.9a
10	2013	783.19± 32b	221.09±18b	68.19±1.2a	29.04±1.3a
11	2009	707.09±20a	170.25±18a	60.16±1.8b	26.60±1.5a
12	2015	741.22±33a	204.05±22a	67.89±2.1a	32.63±1.4b
13	2015	714.44±26b	215.42±19b	70.17±1.9b	28.06±0.8a
14	2015	753.31±27a	224.36±23a	73.08±1.8a	30.51±1.8a
15	2015	786.68 ±32b	236.18±22b	76.37±2.3a	30.04±1.1a
16	2015	737.21±30a	197.05±16a	63.02±1.6b	28.14±1.6b
17	2015	791.37±35a	240.59±20b	78.24±2.2a	27.63±1.5a
18	2015	802.44±32b	251.09±15a	76.29±2.7a	27.46±1.2a
19	2015	827.78±30a	266.32±18b	82.06±3.2a	25.00±0.7b
20	2015	862.56±42a	272.09±19b	86.37±2.9b	26.22±0.9b

Табл. 15b TPC, TMA и TAC на базовите екстракти от черна боровинка

<i>Vaccinium myrtillus</i> L.					
Место обитание	Година	TPC (mg GAE/100g)	TMA (mg CGE/100g)	FRAP (μmol TE/g)	IC ₅₀ DPPH (μg/ml)
21	2009	877.34 ± 31a	407.44 ± 18a	77.08 ± 1.9a	28.68±1.4b
22	2010	852.28 ± 33b	388.09 ± 17b	71.82 ± 1.5b	30.03±1.8a
23	2011	860.09 ± 34a	394.46 ± 19a	74.27 ± 1.6b	29.07±1.2b
24	2012	884.10 ± 36a	412.05 ± 20a	79.05 ± 1.7a	29.60±1.1a
25	2013	870.23 ± 39b	401.13 ± 21b	78.16 ± 1.3b	31.82±1.9b
26	2009	881.21 ± 29b	423.99 ± 20b	78.61 ± 1.8a	25.25±1.0a
27	2010	876.47 ± 30a	408.12 ± 17b	74.33 ± 1.6a	27.73±1.1b
28	2011	880.05 ± 28b	413.43 ± 18b	76.14 ± 1.4b	27.32±0.8b
29	2012	884.00 ± 26a	426.09 ± 19a	80.05 ± 1.2a	25.58±1.7a
30	2013	877.06 ± 32b	417.33 ± 20a	79.02 ± 1.8b	26.91±1.3b
31	2009	775.12 ± 26b	389.17 ± 18a	70.66 ± 1.4a	32.09±0.6a
32	2015	833.12 ± 35a	400.02 ± 27a	73.71 ± 3.2a	26.66±1.2a
33	2015	772.59 ± 30b	362.23 ± 18b	64.87 ± 2.9b	25.81±0.8b
34	2015	791.44 ± 31a	386.34 ± 21a	69.86 ± 1.6a	26.13±1.9a
35	2015	874.66 ± 38b	429.18 ± 22b	77.09 ± 2.5a	26.09±2.2a
36	2015	805.21 ± 34a	396.55 ± 23a	67.96 ± 2.1b	25.38±2.0b
37	2015	880.04 ± 37a	436.52 ± 25b	80.33 ± 2.8a	25.09±1.7a
38	2015	884.21 ± 43b	438.87 ± 29b	82.38 ± 1.8b	24.96±1.1b
39	2015	887.05 ± 47a	440.13 ± 30a	84.53 ± 2.2a	23.84±1.5a
40	2015	888.75 ± 48a	442.28 ± 24b	86.40 ± 2.0a	22.73±1.6a

Общото фенолно съдържание в червената боровинка с произход Стара планина варира от 685.5 до 766 mg GAE/100g за периода 2009 - 2013 г. Стойностите по отношение на червената боровинка с произход Родопи се движат в рамките от 768.5 до 800.0 mg GAE/100g за периода 2009 - 2013 г. При черната боровинка с произход Стара планина, TPC е в диапазона 852.2 - 884.1 mg GAE/100g за периода 2009 - 2013 г., респективно за района на Родопите 876.4 - 884.0 mg GAE/100g. TPC при червената боровинка с произход Китай е 707.1 mg GAE/100g, а при черната 775.1 mg GAE/100g. Правят впечатление по-ниските стойности на изследвания показател в сравнение с тези, измерени при българските плодове за 2009 г. (744. 3; 768.5 и 877.3; 881.2 mg GAE/100g). TPC при при червената боровинка с произход Норвегия варира от 802.4 до 862.5 mg GAE/100g, респективно при черната от 884.1 до 888.2 mg GAE/100g. Наблюдава се увеличение в посока от юг към север. Сходна зависимост е установена от Lätti *et al.*, 2007 и Primetta *et al.*, 2013. По отношение на българските плодове, стойностите на общото

фенолно съдържание нарастват с увеличение на надморската височина (1460-2060 m): от 741.2 до 791.3 mg GAE/100g при червената боровинка и от 772.6 до 880.0 mg GAE/100g при черната боровинка. Като е съобщено по-рано, интензивността на светлината, фотопериодът и температурата оказват съществено влияние върху биосинтеза на много вторични метаболити (Taruscio *et al.*, 2004; Hohtola, 2007, Jaakola, & Hohtola, 2010; Skrovankova *et al.*, 2015). Върху нормалното развитие на растителните организми оказват влияние редица фактори на околната среда. Едни от тях се характеризират с постоянни стойности на въздействие, а други се отличават с променлив или периодичен характер, каквито са температурата и продължителността на осветлението. Температурата се изменя закономерно в зависимост от географската ширина и годишните времена. По отношение изискванията на растенията към фотопериода са се обособили две основни групи: растения на дългия и на краткия ден. По своя първоначален ареал на разпространение растенията на краткия ден се характеризират с екваториален произход, където продължителността на деня, нощта е равна - около 12 часа. Растенията, с произход от умерените и северните или южни ширини, където през лятото продължителността на слънчевото греене варира от 14 до 16 часа и повече, са се обособили като растения на дългия ден, т.е. растения, които преминават качествени изменения при продължително или непрекъснато осветление. Съществуват и сезонни различия в продължителността на слънцегреенето. На места на север от Полярния пояс слънцето въобще не залязва (20 часа слънчева светлина в денонощието). Поради това някои описват Норвегия като „Страната на среднощното слънце”.

Тенденцията по отношение на TPC се наблюдава и спрямо TMC. Общото антоцианово съдържание при червената боровинка с произход Стара планина варира от 179.2 до 200.5 mg CGE/100g за периода 2009-2013 г., а при тази с произход Родопи от 223.4 до 228.8 mg CGE/100g за периода 2009-2013 г. TMC при черната боровинка с произход Стара планина се движи в рамките от 388.1 до 412.1 mg CGE/100g за периода 2009-2013 г. и от 408.1 до 426.1 mg CGE/100g за периода 2009-2013 при боровинката с произход Родопи. Стойността на TMC при червената боровинка с произход Китай за 2009 г. е 170.3 mg CGE/100g и 389.2 mg CGE/100g при черната боровинка. Установена е аналогична зависимост и по този показател. Българските плодове (съответно 196.1; 223.4 и 407.4; 424.0 mg CGE/100g за 2009 г.) притежават значително по-високо общото антоцианово съдържание. TMC при червената боровинка с произход Норвегия варира от 251.7 до 271.7 mg CGE/100g за 2015 г., респективно при черната от 438.8 до 442.3 mg CGE/100g за 2015 г. Наблюдава се увеличение в посока от юг към север, в унисон с изследванията, проведени от Lätti *et al.*, 2007 и Primetta *et al.*, 2013. По отношение на българските плодове, стойностите на общото фенолно съдържание нарастват с увеличение на надморската височина (1460-2060 m): от 197.1 до 240.6 mg CGE/100g за 2015 г. при червената боровинка и от 362.2 до 436.5 mg CGE/100g за 2015 г. при черната боровинка. За подобна зависимост съобщава в своето изследване Zoratti *et al.*, 2015.

Двата теста за определяне на антиоксидантен капацитет използвани при настоящото изследване представят различни механизми за оценка на антиоксидантната активност. Докато DPPH теста отчита радикалоулавящата способност на растителните екстракти, FRAP теста измерва общото съдържание на редокси-активни съединения (Magalhães et al., 2008).

Зависимостта по отношение на TPC и TMA се запазва и спрямо показателя TAC.

Общият антиоксидантен капацитет при червената боровинка с произход Стара планина варира от 57.2 до 66.5 $\mu\text{mol TE/g}$ за (измерен по FRAP метода) и от 36.9 до 33.2 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$ (по DPPH метода) за периода 2009 - 2013 г., а при тази от Родопите от 61.4 до 70.1 $\mu\text{mol TE/g}$ за (по FRAP метода) и от 35.1 до 30.2 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$ (по DPPH метода) за ериода 2009 - 2013 г. TAC на черната боровинка с произход Стара планина се движи в границите от 71.8 до 79.1 $\mu\text{mol TE/g}$ за (измерен по FRAP метода) и от от 31.8 до 28.7 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$ (по DPPH метода) за периода 2009 - 2013 г., а при тази от Родопите от 74.3 до 78.1 $\mu\text{mol TE/g}$ за (по FRAP метода) и от 27.7 до 25.2 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$ (по DPPH метода) за периода 2009 - 2013 г.

Стойностите на TAC при червената боровинка с произход Китай за 2009 г. са 60.1 $\mu\text{mol TE/g}$ за 2009 г. (измерен по FRAP метода) и 26.6 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$ (по DPPH метода), а при черната боровинка съответно 70.6 $\mu\text{mol TE/g}$ за 2009 г. (измерен по FRAP метода) и 32.1 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$ (по DPPH метода). За 2009 г. българските плодове (65.1; 66.7 $\mu\text{mol TE/g}$; 34.2; 32.8 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$ при червена боровинка и 77.1; 78.6 $\mu\text{mol TE/g}$; 28.7; 25.3 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$ при червна боровинка) притежават значително по-висока антиоксидантна активност. TAC при червената боровинка с произход Норвегия варира от 76.3 до 86.4 $\mu\text{mol TE/g}$; от 27.3 до 26.5 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$ и от 82.4 до 86.4 $\mu\text{mol TE/g}$; от 25.0 до 22.7 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$. И тук се забелязва увеличение в посока от юг към север, както и в изследванията, проведени от. Lätti et al., 2007; Bueno et al., 2012; Primetta et al., 2013. По отношение на българските плодове, антиоксидантната активност нараства с увеличение на надморската височина (1460-2060 m): от 63.1 до 78.2 $\mu\text{mol TE/g}$; от 30.5 до 27.6 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$ при червената боровинка и от 64.9 до 77.1 $\mu\text{mol TE/g}$; от 26.1 до 25.1 $\mu\text{g/ml IC}_{50}$ при черната боровинка. Сходни заключения прави в своето изследване Zoratti et al., 2015.

При настоящото изследване е установено, че антоциановото съдържание и антиоксидантният капацитет на екстрактите от плодове на черна боровинка съществено зависят от произхода, което вероятно се дължи на различия в почвените и климатични условия.

Корелационните коефициенти на зависимостите между отделните показатели са представени в Табл 16. В подкрепа на резултатите, получени от изследвания на други автори (Li et al., 2009; Bunea et al., 2011; Mikulic-Petkovsek et al., 2012a), съществува по-добра корелация между антиоксидантния капацитет, в частност FRAP-теста и общото фенолно съдържание, отколкото съдържанието на общи мономерни антоциани и антиоксидантната активност. Високите стойности на корелационния коефициент между металоредуциращата и радикалоулавящата способност показват надеждността на оценяване на антиоксидантната активност чрез използваните *in vitro* тестове.

Табл. 16 Корелации между общото фенолно съдържание (TPC), общите мономерни антоциани (TMA) и антиоксидантния капацитет на базовите екстракти от плодове на червена и черна боровинка с произход Стара планина и Родопи за периода 2009-2013 г.

Червена боровинка	TP/FRAP	TP/DPPH	TP/TMA
1-5	0.9873	0.8656	0.8995
6-10	0.9978	0.9271	0.8594
Черна боровинка	TP/FRAP	TP/DPPH	TP/TMA
21-25	0.9841	0.9483	0.9796
26-30	0.9934	0.9676	0.8663

Получените резултати са в унисон със заключението от публикувани изследвания (Cao & Prior, 1998; Escarpa & Gonzalez, 2001a; Kähkönen *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Jovančević *et al.*, 2011; Grace *et al.*, 2013) за влиянието на вида на плода върху полифенолното съдържание.

2. Определяне на свободни и свързани фенолни киселини чрез GC-MS

Количествено са определени 8 фенолни киселини в свободно и свързано състояние (Табл. 17 - 21).

Табл. 17 Съдържание на свободни фенолни киселини в екстракти от плодове на червена боровинка с произход Стара планина и Родопи за периода 2009-2013 г.

<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. Стара планина										
Наименование	2009		2010		2011		2012		2013	
	x _m	sd	x _m	sd	x _m	sd	x _m	sd	x _m	sd
Свободни хидроксibenзоени киселини										
Протокатехова к-на	4.28	0.35	3.85	0.22	4.03	0.15	3.72	0.43	3.51	0.08
Салицилова к-на	10.44	0.67	9.71	0.33	10.12	0.27	10.11	0.72	9.16	0.21
Ванилова к-на	8.12	1.00	7.13	0.26	7.74	0.33	8.94	1.11	7.89	0.16
Гентисова к-на	5.11	0.24	4.16	0.14	5.22	0.24	4.26	0.12	4.07	0.21
Свободни хидроксиканелени киселини										
Кафеена к-на	13.37	0.33	9.82	0.22	10.41	0.62	12.08	0.24	11.56	0.48
<i>p</i> -Кумарова к-на	14.55	1.14	13.23	0.88	13.99	0.39	15.12	1.01	14.89	0.30
Синапова к-на	3.42	0.28	2.39	0.17	3.06	0.12	3.66	0.20	3.39	0.27
<i>trans</i> -Канелена к-на	7.44	1.18	6.29	0.08	6.97	0.48	7.82	1.03	7.41	0.33
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. Родопи										
Свободни хидроксibenзоени киселини										
Протокатехова к-на	4.56	0.37	4.12	0.33	4.35	0.31	5.04	0.40	4.79	0.38
Салицилова к-на	11.17	0.70	10.05	0.63	10.61	0.60	12.29	0.77	11.67	0.74
Ванилова к-на	9.93	1.05	9.01	0.95	9.62	0.90	10.45	1.16	9.68	1.10
Гентисова к-на	5.47	0.25	4.92	0.23	5.19	0.22	6.01	0.28	5.71	0.26
Свободни хидроксиканелени киселини										
Кафеена к-на	14.17	0.35	12.95	0.31	13.56	0.30	15.38	0.38	14.71	0.36
<i>p</i> -Кумарова к-на	15.57	1.20	14.01	1.08	14.79	1.02	17.13	1.32	16.27	1.25
Синапова к-на	3.66	0.29	3.29	0.26	3.48	0.25	4.03	0.32	3.82	0.31
<i>trans</i> -Канелена к-на	7.96	1.24	7.16	1.12	7.56	1.06	8.76	1.36	8.32	1.25

Табл. 18 Съдържание на свободни и свързани фенолни киселини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка с произход Китай (2009)

Наименование	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. Китай		<i>Vaccinium myrillus</i> L.		Наименование	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. Китай		<i>Vaccinium myrillus</i> L.	
	2009		2009			2009		2009	
	x _m	sd	x _m	sd		x _m	sd	x _m	sd
Свободни хидроксibenзоени киселини					Свързани хидроксibenзоени киселини				
Протокатехова к-на	3.98	0.39	11.72	0.40	Протокатехова к-на	68.10	0.41	64.22	0.45
Салицилова к-на	9.41	0.60	14.11	0.68	Салицилова к-на	150.49	0.63	157.06	0.61
Ванилова к-на	7.52	1.21	27.94	1.06	Ванилова к-на	65.75	1.27	72.15	0.88
Гентисова к-на	3.35	0.27	7.26	0.22	Гентисова к-на	77.12	0.28	96.22	0.26
Свободни хидроксиканелени киселини					Свързани хидроксиканелени киселини				
Кафеена к-на	15.05	1.22	27.12	0.77	Кафеена к-на	256.12	1.28	310.57	0.89
<i>p</i> -Кумарова к-на	10.78	0.39	23.08	0.14	<i>p</i> -Кумарова к-на	337.75	0.41	457.75	0.23
Синапова к-на	3.47	0.24	12.66	0.22	Синапова к-на	12.93	0.25	24.12	0.29
<i>trans</i> -Канелена к-на	7.12	1.05	10.82	0.09	<i>trans</i> -Канелена к-на	10.50	1.10	16.15	0.17

При червена боровинка с произход Китай, от производните на хидроксibenзоената к-на в свободно състояние в най - голямо количество е салицилова к-на (9.4 $\mu\text{g/g dw}$), а в - най ниско гентисова к-на (3.4 $\mu\text{g/g dw}$), респективно от производните на хидроксиканелената к-на в свободно състояние в най - голямо количество е кафеена к-на (15.1 $\mu\text{g/g dw}$), а в - най малко синапова к-на (3.5 $\mu\text{g/g dw}$). При черна боровинка с произход Китай, от производните на хидроксibenзоената к-на в свободно състояние в най - голямо количество е салицилова к-на (14.1 $\mu\text{g/g dw}$), а в най - малко гентисова к-на (7.3 $\mu\text{g/g dw}$), респективно от производните на хидроксиканелената к-на в свободно състояние в най - голямо количество е кафеена к-на (27.2 $\mu\text{g/g dw}$), а в - най малко транс-канелената к-на.(10.8 $\mu\text{g/g dw}$). При червена боровинка с произход Китай, от производните на хидроксibenзоената к-на в свързано състояние в най - голямо количество е салицилова к-на (150.5 $\mu\text{g/g dw}$), а в - най малко ванилова к-на (65.8 $\mu\text{g/g dw}$), респективно от производните на хидроксиканелената к-на в свързано състояние в най - голямо количество е пара-кумарова к-на (337.8 $\mu\text{g/g dw}$), а в най-малко транс-канелена к-на (10.5 $\mu\text{g/g dw}$). При черна боровинка с произход Китай, от производните на хидроксibenзоената к-на в свързано състояние в най - голямо количество е салицилова к-на (157.1 $\mu\text{g/g dw}$), а в най - малко ванилова к-на.(72.5 $\mu\text{g/g dw}$), респективно от производните на хидроксиканелената к-на в свързано състояние в най - голямо количество е пара-кумарова к-на (457.8 $\mu\text{g/g dw}$), а в най - малко транс-канелена к-на (16.2 $\mu\text{g/g dw}$). Изложените данни съвпадат с публикуваните резултати от (Ayaz *et al.*, 2001; Cakste *et al.*, 2014).

Табл. 19 Съдържание на свободни фенолни киселини в екстракти от плодове на черна боровинка с произход Родопи и Стара планина за периода 2009-2013

<i>Vaccinium myrtillus</i> L. Стара планина										
Наименование	2009		2010		2011		2012		2013	
	x_m	sd	x_m	sd	x_m	sd	x_m	sd	x_m	sd
Свободни хидроксibenзоени киселини										
Протокатехова к-на	10.40	0.31	8.91	0.26	9.78	0.22	10.92	0.33	10.70	0.30
Салицилова к-на	13.88	0.62	12.55	0.31	14.06	0.25	14.57	0.65	14.28	0.61
Ванилова к-на	25.43	0.69	23.15	0.34	24.57	0.39	26.70	0.72	26.17	0.67
Гентисова к-на	6.11	0.21	5.24	0.27	5.82	0.34	6.42	0.22	6.29	0.21
Свободни хидроксиканелени киселини										
Кафеена к-на	26.92	1.03	24.02	0.66	26.11	0.31	28.27	1.08	27.70	1.01
p-Кумарова к-на	22.50	0.39	20.79	0.38	21.34	0.55	23.63	0.41	23.15	0.38
Синапова к-на	11.42	0.28	10.12	0.27	11.09	0.35	11.99	0.29	11.75	0.27
trans-Канелена к-на	10.08	1.21	9.02	0.06	9.77	0.18	10.58	1.27	10.37	1.18
<i>Vaccinium myrtillus</i> L. Родопи										
Свободни хидроксibenзоени киселини										
Протокатехова к-на	11.72	0.40	11.28	0.25	11.51	0.18	12.31	0.42	11.94	0.38
Салицилова к-на	14.11	0.68	13.58	0.36	14.36	0.25	14.82	0.71	14.37	0.64
Ванилова к-на	27.94	1.06	26.17	0.23	27.18	0.18	29.34	1.11	28.46	1.00
Гентисова к-на	7.26	0.22	6.63	0.07	7.02	0.24	7.62	0.23	7.39	0.21
Свободни хидроксиканелени киселини										
Кафеена к-на	27.12	0.77	25.54	0.44	26.89	0.35	28.48	0.81	27.62	0.73
p-Кумарова к-на	23.08	0.14	21.99	0.18	22.56	0.41	24.23	0.15	23.51	0.13
Синапова к-на	12.66	0.22	11.02	0.26	12.99	0.22	13.29	0.23	12.89	0.21
trans-Канелена к-на	10.82	0.09	9.02	0.19	9.41	0.38	11.36	0.09	11.02	0.09

С най-ниско съдържание от производните на хидроксibenзоената к-на в свободно състояние за периода 2009 - 2013 г. в черната боровинка е гентисова к-на (стойности 6.0 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Стара планина и 7.2 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Родопи), респективно в червената е протокатехова к-на (стойности 4.6 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Стара планина и 5.5 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Родопи). От производните на хидроксibenзоената к-на в свободно състояние с най - високо съдържание за периода 2009 - 2013 г. в черната боровинка е ванилова к-на (стойности 25.2 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Стара планина и 28.0 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Родопи), респективно в червената е салицилова к-на (стойности 10.4 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Стара планина и 11.2 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Родопи). От производните на хидроксиканелената к-на в свободно състояние с най-ниско съдържание за периода 2009 - 2013 г. в черната боровинка е синапова к-на (стойности 11.3 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Стара планина и 12.6 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Родопи), респективно в червената е синапова к-на (стойности 3.6 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Стара планина и 5.4 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Родопи). От производните на хидроксиканелената к-на в свободно състояние с най - високо съдържание за периода 2009 - 2013 г. в черната боровинка е кафеена к-на (стойности 26.6 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Стара планина и 28.3 $\mu\text{g/g dw}$ за района на Родопи).

dw за района на Стара планина и 27.2 µg/g dw за района на Родопи), респективно в червената е пара-кумарова к-на (стойности 14.6 µg/g dw за района на Стара планина и 16.2 µg/g dw за района на Родопи).

Табл. 20 Съдържание на свързани фенолни киселини в екстракти от плодове на червена боровинка с произход Родопи и Стара планина за периода 2009-2013

<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. Стара планина										
Наименование	2009		2010		2011		2012		2013	
	x _m	sd	x _m	sd	x _m	sd	x _m	sd	x _m	sd
Свързани хидроксibenзоени киселини										
Протокатехова к-на	85.12	4.62	83.98	4.22	84.17	4.15	89.38	4.85	86.69	4.71
Салицилова к-на	188.11	8.22	185.28	9.33	186.26	8.29	197.52	8.63	191.59	8.37
Ванилова к-на	82.19	4.77	80.77	5.26	81.32	5.35	86.30	5.01	83.71	4.86
Гентисова к-на	96.40	5.50	95.02	5.14	90.06	5.22	101.22	5.78	98.18	5.60
Свързани хидроксиканелени киселини										
Кафеена к-на	320.15	5.14	318.88	6.88	321.19	5.39	336.16	5.40	326.07	5.24
p-Кумарова к-на	422.19	4.33	411.78	5.22	417.38	7.60	443.30	4.55	430.00	4.41
Синапова к-на	16.16	1.23	14.39	1.17	15.18	1.16	16.97	1.29	16.46	1.25
trans-Канелена к-на	13.12	2.18	12.05	1.08	12.68	1.41	13.78	2.29	13.36	2.22
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. Родопи										
Свързани хидроксibenзоени киселини										
Протокатехова к-на	87.72	2.43	85.28	2.15	86.51	3.18	92.11	2.55	89.34	2.47
Салицилова к-на	190.11	5.77	188.58	6.39	189.16	6.21	199.62	6.06	193.63	5.88
Ванилова к-на	84.94	4.31	82.17	4.13	83.89	3.76	89.19	4.53	86.51	4.39
Гентисова к-на	96.26	5.18	95.03	5.09	94.07	5.21	101.07	5.44	98.04	5.28
Свързани хидроксibenзоени киселини										
Кафеена к-на	322.12	2.01	321.12	1.54	322.33	1.33	338.23	2.11	328.08	2.05
p-Кумарова к-на	442.08	10.24	435.15	7.28	440.66	9.48	464.18	10.75	450.26	10.43
Синапова к-на	17.66	3.20	16.18	2.22	17.17	2.27	18.54	3.36	17.99	3.26
trans-Канелена к-на	14.82	1.27	13.17	1.15	14.22	1.37	15.56	1.33	15.09	1.29

От производните на хидроксibenзоената к-на в свързано състояние с най-ниско съдържание за периода 2009 - 2013 г. в черната боровинка е протокатехова к-на (стойности 80.8 µg/g dw за района на Стара планина и 82.8 µg/g dw за района на Родопи), респективно в червената е ванилова к-на (стойности 82.9 µg/g dw за района на Стара планина и 85.3 µg/g dw за района на Родопи). С най - високо съдържание от производните на хидроксibenзоената к-на в свързано състояние за периода 2009 - 2013 г. в двата вида боровинки е салицилова к-на (черна: стойности 198.2 µg/g dw за района на Стара планина и 200.4 µg/g dw за района на Родопи) и (червена: стойности 189.8µg/g dw за района на Стара планина и 192.2 µg/g dw за района на Родопи).

От производните на хидроксиканелената к-на в свързано състояние с най-ниско съдържание за периода 2009 - 2013 г. и в двата вида боровинки е транс-канелена к-на к-на

(черна: стойности 19.9 µg/g dw за района на Стара планина и 22.1 µg/g dw за района на Родопи) и (червена: стойности 13.0 µg/g dw за района на Стара планина и 14.6 µg/g dw за района на Родопи). С най - високо съдържание от производните на хидроксиканелената к-на в свързано състояние за периода 2009 - 2013 г. и в двата вида боровинки е пара-кумаровата к-на (черна: стойности 575.9 µg/g dw за района на Стара планина и 584.3 µg/g dw за района на Родопи) и (червена: стойности 424.9 µg/g dw за района на Стара планина и 446.5 µg/g dw за района на Родопи).

Табл. 21 Съдържание на свързани фенолни киселини в екстракти от плодове на черна боровинка с произход Родопи и Стара планина за периода 2009-2013

<i>Vaccinium myrtillus</i> L. Стара планина										
Наименование	2009		2010		2011		2012		2013	
	x _m	sd	x _m	sd	x _m	sd	x _m	sd	x _m	sd
Свързани хидроксibenзоени киселини										
Протокатехова к-на	80.28	4.31	78.56	4.26	79.16	4.22	84.29	4.53	81.77	4.34
Салицилова к-на	196.33	18.62	193.48	17.31	195.03	16.25	206.15	19.55	199.96	18.77
Ванилова к-на	90.19	10.69	87.33	10.34	88.92	10.39	94.70	11.22	91.86	10.78
Гентисова к-на	120.28	14.21	118.84	14.27	119.36	12.34	126.29	14.92	122.51	14.32
Свързани хидроксиканелени киселини										
Кафеена к-на	388.21	17.03	385.15	15.66	387.29	16.31	407.62	17.88	395.39	17.17
p-Кумарова к-на	572.19	20.39	559.28	16.38	564.26	22.55	600.80	21.41	582.78	20.55
Синапова к-на	30.15	3.28	28.81	2.27	29.31	3.35	31.66	3.44	30.71	3.31
Ферулова к-на	28.28	2.17	26.92	2.44	27.55	2.28	29.69	2.28	28.80	2.19
trans-Канелена к-на	20.19	1.71	18.20	1.56	19.27	2.18	21.20	1.80	20.56	1.72
<i>Vaccinium myrtillus</i> L. Родопи										
Свързани хидроксibenзоени киселини										
Протокатехова к-на	82.17	5.40	80.45	5.25	81.54	5.18	86.28	5.67	83.69	5.44
Салицилова к-на	200.27	13.68	191.19	12.36	196.28	13.25	210.28	14.36	203.97	13.79
Ванилова к-на	94.12	11.06	90.92	10.23	92.61	12.18	98.83	11.61	95.86	11.15
Гентисова к-на	124.16	15.22	122.12	14.07	123.19	16.24	130.37	15.98	126.46	15.34
Свързани хидроксиканелени киселини										
Кафеена к-на	392.29	18.77	390.16	17.44	391.23	18.35	411.90	19.71	399.55	18.92
p-Кумарова к-на	578.20	24.14	571.36	23.18	575.91	24.41	607.11	25.35	588.90	24.33
Синапова к-на	32.21	2.22	30.17	2.26	31.23	2.42	33.82	2.33	32.81	2.24
trans-Канелена к-на	22.27	1.35	20.67	1.19	21.28	1.48	23.38	1.42	22.68	1.36

И при двата вида боровинки се наблюдава превес в съдържанието на производните на хидроксиканелената над тези на хидроксibenзоената к-на за периода 2009 - 2013 г. Общото количество на производните на двата типа фенолни киселини в свързано и свободно състояние при червена и черна боровинка с произход България е съответно с 22 и 38% по-високо в сравнение с количеството на производните на двата типа фенолни киселини в свързано и свободно състояние при червена и черна боровинка с произход Китай за 2009 г.

При сравнение между двата района прави впечатление, че средното съдържание съдържание на производните на двата типа фенолни киселини в свързано и свободно състояние за периода 2009 - 2013 г. в черна и червена боровинка с произход Стара планина е съответно с 8 и 10% по - ниско спрямо това на плодовете от Родопите.

В резултат на проведените изследвания за период от 5 години (2009 - 2013 г.) е установено, че факторите оказващи влияние върху съдържанието на фенолни киселини в свързано и свободно състояние при червена и черна боровинка са два: от една страна генетичен, а от друга климатичен - съвкупността от т. нар климатични елементи валежи: температура, вятър, атмосферно налягане (тежест на въздуха), количество валежи. Тази зависимост е сходна с проучванията на водещи научни колективи (Moyer *et al.*, 2002; Jaakola *et al.*, 2004).

3. Определяне съдържанието на антоцианидини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез HPLC-UV

Съдържанието на антоцианидини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка с произход Стара планина и Родопи за периода 2009-2013 г. и Китай (2009 г.) е представено в Табл. 22.

В червената боровинка е установен и количествено определен един единствен представител на шестте основни класа антоцианидини, а именно цианидин. В черната боровинка са измерени пет антоцианидина (делфинидин, цианидин, пеонидин, петунидин и малвидин). Пеларгонидин не се детектира и в двата вида боровинки. Съдържанието на цианидин в червена боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. варира от 126.4 до 151.7 mg/100g fw, респективно при тази с произход Родопи от 129.1 до 153.2 mg/100g fw. Получените резултати са съпоставими с тези публикувани от Kahkonen *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2012. Количеството на цианидин в червената боровинка с произход Китай за 2009 г. е 133.4 mg/100g fw. Количеството на делфинидин в черната боровинка с произход Стара планина за периода 2009 - 2013 г. се движи в границите от 87.9 до 94.1 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 89.1 до 100.1 mg/100g fw. Съдържанието на цианидин в черна боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. е в интервала от 60.1 до 76.1 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 61.5 до 79.1 mg/100g fw. Количеството на петунидин в черна боровинка с произход Стара планина е в рамките от 48.1 до 65.3 mg/100g fw, а при тази произход Родопи от 50.0 до 66.3 mg/100g fw. Съдържанието на пеонидин в черна боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. е в интервала от 6.3 до 11.4 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 7.0 до 12.5 mg/100g fw. Количеството на малвидин в черна боровинка с произход Стара планина е в рамките от 12.4 до 20.0 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 13.2 до 21.8 mg/100g fw.

Табл. 22 Съдържание на антоцианидини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка

В таблицата са използвани следните обозначения: Хср - средна стойност на съдържанието на

Вид	Произход		Делфинидин	Цианидин	Петунидин	Пеларгонидин	Пеонидин	Малвидин
Черна боровинка 2009	Родопи	X ср.	96.85	68.40	57.34		15.15	7.83
		SD	1.36	0.83	0.67	нд	0.20	0.14
	Стара планина	X ср.	94.33	66.91	55.89		13.88	6.89
		SD	1.17	0.77	0.48	нд	0.14	0.22
Червена боровинка 2009	Родопи	X ср.		145.58				
		SD	нд	1.02	нд	нд	под LOQ	под LOQ
	Стара планина	X ср.		139.88				
		SD	нд	0.94	нд	нд	под LOQ	под LOQ
Черна боровинка 2009	Китай	X ср.	84.18	56.28	47.17		11.25	5.22
		SD	0.77	0.63	0.54	нд	0.26	0.11
Червена боровинка 2009	Китай	X ср.		133.44				
		SD	нд	1.08	нд	нд	под LOQ	под LOQ
Черна боровинка 2010	Родопи	X ср.	89.13	61.49	49.96		6.97	13.23
		SD	1.11	0.66	0.39	нд	0.28	0.31
	Стара планина	X ср.	87.87	60.12	48.14		6.28	12.44
		SD	0.92	0.56	0.22	нд	0.16	0.27
Червена боровинка 2010	Родопи	X ср.		129.05				
		SD	нд	1.22	нд	нд	под LOQ	под LOQ
	Стара планина	X ср.		126.44				
		SD	нд	0.86	нд	нд	под LOQ	под LOQ
Черна боровинка 2011	Родопи	X ср.	98.81	76.78	63.62		10.32	19.38
		SD	0.88	0.73	0.48	нд	0.69	0.43
	Стара планина	X ср.	92.16	74.61	64.93		9.14	17.88
		SD	0.96	0.81	0.42	нд	0.62	0.31
Червена боровинка 2011	Родопи	X ср.		140.19				
		SD	нд	1.37	нд	нд	под LOQ	под LOQ
	Стара планина	X ср.		137.67				
		SD	нд	0.95	нд	нд	под LOQ	под LOQ
Черна боровинка 2012	Родопи	X ср.	100.08	79.13	66.25		12.16	21.78
		SD	0.58	0.66	0.52	нд	0.60	0.47
	Стара планина	X ср.	94.13	76.08	65.31		11.41	19.76
		SD	0.60	0.90	0.49	нд	0.69	0.37
Червена боровинка 2012	Родопи	X ср.		153.19				
		SD	нд	1.37	нд	нд	под LOQ	под LOQ
	Стара планина	X ср.		151.67				
		SD	нд	0.95	нд	нд	под LOQ	под LOQ
Черна боровинка 2013	Родопи	X ср.	98.08	78.79	64.08		12.00	20.38
		SD	0.86	0.71	0.42	нд	0.64	0.41
	Стара планина	X ср.	92.16	74.61	63.31		11.14	16.76
		SD	0.90	0.99	0.48	нд	0.60	0.37
Червена боровинка 2013	Родопи	X ср.		140.19				
		SD	нд	1.37	нд	нд	под LOQ	под LOQ
	Стара планина	X ср.		138.67				
		SD	нд	0.95	нд	нд	под LOQ	под LOQ

антоцианидини, mg/100 g fw; SD - стандартно отклонение на съдържанието на антоцианидини; нд - не се детектира; >LOQ - под границата на количествено определяне

Съдържанието на антоцианидини в черната боровинка с произход Китай за 2009 г. е както следва: делфинидин 84.2 mg/100g fw, цианидин 56.3 mg/100g fw, петунидин 47.2 mg/100g fw, пеонидин 11.3 mg/100g fw и малвидин 5.3 mg/100g fw. Получените резултати показват, че

средното съдържание на антоцианидини в черна боровинка с произход България е по-високо спрямо черна боровинка с произход Китай като е отчетена следната зависимост: количеството на делфинидин, цианидин, петунидин, пеонидин и малвидин е съответно с 13, 20, 19, 27 и 40% по-високо при българските плодове. Общото съдържание на антоцианидини, установено в черна боровинка с произход Стара планина е 235 mg/100 g fw и 245 mg/100 g fw с произход Родопи, което е съпоставимо с публикуваните резултати от други автори (Burdulis et al. 2007; Jovančević et al. 2011). При сравнение между двата района прави впечатление, че средното съдържание на антоцианидини за периода 2009 - 2013 г. в черна и червена боровинка с произход Стара планина е с 5% по-ниско спрямо плодовете от Родопите.

Количеството на делфинидин, цианидин, петунидин, пеонидин и малвидин в черна боровинка с произход Родопи за 2012 г. е съответно с 12, 29, 32, 71 и 69% по-високо спрямо 2010 г., респективно при тази с произход Стара планина е 7, 26, 33, 83 и 42%. Количеството на цианидин в червена боровинка с произход Родопи за 2012 г. е 14%, а при тази с произход Стара планина е 15%. В резултат на проведените изследвания за период от 5 години (2009 - 2013 г.) е установено, че основен фактор оказващ влияние върху съдържанието на антоцианидини е съвкупността от т. нар климатични елементи валежи: температура, вятър, атмосферно налягане (тежест на въздуха), количество валежи. Тази зависимост е сходна с проучванията на водещи научни колективи (Ballinger et al., 1972; Ballington et al., 1988a,b; Jaakola et al., 2004; Giovanelli and Buratti, 2009).

4. Определяне на флавоноли, флавони и флаванони в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез HPLC-UV

Съдържанието на анализираниите флавоноиди в екстракти от плодове на червена и черна боровинка с произход Стара планина и Родопи за периода 2009 - 2013 г. и Китай (2009 г.) е представено в табл. 23. Количествено са определени три основни класа флавоноиди - флавоноли, флавони и флаванони.

Табл. 23 Съдържание на флавоноиди (mg/100 g fw) в екстракти от плодове на червена и черна боровинка

Вид	Место обитание	Година	Мирицетин		Хесперитин		Кверцетин		Лутеолин		Кемферол		Апигенин	
			x _{cp}	sd	x _{cp}	sd	x _{cp}	sd	x _{cp}	sd	x _{cp}	sd	x _{cp}	sd
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	1	2009	8.05	0.59	5.20	0.45	87.56	0.55	12.94	0.27	6.57	0.31	16.57	0.55
	2	2010	6.90	0.67	3.64	0.48	84.88	0.44	12.27	0.35	4.58	0.22	14.43	0.23
	3	2011	7.05	0.24	4.60	0.52	86.20	0.45	12.78	0.29	5.14	0.21	15.52	0.44
	4	2012	8.90	0.62	5.46	0.47	91.93	0.57	13.58	0.28	6.90	0.32	17.40	0.58
	5	2013	8.22	0.61	5.35	0.46	90.10	0.56	13.31	0.28	6.76	0.32	17.05	0.57
	6	2009	9.14	0.47	6.79	0.54	91.50	0.58	15.30	0.51	7.31	0.33	20.25	0.26
	7	2010	7.33	0.60	5.22	0.59	86.18	0.31	12.63	0.27	6.03	0.18	17.68	0.21
	8	2011	8.77	0.51	5.71	0.52	88.71	0.47	14.60	0.42	6.73	0.21	19.17	0.24
	9	2012	9.69	0.49	7.13	0.56	96.07	0.61	16.07	0.54	7.68	0.35	21.27	0.27
	10	2013	9.23	0.48	6.99	0.55	94.15	0.60	15.75	0.53	7.52	0.34	20.84	0.27
	11	2009	7.88	0.45	6.57	0.52	88.50	0.56	14.80	0.50	7.07	0.32	19.59	0.25
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	21	2009	85.76	0.43	22.15	0.43	24.70	0.43	17.11	0.34	4.34	0.41	12.27	0.43
	22	2010	82.31	0.50	18.83	0.48	22.19	0.40	13.38	0.42	2.94	0.17	10.83	0.19
	23	2011	83.72	0.56	20.47	0.68	23.24	0.27	15.11	0.26	3.55	0.20	11.47	0.21
	24	2012	90.05	0.45	23.26	0.45	25.94	0.45	17.97	0.35	4.55	0.44	12.88	0.45
	25	2013	87.35	0.44	22.56	0.44	25.16	0.44	17.43	0.34	4.42	0.42	12.50	0.44
	26	2009	89.83	0.61	26.44	0.59	28.72	0.35	19.42	0.56	5.61	0.45	13.51	0.32
	27	2010	86.64	0.55	23.96	0.51	25.29	0.55	18.50	0.30	4.37	0.29	11.02	0.30
	28	2011	88.50	0.44	25.53	0.54	27.21	0.59	19.18	0.21	4.96	0.13	12.31	0.33
	29	2012	92.08	0.63	27.10	0.60	29.44	0.36	19.90	0.57	5.75	0.46	13.84	0.33
	30	2013	90.24	0.62	26.56	0.59	28.85	0.35	19.50	0.56	5.63	0.45	13.57	0.32
	31	2009	84.82	0.58	24.97	0.55	27.12	0.33	18.33	0.53	5.29	0.43	12.75	0.30

Съдържанието на мирицетин в червена боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. варира от 6.9 до 8.9 mg/100 g fw, респективно при тази с произход Родопи от 7.3 до 9.3 µg/g dw. Количеството на хесперитин в червена боровинка с произход Стара планина за

периода 2009-2013 г. е в интервала от 3.6 до 5.5 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 5.2 до 7.1 mg/100g fw. Съдържанието на кверцетин в червена боровинка с произход Стара планина е в рамките от 84.9 до 91.9 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 86.2 до 96.1 mg/100g fw. Количеството на лутеолин в червена боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. е в интервала от 12.3 до 13.6 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 12.6 до 16.1 mg/100g fw. Съдържанието на кемферол в червена боровинка с произход Стара планина е в рамките от 4.6 до 6.9 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 6.0 до 7.7 mg/100g fw. Количеството на апигенин в червена боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. е в интервала от 14.4 до 17.1 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 17.7 до 21.3 mg/100g fw. Получените резултати са съпоставими с тези публикувани от Hertog *et al.* 1992a Kahkonen *et al.* 1999a; Cuyckens & Claeys 2002, Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2011; Grace *et al.*, 2013. Количеството на мирицетин, хесперитин, кверцетин, лутеолин, кемферол и апигенин в червената боровинка с произход Китай за 2009 г. е както следва: 7.8, 6.6, 88.5, 14.8, 7.7 и 19.6 mg/100g fw.

Съдържанието на мирицетин в черна боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. варира от 82.3 до 90.1 mg/100 g fw, респективно при тази с произход Родопи от 86.6 до 92.1 µg/g dw. Количеството на хесперитин в черна боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. е в интервала от 18.8 до 23.2 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 24.0 до 27.1 mg/100g fw. Съдържанието на кверцетин в черна боровинка с произход Стара планина е в рамките от 22.2 до 25.9 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 25.3 до 29.4 mg/100g fw. Количеството на лутеолин в черна боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. е в интервала от 13.4 до 18.0 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 18.5 до 19.9 mg/100g fw. Съдържанието на кемферол в черна боровинка с произход Стара планина е в рамките от 2.9 до 4.6 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 4.4 до 5.9 mg/100g fw. Количеството на апигенин в черна боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. е в интервала от 10.8 до 12.9 mg/100g fw, а при тази с произход Родопи от 11.0 до 13.8 mg/100g fw. Получените резултати са съпоставими с тези публикувани от Kahkonen *et al.* 1999b; Ieri *et al.*, 2013. Количеството на мирицетин, хесперитин, кверцетин, лутеолин, кемферол и апигенин в черната боровинка с произход Китай за 2009 г. е както следва: 84.8, 24.9, 27.1, 18.3, 5.3 и 12.8 mg/100g fw.

Получените резултати показват, че средното съдържание на флавоноли, флаванони и флаволи в черна (172 mg/100g fw) и червена боровинка (142 mg/100g fw) с произход България за 2009 г. е съпоставимо с това на черна (174 mg/100g fw) и червена боровинка (144 mg/100g fw) с произход Китай.

Общото съдържание на флавоноли, флаванони и флаволи за периода 2009 - 2013 г., установено в червена боровинка с произход Стара планина е 136 mg/100 g fw, 148 mg/100 g fw в тази с произход Родопи, респективно в черна боровинка с произход Стара планина е 164

mg/100 g fw, 180 mg/100 g fw в тази с произход Родопи. Данните съвпадат с публикуваните резултати от други автори (Kalt & McDonald, 1996; Vvedenskaya *et al.*, 2004; Burdulis *et al.*, 2007; Jovancevic *et al.*, 2011; Vrhovsek *et al.*, 2012). При сравнение между двата района прави впечатление, че средното съдържание на флавоноли, флаванони и флаволи за периода 2009 - 2013 г. в черна и червена боровинка с произход Стара планина е съответно с 10 и 9% по - ниско спрямо плодовете от Родопите. Количеството на мирицетин, хесперитин, кверцетин, лутеолин, кемферол и апигенин в червена боровинка с произход Родопи за 2012 г. е съответно с 32, 36, 11, 27, 27 и 20% по-високо спрямо 2010 г., респективно при тази с произход Стара планина е 50, 8, 10, 48 и 20%. Количеството на мирицетин, хесперитин, кверцетин, лутеолин, кемферол и апигенин в черна боровинка с произход Родопи за 2012 г. е съответно с 6, 13, 16, 7, 31 и 26% по-високо спрямо 2010 г., респективно при тази с произход Стара планина е 9, 23, 17, 34, 50 и 19%.

В резултат на проведените изследвания за период от 5 години (2009 - 2013 г.) е установено, че основен фактор оказващ влияние и върху съдържанието на мирицетин, хесперитин, кверцетин, лутеолин, кемферол и апигенин е съвкупността от т. нар климатични елементи валежи: температура, вятър, атмосферно налягане (тежест на въздуха), количество валежи. Тази зависимост е сходна с проучванията на водещи научни колективи (Vänninen *et al.*, 1988; Kalt *et al.*, 2001; Stefova *et al.*, 2001; Jaakola *et al.*, 2004; Giovanelli & Buratti, 2009; Wang *et al.*, 2015).

5. Определяне съдържанието на антоциани в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез LC-ESI-MS

Съдържанието на антоциани, изразено в mg/100 g dw в плодове от червена и черна боровинка с произход Стара планина и Родопи за периода 2009 - 2103 г., Китай (2009 г.), Стара планина, Родопи, Витоша, Рила и Норвегия (2015 г.) е систематизирано в Табл. 24-28.

В червената боровинка са установени и количествено определени три гликозидни производни (глюкозид, галактозид и арабинозид) на цианидин (Jackman *et al.*, 1987; Kyle & Duthie, 2006). Съдържанието на цианидин галактозид в червена боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. варира от 258.2 до 279.1 mg/100g dw, респективно при тази с произход Родопи от 262.5 до 280.1 mg/100g dw. Количеството на цианидин галактозид в червената боровинка с произход Китай за 2009 г. е 255.1 mg/100g dw, което е с 8% по - ниско в сравнение със средното съдържание на този антоцианин в българските червени боровинки за 2009

г.

Табл. 24 Съдържание на антоциани (mg/100g dw) в екстракти от плодове на червена боровинка с произход Стара планина и Родопи за периода 2009-2013 г., Китай (2009), България и Норвегия (2015 г.)

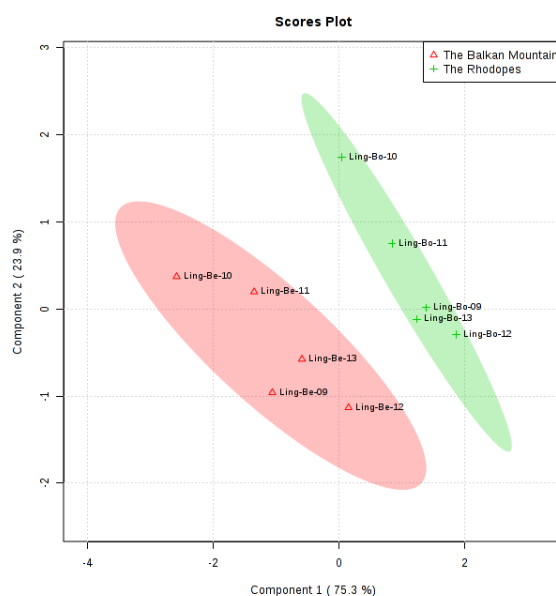
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.							
Местообитание	Година	Цианидин-3-О-		Цианидин-3-О-		Цианидин-3-О-	
		х _{ср}	ст.о.	х _{ср}	ст.о.	х _{ср}	ст.о.
Стара планина	2009	272.26	41.17	55.90	8.16	98.04	17.14
	2010	258.19	42.00	52.33	8.32	95.19	17.48
	2011	260.39	40.35	54.58	8.00	96.47	16.79
	2012	279.03	42.77	58.09	8.48	99.23	17.80
	2013	274.16	42.42	56.35	8.40	98.45	17.65
Родопи	2009	277.32	43.05	57.15	8.53	100.09	17.92
	2010	262.54	41.59	55.11	8.36	97.65	17.56
	2011	271.13	42.42	56.05	8.53	98.27	17.92
	2012	280.05	40.75	59.81	8.20	101.14	17.21
	2013	278.13	43.20	57.28	8.69	99.77	18.25
Китай	2009	255.11	42.84	50.44	8.62	100.33	18.09
Стара планина	2015	286.45	40.17	55.13	7.77	100.06	16.32
	2015	292.18	40.97	56.23	7.93	102.06	16.65
Рила	2015	280.72	39.37	54.03	7.61	98.06	15.99
Родопи	2015	297.56	41.73	57.27	8.07	103.94	16.95
	2015	295.10	41.38	56.79	8.00	103.08	16.81
Витоша	2015	299.53	42.00	57.65	8.12	104.63	17.07
Gol (Gutigard skog)	2015	291.74	40.35	55.38	7.80	100.51	16.39
Stjørdal (Rådal)	2015	298.49	41.16	56.49	7.96	102.52	16.72
Bardu	2015	306.83	42.19	57.90	8.16	105.08	17.14

Съдържанието на цианидин галактозид в червена боровинка с произход Норвегия (2015 г.) се движи в интервала от 291.7 до 306.8 mg/100g dw. Наблюдава се увеличение с 6% в посока юг - север. Количеството на цианидин галактозид в червената боровинка с произход България (2015 г.) е в рамките от 280.7 до 299.5 mg/100g dw. Установено е увеличение с 6% с нарастване на надморската височина (от 1460 до 2060 m). Съдържанието на цианидин глюкозид в червена боровинка с произход Стара планина за периода 2009-2013 г. варира от 52.3 до 58.0 mg/100g dw, респективно при тази с произход Родопи от 55.1 до 59.81 mg/100g dw. Количеството на цианидин глюкозид в червената боровинка с произход Китай за 2009 г. е 50.4 mg/100g dw, което е с 11% по - ниско в сравнение със средното съдържание на този антоцианин в българските червени боровинки за 2009 г. Съдържанието на цианидин глюкозид в червена боровинка с произход Норвегия (2015 г.) се движи в интервала от 55.4 до 57.9 mg/100g dw. Наблюдава се увеличение с 6% в посока юг - север. Количеството на цианидин глюкозид в червената боровинка с произход България (2015 г.) е в рамките от 54.3 до 57.6 mg/100g dw. Установено е увеличение с 6% с нарастване на надморската височина (от 1460 до 2060 m). Съдържанието на цианидин арабинозид в червена боровинка с произход Стара планина за

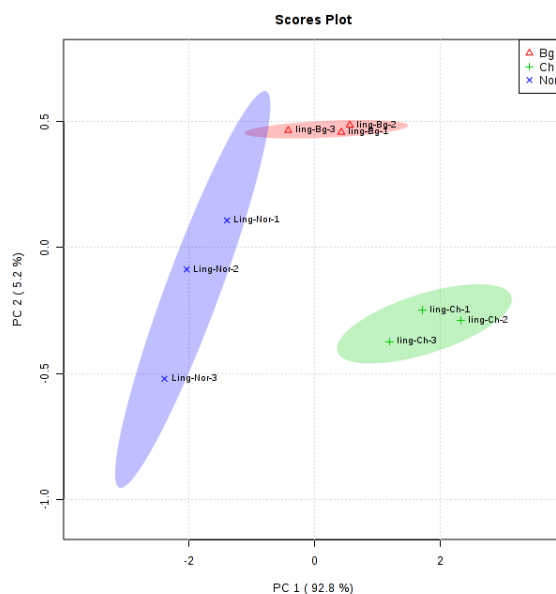
периода 2009-2013 г. варира от 95.2 до 99.2 mg/100g dw, респективно при тази с произход Родопи от 97.7 до 101.1 mg/100g dw. Количеството на цианидин арабинозид в червената боровинка с произход Китай за 2009 г. е 100.3 mg/100g dw, което е съпоставимо със средното съдържание на този антоцианин в българските червени боровинки за 2009 г. Съдържанието на цианидин глюкозид в червена боровинка с произход Норвегия (2015 г.) се движи в интервала от 100.5 до 105.1 mg/100g dw. Наблюдава се увеличение с 5% в посока юг - север. Количеството на цианидин арабинозид в червената боровинка с произход България (2015 г.) е в рамките от 98.6 до 103.9 mg/100g dw. Установено е увеличение с 5% с нарастване на надморската височина (от 1460 до 2060 m). Получените резултати са съпоставими с тези публикувани от Kahkonen *et al.*, 2003; Maatta-Riihinen *et al.*, 2004b; Kim *et al.*, 2005a.

Разграничаването, базирано на хеометрията е представено на Фиг. 30 - 32. Като статистически подход е използван анализа по главния компонент (Principal Component Analysis), а класификационния анализ (Classification Analysis) като техника за многовариационно сравнение (Multivariate Exploratory Technique). Резултатите от класификационните анализи показват, че образците могат да се разграничат като се определи географския произход на плодовете.

Анализите по основния компонент (PCA) представят вариацията в концентрациите на антоцианите в плодовете на червената боровинка за периода 2009-2013 г. (Фиг. 32) и по отношение на географския регион (България, Норвегия и Китай (Фиг. 33). PC 1 и PC 2 (Фиг. 32) са съответно 75.3 и 23.9% като представляват 99% от общото разсейване, респективно PC 1 и PC 2 (Фиг. 33) 92.8 и 5.2% съставят 98% от общото разсейване. Получените данни доказват превес на генетичния фактор.



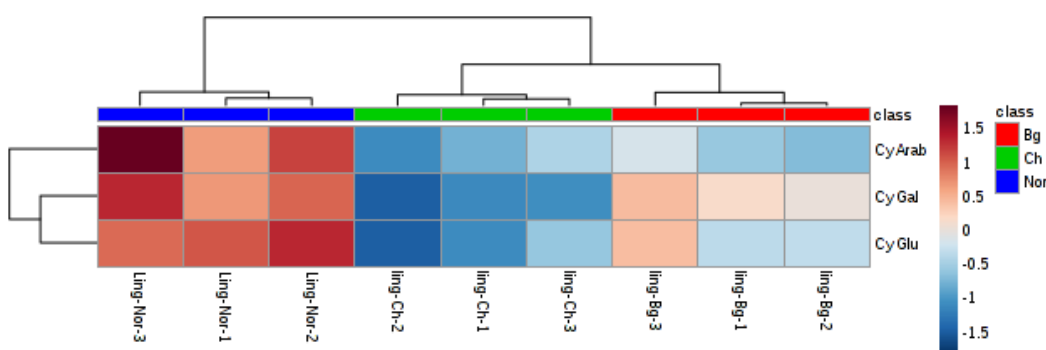
Фиг. 32 PLSDA на изследваните антоциани в плодове от червена боровинка с произход Стара планина и Родопи за периода 2009 - 2013 г.



Фиг. 33 PLSDA на изследваните антоциани в плодове от червена боровинка с произход България, Норвегия и Китай

Хеометричният подход, използващ анализа по главните компоненти, е ефективен, защото данните се разделят на групи, съответстващи на дадения географския район.

„Heat map” (Фиг. 34) демонстрира групирането на изследваните екземпляри в зависимост от техния произход. Наблюдават се два главни клъстера с три основни групи, като образците от България и Китай се групират в два под-клъстера, ясно разграничени едни от друг в рамките на самия клъстер. Това се обяснява със сходните нива на цианидин арабинозид. Концентрацията на цианидин галактозид и цианидин глюкозид е значително по-висока.



Фиг. 34 „Heat map” на изследваните антоциани в плодове от червена боровинка с произход България, Норвегия и Китай

В черната боровинка са установени и количествено определени петнадесет гликозидни производни (глюкозиди, галактозиди и арабинозиди) на делфинидин, цианидин, пеонидин, петунидин и малвидин.

Табл. 25 Съдържание на антоциани в екстракти от плодове на черна боровинка с произход Стара планина и Родопи за периода 2009-2013 г.

<i>Vaccinium myrtillus</i> L. Стара планина										
Наименование	2009		2010		2011		2012		2013	
	X _{ср.}	ст.о.	X _{ср.}	ст.о.	X _{ср.}	ст.о.	X _{ср.}	ст.о.	X _{ср.}	ст.о.
Делфинидин-3-О-галактозид	84.57	13.44	81.18	13.71	82.87	13.85	85.42	13.31	83.71	13.17
Делфинидин-3-О-глюкозид	655.51	94.33	629.29	96.22	642.40	97.18	662.13	93.39	648.89	92.45
Цианидин-3-О-галактозид	222.84	37.28	213.93	38.03	218.38	38.41	225.09	36.91	220.59	36.54
Делфинидин-3-О-арабинозид	92.10	8.15	88.42	8.31	90.26	8.40	93.03	8.07	91.17	7.99
Цианидин-3-О-глюкозид	510.19	88.82	489.78	90.60	499.98	91.50	515.34	87.93	505.03	87.05
Петунидин-3-О-галактозид	16.46	0.55	15.40	0.56	15.93	0.57	16.73	0.54	16.20	0.54
Цианидин-3-О-арабинозид	71.55	10.03	68.69	10.23	70.12	10.33	72.27	9.93	70.82	9.83
Петунидин-3-О-глюкозид	16.02	2.67	15.38	2.72	15.70	2.75	16.18	2.64	15.86	2.62
Пеонидин-3-О-галактозид	13.37	2.33	11.24	2.38	12.30	2.40	13.91	2.31	12.83	2.28
Петунидин-3-О-арабинозид	14.73	4.29	14.14	4.38	14.44	4.42	14.88	4.25	14.58	4.20
Пеонидин-3-О-глюкозид	53.52	7.71	51.38	7.86	52.45	7.94	54.06	7.63	52.98	7.56
Малвидин-3-О-галактозид	17.02	2.86	16.34	2.92	16.68	2.95	17.19	2.83	16.85	2.80
Пеонидин-3-О-арабинозид	14.78	2.19	14.19	2.23	14.49	2.26	14.93	2.17	14.63	2.15
Малвидин-3-О-глюкозид	42.85	8.29	41.13	8.46	41.99	8.54	43.28	8.21	42.41	8.13
Малвидин-3-О-арабинозид	25.80	4.38	24.77	0.32	25.28	0.32	26.06	4.34	25.54	4.29
<i>Vaccinium myrtillus</i> L. Родопи										
Делфинидин-3-О-галактозид	86.68	14.25	84.08	13.53	83.04	14.08	91.01	14.96	89.19	14.66
Делфинидин-3-О-глюкозид	671.90	99.99	651.74	94.97	643.68	98.79	705.49	104.99	691.38	102.89
Цианидин-3-О-галактозид	228.41	39.52	221.56	37.53	218.82	39.04	239.83	41.49	235.03	40.66
Делфинидин-3-О-арабинозид	94.40	8.64	91.57	8.20	90.44	8.54	99.12	9.07	97.14	8.89
Цианидин-3-О-глюкозид	522.94	94.15	507.25	89.42	500.98	93.02	549.09	98.86	538.11	96.88
Петунидин-3-О-галактозид	16.87	0.58	16.37	0.55	16.17	0.58	17.72	0.61	17.36	0.60
Цианидин-3-О-арабинозид	73.34	10.63	71.14	10.10	70.26	10.50	77.00	11.16	75.46	10.94
Петунидин-3-О-глюкозид	16.42	2.83	15.93	2.69	15.73	2.80	17.24	2.97	16.89	2.91
Пеонидин-3-О-галактозид	13.71	2.47	13.29	2.35	13.13	2.44	14.39	2.59	14.10	2.54
Петунидин-3-О-арабинозид	15.10	4.55	14.65	4.32	14.47	4.49	15.85	4.77	15.54	4.68
Пеонидин-3-О-глюкозид	54.86	8.17	53.21	7.76	52.55	8.07	57.60	8.58	56.45	8.41
Малвидин-3-О-галактозид	17.44	3.03	16.92	2.88	16.71	3.00	18.32	3.18	17.95	3.12
Пеонидин-3-О-арабинозид	15.15	2.32	14.70	2.20	14.51	2.29	15.91	2.44	15.59	2.39
Малвидин-3-О-глюкозид	43.92	8.79	42.60	8.35	42.07	8.68	46.11	9.23	45.19	9.04
Малвидин-3-О-арабинозид	26.44	4.64	25.65	0.32	25.33	4.59	27.77	4.87	27.21	5.11

В унисон със заключенията от публикувани изследвания (Moze *et al.*, 2011; Juadjur & Winterhalter, 2012), редът на елуиране на аглюконите, свързани с еднакъв захарен остатък е: делфинидин < цианидин < петунидин < пеонидин < малвидин, като най - напред се елуират галактозидите, следвани от глюкозидите и накрая арабинозидите Gao & Mazza, 1994a,b; Govindaraghavan, 2014.

Производните на делфинидин и цианидин представляват 70% от общото съдържание на антоциани в плодовете на черната боровинка, докато на производните на пеонидин са в най - малко количество. (Wu & Prior, 2005; Primetta *et al.*, 2013; Prencipe *et al.*, 2014; Ancillotti *et al.*,

2016). Съдържанието на глюкозидите в плодовете на черната боровинка е $42 \pm 10\%$, на галактозидите е $34 \pm 5\%$, респективно на арабинозидите е $24 \pm 3\%$ (Latti *et al.* 2011).

Общото съдържание на антоциани за периода 2009 - 2013 г. в черна боровинка с произход Стара планина е 1851.3 mg/100g dw, а при тази с произход Родопи 1897.6 mg/100g dw. Общото съдържание на антоциани за 2009 г. в черна боровинка с произход Китай е с 5% по - ниско в сравнение с това при българските плодове.

Общото съдържание на антоциани за 2015 г. в черна боровинка с произход България е както следва: 1951.5, 1961.2, 1999.4, 2019.3, 2069.1 и 2075.9 mg/100g dw - установено е увеличение със 7% с нарастване на надморската височина (от 1460 до 1950 m), респективно в тази с произход Норвегия: 2014.4, 2059.2 и 2137.2 mg/100g dw - нараства със 7 % в посока юг - север, т. е. с географската ширина. Получените данни са съпоставими с публикуваните резултати от автори, изследвали грузински (Sellappan *et al.*, 2002), естонски (Burdulis *et al.* 2007), финландски, норвежки и турски (Lätti, *et al.*, 2011), черногорски (Jovancevic *et al.* 2011), македонски (Stefkov *et al.*, 2014) И сръбски (Veberic *et al.*, 2015) представители на този вид. От друга страна при сравнение между двете страни прави впечатление, че общото съдържание на антоциани за 2015 г. в черна боровинка с произход Норвегия е със 7% по - високо в сравнение с това на черна боровинка с произход България.

Табл. 26 Съдържание на антоциани в екстракти от плодове на черна боровинка с произход Китай

<i>Vaccinium myrtillus</i> L. Китай, 2009								
	Делфинидин-3- О-галактозид	Делфинидин-3- О-глюкозид	Цианидин-3-О- галактозид	Делфинидин-3- О-арабинозид	Цианидин-3-О- глюкозид	Петунидин-3- О-галактозид	Цианидин-3-О- арабинозид	Петунидин-3- О-глюкозид
$\bar{x}_{cp}$	84.08	651.74	221.56	91.57	507.25	16.37	71.14	15.93
ст.о.	13.82	96.99	38.33	8.38	91.32	0.57	10.31	2.75
	Пеонидин-3-О- галактозид	Петунидин-3-О- арабинозид	Пеонидин-3-О- глюкозид	Малвидин-3-О- галактозид	Пеонидин-3-О- арабинозид	Малвидин-3- О-глюкозид	Малвидин-3- О-арабинозид	
$\bar{x}_{cp}$	13.29	14.65	53.21	16.92	14.70	42.60	25.65	
ст.о.	2.40	4.41	7.93	2.94	2.25	8.52	4.50	

Табл. 27 Съдържание на антоциани в екстракти от плодове на черна боровинка с произход Стара планина, Родопи, Витоша и Рила (2015 г.)

		29	30	31	32	33	34
Делфинидин-3-О-галактозид	х _{ср}	83.22	87.38	89.05	90.71	88.21	91.54
	ст.о.	13.14	13.80	14.06	14.32	13.93	14.45
Делфинидин-3-О-глюкозид	х _{ср}	666.37	699.69	713.02	726.34	706.35	733.01
	ст.о.	96.33	101.15	103.07	105.00	102.11	105.96
Цианидин-3-О-галактозид	х _{ср}	222.55	233.68	238.13	242.58	235.90	244.81
	ст.о.	38.71	40.65	41.42	42.19	41.03	42.58
Делфинидин-3-О-арабинозид	х _{ср}	512.16	537.77	548.01	558.25	542.89	563.38
	ст.о.	88.09	92.49	94.26	96.02	93.38	96.90
Цианидин-3-О-глюкозид	х _{ср}	71.03	74.58	76.00	77.42	75.29	78.13
	ст.о.	9.05	9.50	9.68	9.86	9.59	9.96
Петунидин-3-О-галактозид	х _{ср}	92.34	96.96	98.80	100.65	97.88	101.57
	ст.о.	15.19	15.95	16.25	16.56	16.10	16.71
Цианидин-3-О-арабинозид	х _{ср}	35.15	36.91	37.61	38.31	37.26	38.67
	ст.о.	6.02	6.32	6.44	6.56	6.38	6.62
Петунидин-3-О-глюкозид	х _{ср}	25.22	26.48	26.99	27.49	26.73	27.74
	ст.о.	4.33	4.55	4.63	4.72	4.59	4.76
Пеонидин-3-О-галактозид	х _{ср}	15.94	16.74	17.06	17.37	16.90	17.53
	ст.о.	2.06	2.16	2.20	2.25	2.18	2.27
Петунидин-3-О-арабинозид	х _{ср}	13.08	13.73	14.00	14.26	13.86	14.39
	ст.о.	1.98	2.08	2.12	2.16	2.10	2.18
Пеонидин-3-О-глюкозид	х _{ср}	52.37	54.99	56.04	57.08	55.51	57.61
	ст.о.	7.32	7.69	7.83	7.98	7.76	8.05
Малвидин-3-О-галактозид	х _{ср}	14.02	14.72	15.00	15.28	14.86	15.42
	ст.о.	2.12	2.23	2.27	2.31	2.25	2.33
Пеонидин-3-О-арабинозид	х _{ср}	16.18	16.99	17.31	17.64	17.15	17.80
	ст.о.	2.87	3.01	3.07	3.13	3.04	3.16
Малвидин-3-О-глюкозид	х _{ср}	42.41	44.53	45.38	46.23	44.95	46.65
	ст.о.	8.03	8.43	8.59	8.75	8.51	8.83
Малвидин-3-О-арабинозид	х _{ср}	25.14	26.40	26.90	27.40	26.65	27.65
	ст.о.	4.55	4.78	4.87	4.96	4.82	5.01

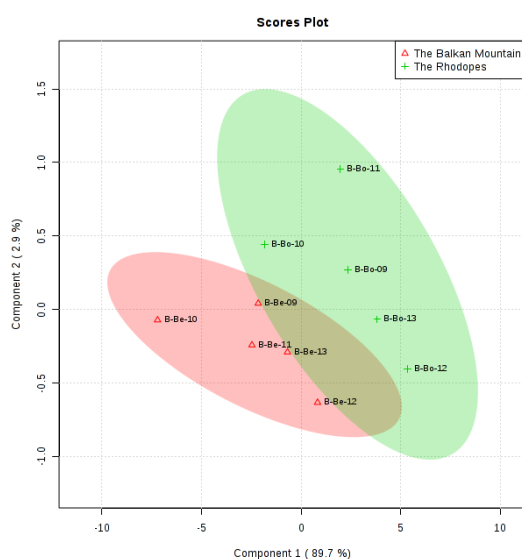
Табл. 28а Съдържание на антоциани в плодове от черна боровинка с произход Норвегия (2015 г.)

<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Dgal		Dgluc		Cygal		Cygluc		Cyarab		Darab		Petarab		Petgal	
	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd
Gol (Velta)	94.42	14.28	784.01	106.66	241.80	42.06	456.46	97.71	77.17	9.83	100.33	16.50	38.19	6.54	27.40	4.70
Stjørdal (Rådal)	96.68	14.63	798.11	107.28	247.85	43.11	467.87	98.10	79.10	10.08	102.84	16.92	39.15	6.70	28.09	4.82
Harstad (Bjørnråдалen)	101.00	15.00	842.69	109.96	254.04	44.19	479.57	100.56	81.08	10.33	105.41	17.34	40.12	6.87	28.79	4.94

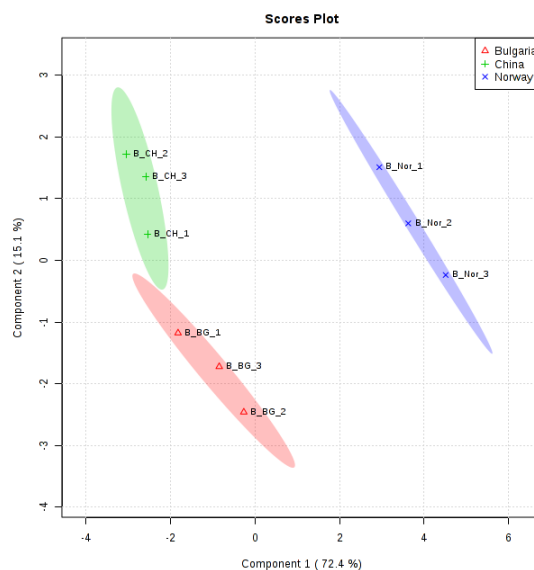
Табл. 28b Съдържание на антоциани в плодове от черна боровинка с произход Норвегия (2015 г.)

<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Petgluc		Pngal		Pngluc		Pnarab		Mvgal		Mvgluc		Mvarab	
	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd
Gol (Velta)	17.32	2.24	14.21	2.15	56.90	7.95	15.23	2.30	17.58	3.12	46.08	8.72	27.31	4.94
Stjørdal (Rådal)	17.75	2.29	14.57	2.21	58.32	8.15	15.61	2.36	18.02	3.20	47.23	8.94	28.00	5.07
Harstad (Bjørnråдалen)	18.20	2.35	14.93	2.26	59.78	8.36	16.00	2.42	18.47	3.28	48.41	9.17	28.70	5.19

Разликата между най-високата и най-ниската надморска височина в обследваните райони на България е 600 метра. Това оказва съществено влияние върху съдържанието на антоцианини в българските плодове. Наблюдаваното по - голямо отклонение в стойностите на този показател по отношение на отделните естествени местообитания се дължи на по - силно изразена генетична и екологична хетерогенност. Експериментално е доказано, че вегетативните представители на род *Vaccinium* L. растящи в открити пространства се характеризират с по - високо съдържание на въглерод спрямо тези, развиващи се на сенчести места (Akerstrom, 2010; Govindaraghan *et al.*, 2012). От своя страна изменението в съдържанието на въглерод води до промяна в растежа, репродукцията, концентрацията на хранителни вещества и химическата защита на растенията (Pearcy *et al.*, 1987). Jaakola *et al.*, (2004) отбелязват, че концентрацията на антоцианини, катехини, флавоноли и хидроксиканелени киселини е по - висока в листа от черна боровинка изложена на директна слънчева светлина. С нарастване на надморската височина се наблюдава пропорционално увеличение на полифенолното съдържание (Hohtola, 2007, Jaakola, & Hohtola, 2010; Uleberg *et al.*, 2012). Също така при височини над 1500 m, екип от италиански учени отчита по - високи стойности за общото антоцианово съдържание при диви италиански боровинки (Giovannelli & Buratti, 2009; Müller *et al.*, 2012). Анализите по основния компонент (РСА) представят вариацията в концентрациите на антоцианите в плодовете на черната боровинка за периода 2009-2013 г. (Фиг. 35) и по отношение на географския регион (България, Норвегия и Китай (Фиг. 36). РС 1 и РС 2 (Фиг. 35) са съответно (съответно 89.7 и 2.9.% като представляват 91.6% от общото разсейване, респективно РС 1 и РС 2 (Фиг. 36) 72.4 и 15.1% съставят 87.5% от общото разсейване. В заключение, образците се разграничават ясно въз основа на концентрацията на антоцианови вещества, като получените данни илюстрират доминирането на генетичния фактор.



Фиг. 35 PLSDA на изследваните антоциани в плодове от черна боровинка с произход Стара планина и Родопи за периода 2009 - 2013 г.



Фиг. 36 PLSDA на изследваните антоциани в плодове от черна боровинка с произход България, Норвегия и Китай

6. Определяне на проатоцианидини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка чрез LC-ESI-MS

Обобщените данни за идентифицираните общо 40 фенолни вещества във фракции „В” от плодове на червена и черна боровинка са представени в (Табл. 29).

Въз основа на получените данни за основните фрагментации, съединения **5**, **14** и **17** бяха идентифицирани като кафеена, пара-кумарова и ферулова киселина, респективно **1**, **2**, **11**, **19** и **25** като техни хексозиди ($[M - H]^-$ - 162 amu). Съединения **12** и **13** с m/z 353 бяха определени като хлорогенова и нехлорогенова на базата на характерната им фрагментация ($[M - H]^-$ - 162 amu). Интензивността на йон с m/z 191 в мас-спектъра на първата е 20%, а при втората 2%. Съединения **9**, **16**, **10** и **24** са стандартните вещества катехин, епикатехин (мономери), процианидин В1 и А1. **3**, **7**, **8**, **15**, **21**, **32** са идентифицирани (молекулен йон m/z 577; фрагментация: 451, 425, 407, 289) като „В” тип димери и количествено определени като процианидин В1 еквиваленти.

Съединения **15**, **35** са идентифицирани (молекулен йон m/z 865; фрагментация: 739, 695, 577, 525, 287) като „В” тип тримери и количествено определени като процианидин В1 еквиваленти. **18** и **20** са идентифицирани (молекулен йон m/z 575; фрагментация: 539, 449, 407, 289, 245) като „А” тип димери и количествено определени като процианидин А1 еквиваленти, а **4**, **6**, **22** и **34** са идентифицирани (молекулен йон m/z 863; фрагментация: 711, 693, 559, 451, 411) като „А” тип тримери и количествено определени като процианидин А1 еквиваленти.

Табл. 29 Идентифицирани компоненти във фракции „В” от черна и червена боровинка

Наименование	Време на задържане (min)	[M-H] ⁻	MS/MS ions
1 <i>para</i> -Кумарова к-на хексозид	1.45	325	187, 163
2 Кафеена к-на хексозид 1	1.52	341	179, 135
3 В тип димер	1.58	577	451, 425, 407, 289
4 А тип тример	1.63	863	711, 693, 559, 451, 411
5 Кафеена к-на	2.42	179	135
6 А тип тример	3.24	863	711, 693, 559, 451, 411
7 В тип димер	5.35	577	451, 425, 407, 289
8 В тип димер	5.88	577	451, 425, 407, 290
9 Катехин	5.56	289	245, 205
10 Процианидин В1	6.61	577	451, 425, 407, 289
11 Кафеена к-на хексозид 2	6.74	341	179, 135
12 Хлорогенова к-на	6.83	353	191
13 Неохлорогенова к-на	7.11	353	191
14 <i>para</i> -Кумарова к-на	7.18	163	119
15 В тип тример	7.20	865	739, 695, 577, 525, 287
16 Епикатехин	7.22	289	245, 205
17 Ферулова к-на	7.20	193	178, 149, 134
18 А тип димер	9.68	575	539, 449, 407, 289, 245
19 Ферулова к-на хексозид 1	9.81	355	193
20 А тип димер	10.22	575	539, 449, 407, 289, 245
21 В тип димер	10.46	577	451, 425, 407, 289
22 А тип тример	10.93	863	711, 693, 559, 451, 411
23 Кафеоиларбутин	11.74	433	323, 161
24 Процианидин А1	12.27	575	539, 449, 407, 289, 245
25 Ферулова к-на хексозид 2	12.32	355	193
26 Мирицетин-3- <i>O</i> -хексозид 1	12.46	479	317
27 Мирицетин-3- <i>O</i> -хексозид 2	12.57	479	317
28 Мирицетин-3- <i>O</i> -пентозид	12.64	449	317
29 Кверцетин-3- <i>O</i> -хексозид 1	12.72	463	301
30 Кверцетин-3- <i>O</i> -гликоронид	13.11	477	301
31 Кверцетин-3- <i>O</i> -хексозид 2	13.40	463	301
32 В тип димер	13.72	577	451, 425, 407, 289
33 Кверцетин-3- <i>O</i> -пентозид 1	14.33	433	301
34 А тип тример	15.66	863	711, 693, 559, 451, 411
35 В тип тример	15.70	865	739, 695, 577, 525, 287
36 Кверцетин-3- <i>O</i> -пентозид 1	15.83	433	301
37 Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид	15.92	447	301
38 Кемферол 3- <i>O</i> -хексозид 1	16.04	447	285
39 Кемферол 3- <i>O</i> -хексозид 2	16.11	447	285
40 Кемферол 3- <i>O</i> -рамнозид	16.18	431	285

Съединение **23** е идентифицирано като кафеоиларбутин (молекулен йон m/z 433; фрагментация: 323, 161). Определено е само в плодовете от червена боровинка. Мас-спектрите на **26** и **27** съдържат молекулен йон M^+ при m/z 479, който фрагментира до йон при m/z 317 ($[M - H]^-$ - 162 аму; загуба на хексозиден остатък). Съединенията са идентифицирани като мирицитин хексозиди (галактозид и глюкозид). Мас-спектърът на **28** съдържа молекулен йон M^+ при m/z 449, който фрагментира до йон при m/z 317 ($[M - H]^-$ - 132 аму; загуба на пентозиден остатък). Съединението е идентифицирано като мирицитин пентозид. Мас-спектрите на **29** и **31** съдържат молекулен йон M^+ при m/z 463, който фрагментира до йон при m/z 301 ($[M - H]^-$ - 162 аму; загуба на хексозиден остатък). Съединенията са идентифицирани като кверцетин хексозиди (галактозид и глюкозид). Мас-спектърът на **30** съдържа молекулен йон M^+ при m/z 477, който фрагментира до йон при m/z 301 ($[M - H]^-$ - 176 аму; загуба на гликорониден остатък). Съединението е идентифицирано като кверцетин гликоронид. Мас-спектрите на **33** и **36** съдържат молекулен йон M^+ при m/z 433, който фрагментира до йон при m/z 301 ($[M - H]^-$ - 132 аму; загуба на пентозиден остатък). Съединенията са идентифицирани като кверцетин пентозиди (арабинозид и ксилозид). Мас-спектърът на **37** съдържа молекулен йон M^+ при m/z 447, който фрагментира до йон при m/z 301 ($[M - H]^-$ - 146 аму; загуба на рамнозен остатък). Съединението е идентифицирано като кверцетин рамнозид. Мас-спектрите на **38** и **39** съдържат молекулен йон M^+ при m/z 447, който фрагментира до йон при m/z 285 ($[M - H]^-$ - 162 аму; загуба на хексозиден остатък). Съединенията са идентифицирани като кемферол хексозиди (галактозид и глюкозид). Мас-спектърът на **40** съдържа молекулен йон M^+ при m/z 431, който фрагментира до йон при m/z 285 ($[M - H]^-$ - 146 аму; загуба на рамнозен остатък). Съединението е идентифицирано като кемферол рамнозид. Съдържанието на проантоцианидини в плодове от червена и черна боровинка с произход България (2015 г.) и Норвегия (2015г.) е систематизирано в Табл. 30a,b. Червената боровинка се характеризира с по-високо съдържание на катехин и проантоцианидини от тип А, докато при черната преобладават епикатехин и проантоцианидини от тип В (Nonaka, 1989; Kalt & McDonald, 1996; Poon, 1998; Mueller-Harvey, 2001; USDA, 2004; Määttä-Riihinen *et al.*, 2005; Jungfer *et al.*, 2012; Kylli *et al.*, 2011; Mane *et al.*, 2011; Lowenthal *et al.*, 2013; Toomik *et al.*, 2014; Puigventós *et al.*, 2015). Общото съдържание на проантоцианидини в червена боровинка с произход България за шестте изследвани местообитания е както следва: 28.4, 27.3, 29.8, 31.3, 30.7 и 34.5 mg/g dw - установено е увеличение с 26% с нарастване на надморската височина (от 1470 до 2250 m), респективно в тази с произход Норвегия: 35.6, 36.6 и 38.5 mg/g dw нараства с 8 % в посока юг - север, т. е. с географската ширина. Получените данни са съпоставими с публикуваните резултати от различни научни колективи (Ek *et al.*, 2006; Fulcrand *et al.*, 2008; Hokkanen *et al.*, 2008; Ermis *et al.*, 2015). От друга страна при сравнение между двете страни прави впечатление, че общото съдържание на проантоцианидини за 2015 г. в червена боровинка с произход Норвегия е със 20% по - високо в сравнение с това на червена боровинка с произход България.

Табл. 30а Съдържание на проантоцианидини в екстракти от плодове на червена боровинка с произход България (2015 г.) и Норвегия (2015 г.)

<i>Vaccinium vitis idaea</i> L.																		
Наименование	край Беклемето, Стара планина		край х. Васильов, Стара планина		к. к. Боровец, Мусаленска пътека, Рила		под връх Перелик, Родопи		под такийска крепост Градище, Родопи		х. Алеко, пътека към Черни връх, Витоша		Gol (Gutigard skog), Норвегия		Stjørdal (Rådal), Норвегия		Bardu, Норвегия	
	Х _{ср}	ст. о	Х _{ср}	ст. о	Х _{ср}	ст. о	Х _{ср}	ст. о	Х _{ср}	ст. о	Х _{ср}	ст. о	Х _{ср}	ст. о	Х _{ср}	ст. о	Х _{ср}	ст. о
Катехин	3.98	0.14	3.83	0.13	4.18	0.14	4.39	0.15	4.30	0.15	4.84	0.16	4.99	0.17	5.14	0.18	5.39	0.19
Епикатехин	0.51	0.01	0.49	0.01	0.50	0.01	0.56	0.01	0.55	0.01	0.62	0.01	0.63	0.01	0.65	0.01	0.69	0.01
В тип димер	0.31	0.05	0.30	0.05	0.33	0.05	0.34	0.06	0.33	0.06	0.38	0.06	0.39	0.07	0.40	0.07	0.42	0.07
Процианидин В1	3.06	0.12	2.95	0.12	3.22	0.13	3.38	0.14	3.31	0.14	3.72	0.15	3.83	0.16	3.95	0.16	4.15	0.17
В тип димер	0.07	0.03	0.07	0.03	0.07	0.03	0.08	0.03	0.07	0.04	0.08	0.04	0.09	0.04	0.09	0.04	0.09	0.04
В тип димер	0.43	0.09	0.41	0.09	0.45	0.10	0.47	0.10	0.46	0.11	0.52	0.11	0.53	0.12	0.55	0.12	0.58	0.13
В тип димер	0.38	0.16	0.36	0.15	0.40	0.16	0.42	0.17	0.41	0.18	0.46	0.19	0.47	0.20	0.49	0.20	0.51	0.22
В тип димер	0.10	0.04	0.09	0.04	0.10	0.04	0.11	0.05	0.10	0.05	0.12	0.05	0.12	0.05	0.12	0.05	0.13	0.06
В тип тример	1.56	0.03	1.50	0.03	1.64	0.03	1.72	0.03	1.69	0.04	1.90	0.04	1.95	0.04	2.01	0.04	2.11	0.04
В тип тример	0.08	0.01	0.08	0.01	0.08	0.01	0.09	0.01	0.09	0.01	0.10	0.01	0.10	0.01	0.10	0.01	0.11	0.01
Процианидин А1	7.17	0.26	6.89	0.25	7.52	0.27	7.90	0.29	7.74	0.30	8.71	0.32	8.97	0.33	9.24	0.34	9.70	0.36
А тип димер	2.19	0.05	2.11	0.05	2.30	0.05	2.42	0.06	2.37	0.06	2.67	0.06	2.75	0.07	2.83	0.07	2.97	0.07
А тип тример	3.28	0.11	3.15	0.11	3.44	0.12	3.61	0.13	3.54	0.13	3.98	0.14	4.10	0.14	4.22	0.15	4.43	0.16
А тип тример	3.19	0.16	3.07	0.15	3.35	0.16	3.52	0.17	3.45	0.18	3.88	0.19	4.00	0.20	4.12	0.20	4.32	0.22
А тип тример	1.21	0.07	1.16	0.07	1.27	0.08	1.33	0.08	1.30	0.08	1.47	0.09	1.51	0.09	1.56	0.10	1.63	0.10
А тип тример	0.92	0.09	0.88	0.09	0.96	0.10	1.01	0.10	0.99	0.11	1.11	0.11	1.15	0.12	1.18	0.12	1.24	0.13
Общо	28.42		27.33		29.81		31.34		30.71		34.53		35.57		36.64		38.47	

Табл. 30b Съдържание на проантоцианидини в екстракти от плодове на черна боровинка с произход България (2015 г.) и Норвегия (2015 г.)

<i>Vaccinium myrtillus</i> L.																		
Наименование	край Беклемето, Стара планина		край х. Амбарица, Стара планина		к. к. Боровец, Мусаленска пътека, Рила		под връх Перелик, Родопи		край параклис "Света Марина" над с. Гела, Родопи		х. Алеко, пътека към Черни връх, Витоша		Gol (Velta), Норвегия		Stjørdal (Rådal), Норвегия		Harstad (Bjørnråдален), Норвегия	
	Х _{ср}	СТ. О	Х _{ср}	СТ. О	Х _{ср}	СТ. О	Х _{ср}	СТ. О	Х _{ср}	СТ. О	Х _{ср}	СТ. О	Х _{ср}	СТ. О	Х _{ср}	СТ. О	Х _{ср}	СТ. О
Катехин	0.79	0.14	0.76	0.14	0.78	0.14	0.80	0.14	0.79	0.14	0.82	0.14	0.83	0.15	0.84	0.15	0.85	0.15
Епикатехин	5.95	0.01	5.77	0.01	5.89	0.01	6.06	0.01	6.00	0.01	6.24	0.01	6.30	0.01	6.37	0.01	6.43	0.01
В тип димер	0.21	0.05	0.20	0.05	0.21	0.05	0.21	0.05	0.21	0.05	0.22	0.06	0.22	0.06	0.22	0.06	0.23	0.06
Процианидин В1	5.18	0.13	5.02	0.12	5.13	0.13	5.28	0.13	5.23	0.13	5.43	0.13	5.49	0.13	5.54	0.14	5.60	0.14
В тип димер	0.09	0.03	0.09	0.03	0.09	0.03	0.09	0.03	0.09	0.03	0.09	0.03	0.10	0.03	0.10	0.03	0.10	0.03
В тип димер	0.58	0.10	0.56	0.09	0.57	0.10	0.59	0.10	0.58	0.10	0.61	0.10	0.61	0.10	0.62	0.10	0.62	0.10
В тип димер	0.10	0.16	0.10	0.16	0.10	0.16	0.10	0.16	0.10	0.16	0.11	0.17	0.11	0.17	0.11	0.17	0.11	0.17
В тип димер	2.19	0.04	2.12	0.04	2.17	0.04	2.23	0.04	2.21	0.04	2.30	0.04	2.32	0.04	2.34	0.05	2.37	0.05
В тип тример	0.55	0.03	0.54	0.03	0.55	0.03	0.56	0.03	0.56	0.03	0.58	0.03	0.59	0.03	0.59	0.03	0.60	0.03
В тип тример	0.06	0.01	0.06	0.01	0.06	0.01	0.06	0.01	0.06	0.01	0.07	0.01	0.07	0.01	0.07	0.01	0.07	0.01
Процианидин А1	2.17	0.27	2.10	0.26	2.14	0.26	2.21	0.27	2.19	0.27	2.27	0.28	2.29	0.28	2.32	0.28	2.34	0.29
А тип димер	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
А тип тример	0.04	0.12	0.04	0.11	0.04	0.12	0.04	0.12	0.04	0.12	0.04	0.12	0.04	0.12	0.04	0.12	0.04	0.13
А тип тример	0.12	0.16	0.12	0.16	0.12	0.16	0.12	0.16	0.12	0.16	0.12	0.17	0.13	0.17	0.13	0.17	0.13	0.17
А тип тример	0.53	0.07	0.52	0.07	0.53	0.07	0.54	0.08	0.54	0.08	0.56	0.08	0.56	0.08	0.57	0.08	0.58	0.08
А тип тример	0.89	0.10	0.86	0.09	0.88	0.10	0.90	0.10	0.89	0.10	0.93	0.10	0.94	0.10	0.95	0.10	0.96	0.10
Общо	19.50		18.92		19.29		19.86		19.68		20.46		20.66		20.86		21.07	

Количеството на проантоцианидини в черна боровинка с произход България за шестте изследвани местообитания е както следва: 19.5, 18.9, 19.3, 19.9, 19.7 и 20.6 mg/g dw - установено е увеличение с 8% с нарастване на надморската височина (от 1470 до 2250 m), като тенденцията се запазва макар и не толкова силно изразена както при червената боровинка. В плодовете с произход Норвегия съдържанието на проантоцианидини в трите изследвани местообитания е: 20.6, 20.9 и 21.1 mg/g dw - нараства с 6 % в посока юг - север, т. е. с географската ширина. Получените данни са съизмерими с публикуваните резултати от други автори (Ballington, 2001; Anttonen & Karjalainen, 2005; Martz *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014 Neilson *et al.*, 2015).

При сравнение между двете страни прави впечатление, че общото съдържание на проантоцианидини за 2015 г. в черна боровинка с произход Норвегия е съпоставимо с това на черна боровинка с произход България.

7. Почвено-климатична характеристика на местообитанията на червена и черна боровинка

Проведени са комплексни анализи на почвени проби (агрохимични, физико-химични и механичен състав) от местонахожденията на изследваните плодове в Стара планина и Родопи. Анализирано е съдържанието на тежки метали, основните макро - и микроелементи, усвоимите форми на азот, фосфор и калий, реакцията на средата (pH във вода и KCl), общото количество органично вещество (хумус), степен на засоленост и съдържанието на мед, кадмий, цинк и манган.

Аналитичните данни свидетелстват, че почвите в двата района са слабо запасени с усвоими форми на азот и фосфор, добре запасени с усвоим калий, със слаба кисела реакция на средата. По механичен състав са пясъчливо - глинести. Преобладават едрите (пясъчливи) фракции. От данните се вижда, че всички изследвани проби имат близки стойности за съдържание на елементи - мед, кадмий, цинк и манган. Количеството на медта варира от 11,4 до 14,3 mg/kg, количеството на цинка се изменя в границите от 5,00 до 6,30 mg/kg, съдържанието на манган варира от 19,5 до 22,3 mg/kg, а количеството на кадмия показва значения под 0,5 mg/kg. Изследваните почвени проби не са замърсени с тежки метали.

В географско отношение, районът на България е разположен в Западно-Родопската област. Почвения състав включва кристалинни скали, седименти с плиоценска възраст, представени главно от чакъли, пясъци и слабо споени пясъчници. В климатично отношение районът попада в преходноконтиненталната климатична подобласт с абсолютни минимални и максимални средногодишни температури съответно -34,5 и +22,0 °C. Средната годишна сума на валежите е 550 mm. Максималните валежни суми са през м.юни, а минималните през м. февруари. Средният брой на дните с температура над 10 °C е между 122 и 145. Дължината на

вегетационния период е от 4 до 5 месеца. Последните пролетни слани падат през третата десетдневка на април, а понякога и по-късно. Най-ранните есенни слани падат във втората десетдневка на септември. Броят на дните без мраз в района е 124.

Изследваните местобитания на ягодоплодни видове в района на Беклемето са разположени на 1400 м н.в. във високите части на старопланинската верига. Релефът е много разнообразен, богат на форми и е типично планински. Скалният състав в района не се различава с голямо разнообразие, въпреки принадлежността на скалите към различни геоложки формации (долна Креда и Юра). Принадлежащите към главната, старопланинска верига части се характеризират с една надлъжна система от флексури, антиклинални и синклинални структури, усложнени с включения от аргилити и варовити мергели. Върху тези, силно изветрели скали са се формирали подтипове на кафявите горски почви. Среднопланинският подпояс на височина 1000-1500 м н.в. се характеризира със следния температурен режим: средната годишна температура е 5 °С, а абсолютните минимални и максимални средногодишни температури са съответно -23.5 °С и +32.0 °С. Средната годишна сума на валежите е 1031 мм., като максималните стойности са през м.юни, а минималните през м.февруари. Дните с трайна снежна покривка са средно 105. Средният брой на дните с температура над 10 °С е между 112 и 139. Дължината на вегетационния период е от 3 до 5 месеца. Последните пролетни слани падат през третата десетдневка на април, а понякога и по-късно. Най-ранните есенни слани падат в третата десетдневка на септември. Броят на дните без мраз в района е 158.

Извършените агрохимични и физико-химични анализи на почвените проби от района на Юндола и Беклемето показват сходни резултати, присъщи на кафявите горски почви. Установените различия в съдържанието на манган се дължи на факта, че те не са формирани при еднакви почвообразуващи условия и време. Киселите почви имат неблагоприятни химични, биологични и физични свойства. Колоидната част на киселите почви е бедна на калций. Вследствие на изместването на калция от йоните на водорода в почвения поглъщателен комплекс се увеличава неговата подвижност и дисперсност. Насищането на колоидните частици с водород постепенно ги разрушава. Тези обменни процеси дават възможност да се обясни по-ниското съдържание на колоидните фракции. Средното съдържание на манган в почвите е около 0,085%. Киселата реакция на почвата (при рН под 6) и нейната ниска буферна способност увеличава освобождаването и подвижността на мангана, както и неговата усвояемост от растенията. Почвата в района на Беклемето е с по-ниски стойности на потенциалната киселинност от тази в района на България, което определя и по-високо съдържание на подвижен манган.

8. Определяне на антивирусната активност на базовите екстракти и получените от тях фенолни фракции „В” и „С”

Изследваните базови екстракти се характеризират с ниска цитотоксичност. Имайки предвид цитотоксичния ефект на метанола, в който се разтварят предоставените проби,

максималната им концентрация, при която действието на метанола е пренебрежимо и не оказва видимо влияние върху клетъчния монослой е 1000 µg/mL. Съдържанието на метанол при тази концентрация е 0.2% и не оказва влияние върху морфологията и жизнеността на клетъчната култура. Установените максимално поносими концентрации (МТС) и 50% цитотоксични концентрации (CC₅₀) на съответните тотални екстракти са представени в Табл. 31.

Поради изключително ниската токсичност на предоставените екстракти не са достигнати тези концентрации, при които загиват 50% от клетките на клетъчния монослой (т.нар. 50% цитотоксична концентрация - CC₅₀). Показателят не е определен.

Табл. 31 Цитотоксичност на базовите екстракти за монослойни култури на клетъчните линии Нер-2 и MDCK.

Вид	МТС (µg/mL)	
	Нер-2	MDCK
Черна боровинка България	1000	320
Черна боровинка Китай	1000	1000
Червена боровинка България	1000	320
Червена боровинка Китай	1000	1000

В Табл. 32 е представена цитотоксичността на фракции "В" и „С“.

Прави впечатление, че фракция „С“ е със значително по-слаба цитотоксичност в сравнение с фракция "В".

Табл. 32 Цитотоксичност на фракции "В" и „С“ за монослойни култури на клетъчните линии Нер-2 и MDCK.

Фракция	Произход	МТС (µg/mL)		CC ₅₀ ± SD (µg/mL)	
		Нер-2	MDCK	Нер-2	MDCK
Фракция „В“	Черна боровинка България	10	32	29.2±3.6	57.28±18.0
	Черна боровинка Китай	10	10	31.37±2.32	33.88±3.48
	Червена боровинка България	10	10	27.81±1.81	35.23
	Червена боровинка Китай	10	100	28.33±5.91	>100
Фракция „С“	Черна боровинка България	32	100	>100	>100
	Черна боровинка Китай	32	100	>100	>100
	Червена боровинка България	32	100	>100	>100
	Червена боровинка Китай	32	100	>100	>100

Резултатите са представени в Табл. 33 и 34 и на фигури 37a-h. Ефектът е най-силно изразен при червената и черната боровинка от България, доста по-слаб при китайските боровинки. Антивирусният ефект на базовите екстракти срещу другия представител на ентеровирусите, полиовирус тип 1, е значително по-слаб. Налице е при червената боровинка, като е по-добре изразен при тази, произхождаща от България. Всички базови екстракти притежават антивирусен ефект и спрямо репликацията на грипния вирус. Той е изразен най-добре при екстракта от черна китайска боровинка, достигайки селективен индекс над 5. Добър ефект се установява и при екстракта от черна боровинка с произход от България. Той притежава и слабо изразен ефект срещу репликацията на респираторно - синцитиалния вирус. Останалите екстракти притежават много слабо изразен, почти граничен антивирусен ефект срещу HRSV.

Табл. 33 Антивирусен ефект на базовите екстракти

Вид и произход	CV-B1			PV-1			HRSV-A2			A(H3N2)		
	IC ₅₀ ^a	% ^b	SI ^c	IC ₅₀	%	SI	IC ₅₀	%	SI	IC ₅₀	%	SI
Черна боровинка България	-	10	-	-	-	-	-	20	-	25,24		>3,96
Черна боровинка Китай	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,34		>6,12
Червена боровинка България	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.29		>4,29
Червена боровинка Китай	-	-	-	-	-	-	-	15	-	29,98		>3,34

^a Стойността на IC₅₀ е в µg/mL. Стойностите представляват средни стойности от два независими експеримента с 6 повторения във всеки един от тях.

^b процент на инхибиция на вирусния цитопатичен ефект при най-високата нетоксична за клетките концентрация 1000 µg/mL, в случаите когато не може да се определи IC₅₀.

^c SI = CC₅₀/IC₅₀. Селективният индекс е по-висок от посочените стойности, защото поради ниската токсичност на тоталните екстракти не можа да бъде определена CC₅₀ и във формулата е ползвана стойността за МТС.

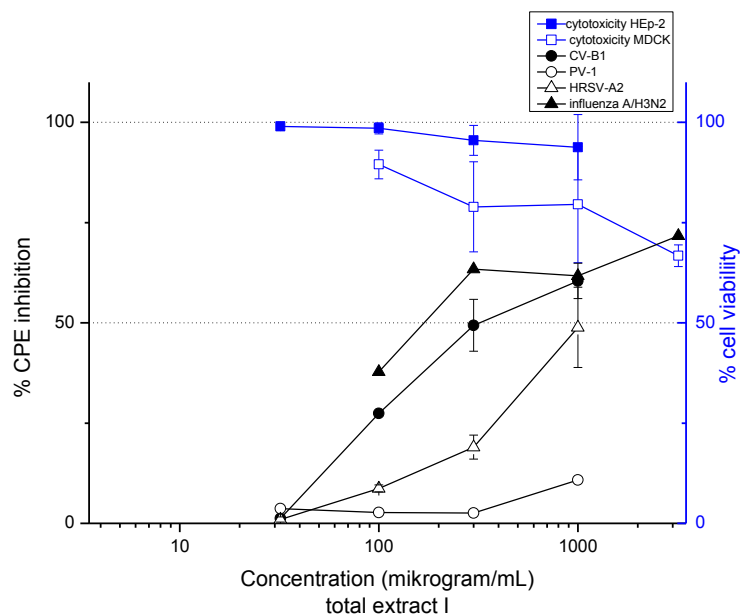
Табл. 34 Антивирусен ефект на фракции „С”.

Вид и произход	CV-B1			PV-1			HRSV-A2			A(H3N2)		
	IC ₅₀ ^a	% ^b	SI ^c	IC ₅₀	%	SI	IC ₅₀	%	SI	IC ₅₀	%	SI
Черна боровинка България	-	10	-	-	-	-	-	20	-	25,24	>3,96	
Черна боровинка Китай	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,34	>6,12	
Червена боровинка България	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23,29	>4,29	
Червена боровинка Китай	-	-	-	-	-	-	-	15	-	29,98	>3,34	

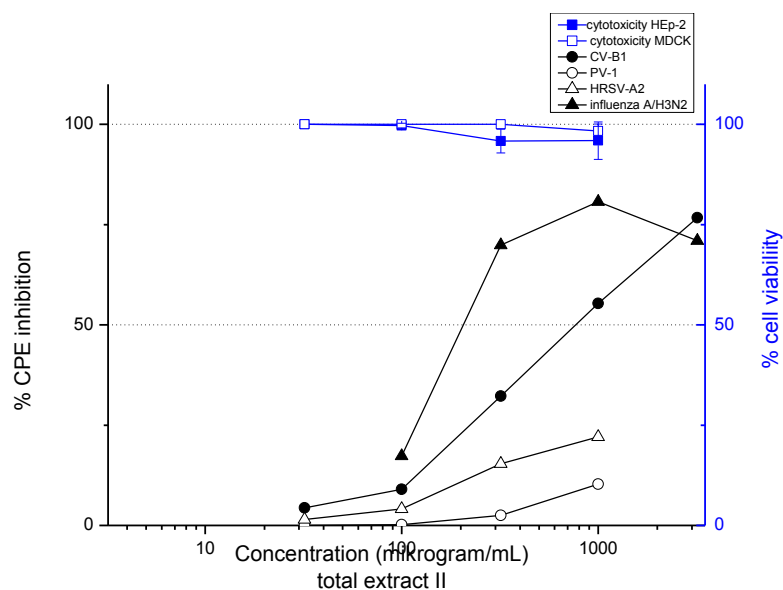
^a µg/mL. Стойностите представляват средни стойности от два независими експеримента с 6 повторения във всеки един от тях.

^b процент на инхибиция на вирусния цитопатичен ефект при най-високата нетоксична за клетките концентрация, съответно 32 µg/mL за клетки HEp-2 и 100 µg/mL за клетки MDCK, в случаите когато не може да се определи IC₅₀.

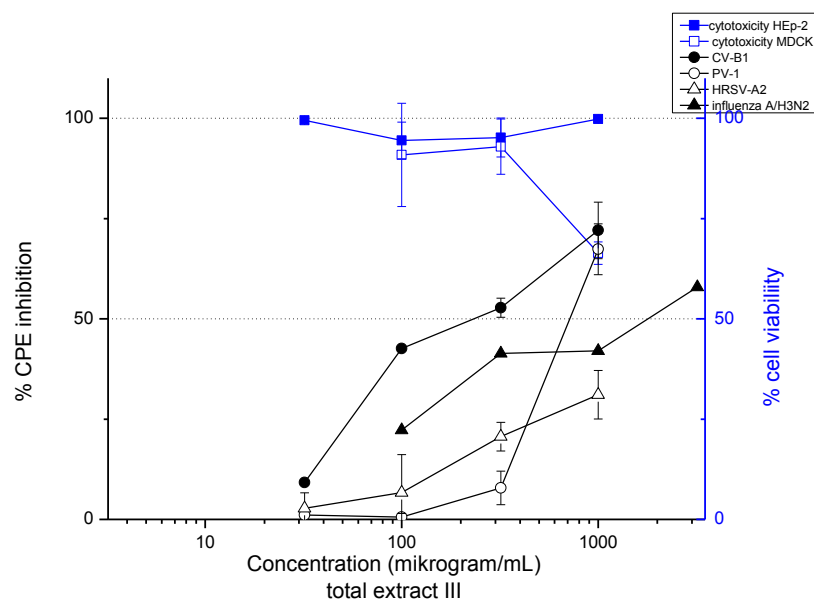
^c SI = CC₅₀/IC₅₀



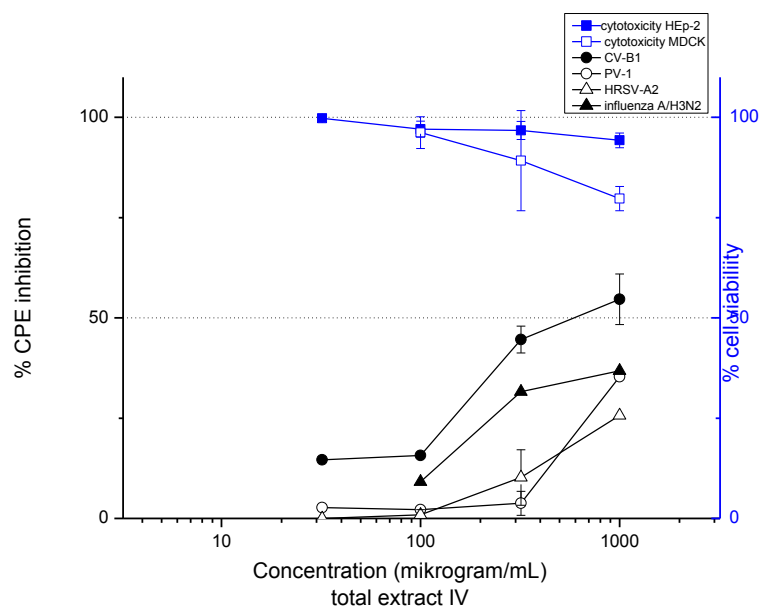
Фиг. 37а Ефект на тотален екстракт от черна боровинка с произход България върху репликацията *in vitro* на CV-B1, PV-1, HRSV-A2 и грипен вирус A/H3N2 (криви доза-отговор).



Фиг. 37b Ефект на тотален от черна боровинка с произход Китай върху репликацията *in vitro* на CV-B1, PV-1, HRSV-A2 и грипен вирус A/H3N2 (криви доза-отговор).

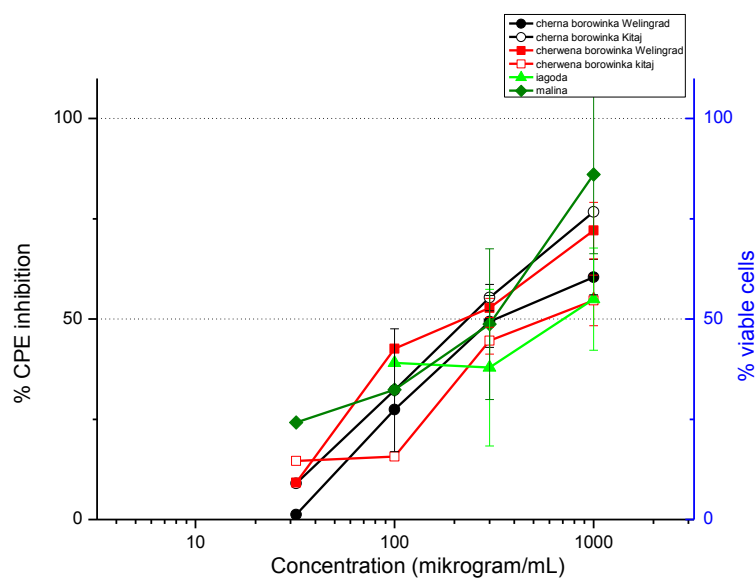


Фиг. 37c Ефект на тотален екстракт от червена боровинка с произход България върху репликацията *in vitro* на CV-B1, PV-1, HRSV-A2 и грипен вирус A/H3N2 (криви доза-отговор).

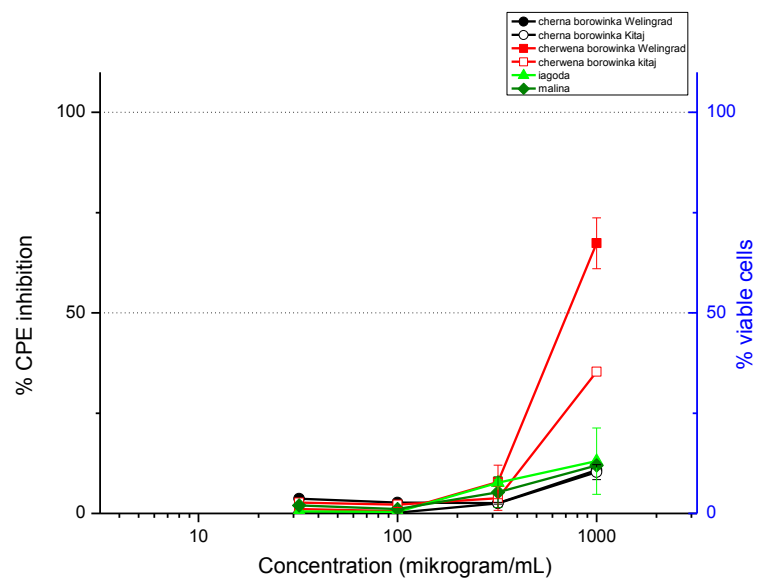


Фиг. 37d Ефект на тотален екстракт от червена боровинка с произход Китай върху репликацията *in vitro* на CV-B1, PV-1, HRSV-A2 и грипен вирус A/H3N2 (криви доза-отговор).

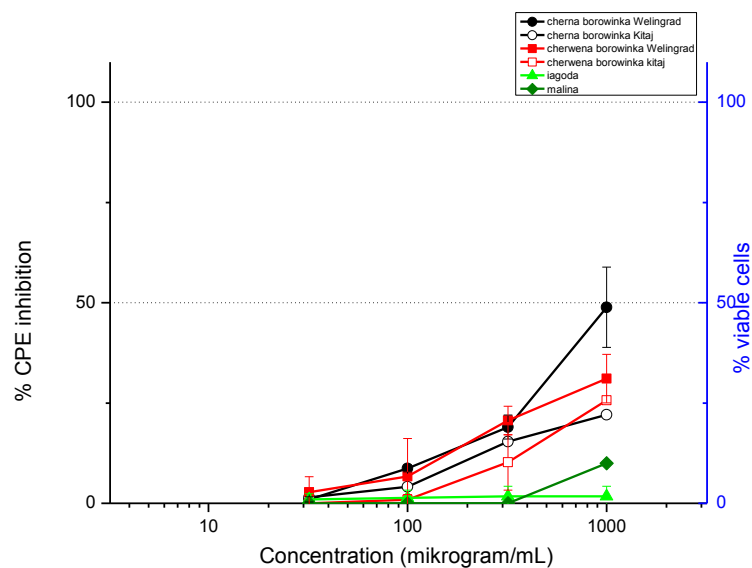
Резултатите представени по вируси.



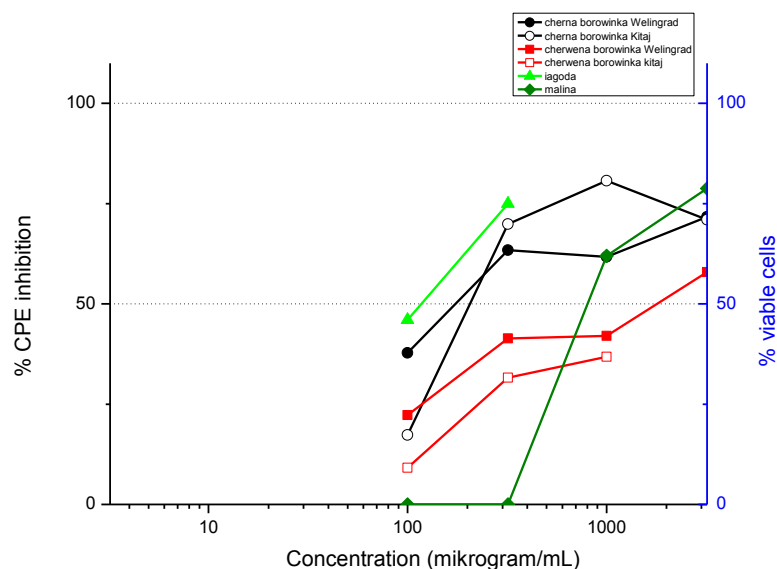
Фиг. 37е Ефект на базовите екстракти върху репликацията *in vitro* на CV-B1 (криви доза-отговор).



Фиг. 37f Ефект на базовите екстракти върху репликацията *in vitro* на PV-1 (криви доза-отговор).

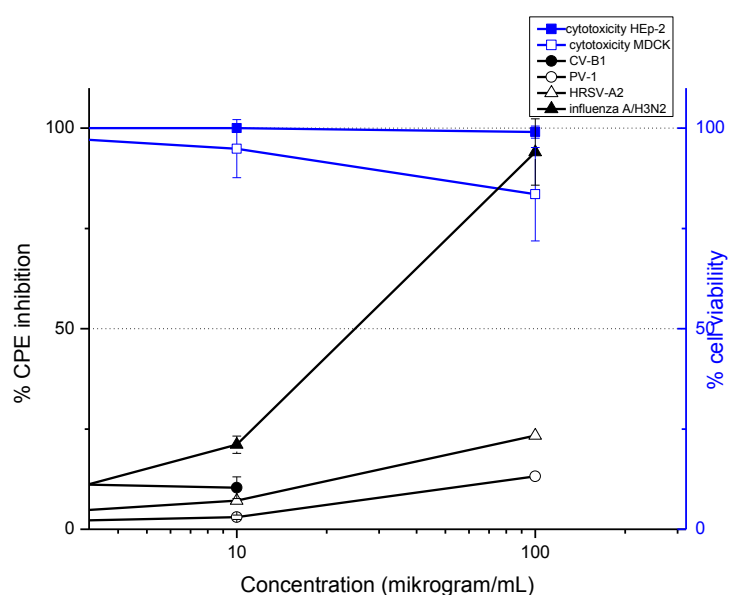


Фиг. 37g Ефект на базовите екстракти върху репликацията *in vitro* на HRSV-A2 (криви доза-отговор).

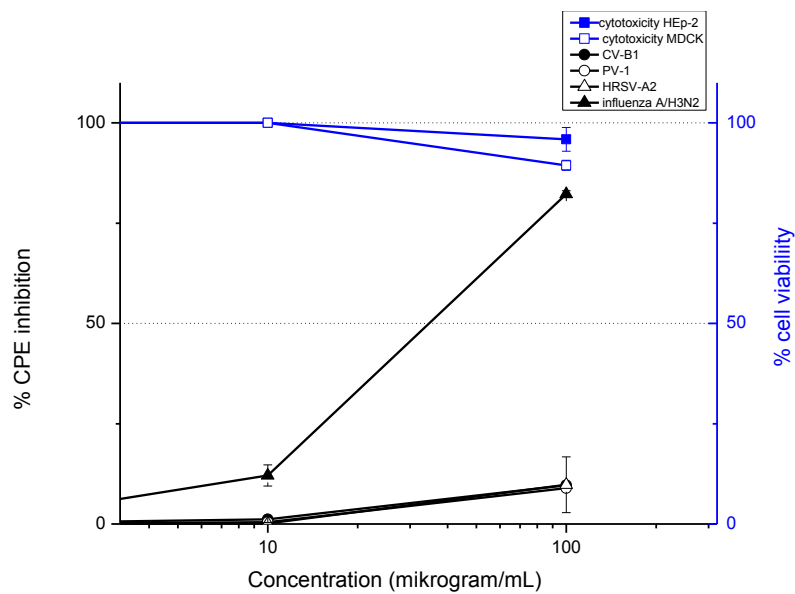


Фиг. 37h Ефект на базовите екстракти върху репликацията *in vitro* на грипен вирус A/H3N2 (криви доза-отговор).

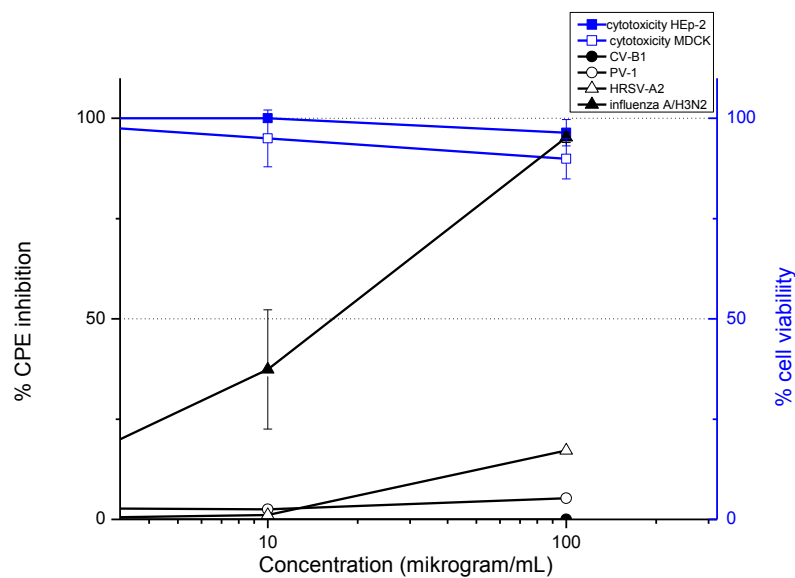
В резултат на проведените изследвания се установи, че Фракции „В” не притежават антивирусен ефект срещу *in vitro* репликацията на подбраните вируси. Единствено фракция „В” от китайска червена боровинка показва граничен ефект срещу коксакивирус В1 и то само при най-високата нетоксична за клетките концентрация. При всички изпитани фракции „С” се наблюдава антивирусен ефект срещу *in vitro* репликацията на грипен вирус А. Срещу останалите изпитвани вируси липсва изразен антивирусен ефект (Фиг. 38а-е).



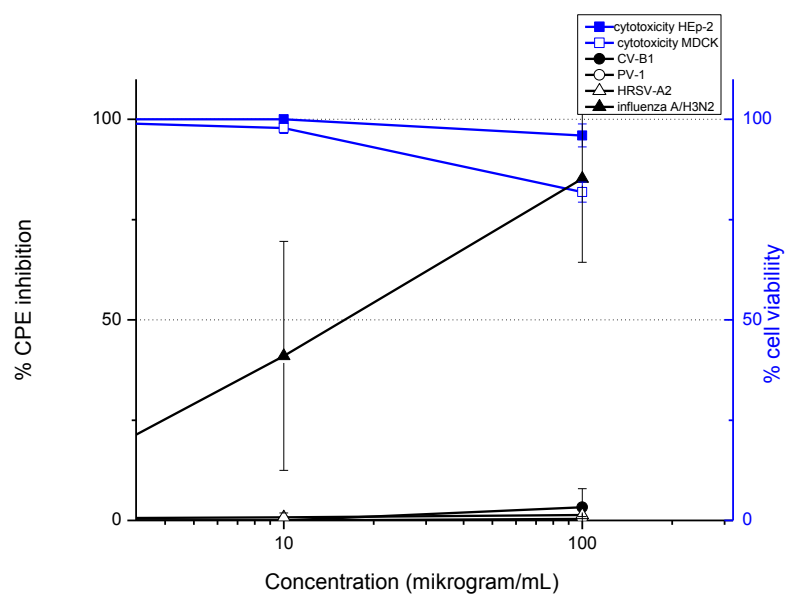
Фиг. 38a Ефект на фракция „С” от черна боровинка с произход България върху репликацията *in vitro* на CV-B1, PV-1, HRSV-A2 и грипен вирус A/H3N2 (криви доза-отговор).



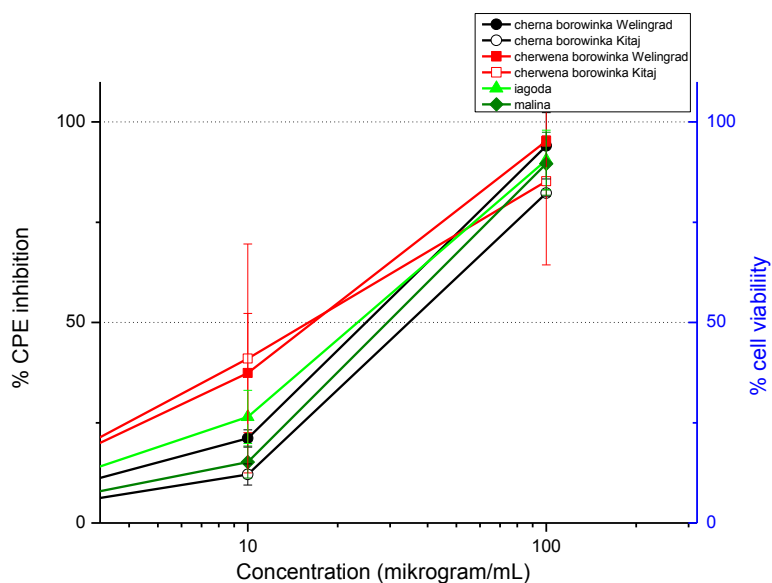
Фиг. 38b Ефект на фракция „С” от черна боровинка Китай върху репликацията *in vitro* на CV-B1, PV-1, HRSV-A2 и грипен вирус А/Н3N2 (криви доза-отговор).



Фиг. 38c Ефект на фракция „С” от червена боровинка с произход България върху репликацията *in vitro* на CV-B1, PV-1, HRSV-A2 и грипен вирус А/Н3N2 (криви доза-отговор).



Фиг. 38d Ефект на фракция „С” от червена боровинка Китай върху репликацията *in vitro* на CV-B1, PV-1, HRSV-A2 и грипен вирус A/H3N2 (криви доза-отговор).



Фиг. 38e Ефект на фракции „С” от изследваните горски плодове върху репликацията *in vitro* на грипен вирус A/H3N2 (криви доза-отговор).

9. Определяне на антибактериална и антигъбна активност на базовите екстракти и получените от тях фенолни фракции „В” и „С”

Изследвани са антибактериалните свойства на базовите екстракти и получените от тях обогатени и пречистени фенолни фракции „В” и „С” от плодове на червена и черна боровинка с произход България и Китай (Табл. 35).

Табл. 35 Антимикробна активност на изпитаните базови екстракти и фенолните фракции, получени от тях

	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Candida albicans</i>			<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Вид плод	БЕ mg/ml	„В” µg/mg	„С” µg/ml	БЕ mg/ml	„В” µg/mg	„С” µg/ml	БЕ mg/ml	„В” µg/mg	„С” µg/ml	БЕ	БЕ	БЕ
Черна боровинка (България)	62.5*	0.156	0.312	62.5	0.625	1.25	0	0.156	0.312	125	62.5	62.5
Черна боровинка (Китай)	62.5	0.156	0.156	62.5	0.625	1.25	0	0.156	0.625	125	125	62.5
Червена боровинка (България)	62.5	0.156	0.156	62.5	0.312	0.625	0	0.156	0.312	125	31.25	31.25
Червена боровинка (Китай)	31.25	0.156	0.312	62.5	0.625	1.25	0	0.156	0.625	62.5	31.25	31.25
Контрола (тобрамицин)	15.62 µg/mg			19.53 µg/mg			нистатин 0.2 µg/mg			78.12 µg/mg	78.12 µg/mg	78.12 µg/mg

Висока антибактериална и антигъбна активности (156 $\mu\text{g}/\text{mg}$) се установяват при фракции „В” от всички изследвани видове плодове не само срещу Грам положителните бактерии от вида *S. aureus*, но и срещу *C. albicans*. По-слабо е изразена антибактериалната активност (625 $\mu\text{g}/\text{mg}$) на тази фракция, изолирана от всички плодове (с изключение на червената боровинка, България) срещу изследвания Грам отрицателен ентеропатоген *E. coli*. Значителни вариации по отношение на антимикробната си активност показват фракции „С”, изолирани от двата вида плодове, отглеждани в България и Китай. С най-висока активност се характеризират червената боровинка от България, както и черната боровинка от Китай, която достига до 156 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Сравнително по-слаба активност проявяват тези фракции срещу *C. albicans* (от 312 $\mu\text{g}/\text{mg}$ до 1.25 mg/ml), както и срещу Грам отрицателните бактерии от вида *E. Coli*. Показаната висока активност на фракции „В” и „С” срещу *C. albicans* е съпоставима с тази на търговския продукт нистатин. Висока е активността на тези фракции и срещу Грам отрицателните и Грам положителните тест-бактерии в сравнение с данните от изследвания стандартен антибиотик тобрамицин. Тези резултати налагат необходимостта от продължаване на изследванията върху тези фракции на модели *in vivo*, с оглед на тяхното потенциално приложение като функционални храни и/или фармацевтични препарати.

В друга серия от опити е проучена антибактериалната активност на получените екстракти от ягодоплодни видове към два важни за денталната патология бактериални вида: *Enterococcus faecalis* (Грам-положителен аероб, свързан с вторични инфекции на зъбните канали) и *Streptococcus mutans* (Грам-положителен, микроаерофилен патоген, който колонизира зъбната повърхност и предизвиква зъбни кариеси) (Табл. 36).

Табл. 36 Антибактериалната активност на получените екстракти от ягодоплодни видове към два бактериални вида: *Enterococcus faecalis* и *Streptococcus mutans*, (МИК)

Екстракти	<i>Enterococcus faecalis</i>			<i>Streptococcus mutans</i>		
	Базови екстракти	Фракции "В"	Фракции "С"	Базови екстракти	Фракции "В"	Фракции "С"
	(mg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(mg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
Черна боровинка България	398	416	208	398	833	833
Черна боровинка Китай	201	208	104	201	833	833
Червена боровинка България	233	208	104	116	208	416
Червена боровинка Китай	245	416	104	245	833	833

Антибактериалната активност на базовите екстракти, получени от изследваните плодове с движи в границите от 116 до 398 mg/ml.

Фракции „В” и „С” са приблизително 1000 пъти по - активни, а резултатите за минимална инхибираща концентрация са в диапазона от 104 до 833 µg/ml. Прави впечатление по-високата антибактериална активност на фракция „С” спрямо *Enterococcus faecalis* в сравнение със *Streptococcus mutans*. Наблюдава се малко по - висока антибактериална активност на фракции „С” в сравнение с фракции „В” по отношение на двата бактериални вида. Получените резултати дават възможност за последващи изследвания, с оглед приложение в денталната патология, имайки предвид увеличаващата се резистентност на бактериалните патогени към обичайните лекарствени средства.

ИЗВОДИ

1. Установено е, че генетичният фактор оказва съществено влияние върху полифенолния профил на диворастящите черна и червена боровинка. Чрез използвания хеометричен подход, на базата на анализ по главните компоненти, образците се групират в съответствие с района на произход на плодовете (България, Китай и Норвегия).
2. Доказано е, че стойностите на антиоксидантния капацитет и съдържанието на основните класове фенолни съединения са с 10% по-високи при образците с произход Родопи спрямо тези с произход Стара планина, като вариацията по отношение на изследвания период (2009 - 2013 г.) е съответно 20% и 15% (при екстрактите от плодове с произход Стара планина), а при тези с произход Родопи 15% и 10%.
3. Установено е, че съдържанието на фенолни вещества в екстракти от плодовете на черна и червена боровинка с произход България (2015 г.) нараства право пропорционално с надморската височина на местообитанията (с 15% при черната и с 20% при червената боровинка).
4. Доказано е, че съдържанието на фенолни съединения в екстракти от плодовете на черна и червена боровинка с произход Норвегия (2015 г.) се увеличава право пропорционално (съответно с 15% при черна и с 10% при червена) в посока юг - север, т. е. с нарастване на географската ширина.
5. Установено е, че съдържанието на фенолните компоненти в екстракти от плодовете на черна и червена боровинка намалява в реда: Норвегия > България > Китай.
6. Въз основа на проведените почвени анализи и климатични характеристики на естествени местообитания е доказано, че обследваните райони притежават висок потенциал за отглеждане на екологично чисти растения.
7. При изследване на антивирусната активност се установи, че всички базови екстракти инхибират *in vitro* репликациите на ентеро вирус CV-B1 (ефектът е най-силно изразен при екстракт от черна боровинка с произход България) и грипен вирус A/H3N2 (най-силно изразен е ефектът при екстракта от черна китайска боровинка), като базовият екстракт от черна боровинка с произход България притежава и слабо изразен ефект срещу *in vitro* репликацията на респираторно-синцитиалния вирус.

8. Установено е, че фракции „В” (фенолни киселини, флавоноидни гликозиди, танини) се отличават с относително по-висока цитотоксичност в сравнение с базовите екстракти и фракции „С” (антоцианови съединения).
9. Доказано е, че всички фракции „С” притежават антивирусен ефект срещу *in vitro* репликацията на грипен вирус A/H3N2.
10. Установена е висока антибактериална и антигъбна активност при фракции „В” от всички изследвани плодове срещу Грам положителните бактерии от вида *S. aureus* (0.156 µg/mg) и срещу гъбата *C. albicans* (0.156 µg/mg).
11. Доказано е, че с най-висока активност спрямо изследвания Грам отрицателен ентеропатоген *E. coli*. се характеризира червената боровинка от България (0.156 µg/mg). Сравнително по-слаба активност проявяват фракции „С” срещу *C. albicans* (от 0.312 µg/mg до 1.25 µg/ml), както и срещу Грам отрицателните бактерии от вида *E. Coli*. (от 0.625 µg/mg до 1.25 µg/ml)
12. Антибактериалната активност на базовите екстракти спрямо *Enterococcus faecalis* и *Streptococcus mutans* се движи в границите от 156 до 400 mg/ml. Установено е, че фракции „В” и „С” са приблизително 1000 пъти по-активни (стойностите на минималната инхибираща концентрация са в диапазона от 104 до 833 µg/ml).

ПРИНОСИ

1. С научен характер

1.1 Създаден е селективен GC-MS метод за определяне на свободни и свързани фенолни киселини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка. С цел оптимизация на разделянето са модифицирани температурната програма и скоростта на потока (газ Хелий).

1.2 Разработени са надеждни HPLC-UV методи за определяне на антоцианидини, флавоноли, флавонони, и флавани в екстракти от плодове на червена и черна боровинка. За оптимизиране на BETX разделянето са вариани съставът на подвижната фаза и профилите на градиентните програми. Методите позволяват разделяне на аглюконите в рамките на 12 min (от 9.7 до 22.5 min).

1.3 Валидирани са чувствителни и бързи LC-ESI-MS/MS методи за определяне на антоциани и проантоцианидини в екстракти от плодове на червена и черна боровинка. С цел оптимизация на BETX разделянето са вариани съставът на подвижната фаза и профилът на градиентните програми. Разработените методи позволяват разделяне на 15

антоцианови вещества за 10 min (от 10 до 20 min) и 40 фенолни съединения (фенолни киселини, флавонолни глюкозиди, танини) за 15 min (от 1.5 до 16.5 min).

1.4 Проведен е сравнителен анализ на полифенолния състав в екстракти от плодове на червена и черна боровинка с различен географски произход (България, Норвегия, Китай) и са установени зависимости между общото фенолно съдържание, надморската височина и географската ширина на естествените местообитания.

1.5 Направена е оценка на фармакологичната активност на обогатени и пречистени фракции от плодове на червена и черна боровинка: антиоксидантен капацитет, антигъбно, антибактериално и антивирусно действие.

2. С приложен характер

2.1 Разработени са методи за определяне на фенолни вещества на базата на твърдофазова екстракция, последваща HPLC-UV детекция и HPLC- ESI-MS/ MS анализи за количествен мониторинг на полифенолния профил на растителни източници като лекарствени субстанции.

2.2 Създадена е локална мас-спектрална библиотека, включваща MS и MS² спектрите на 48 вещества от основните класове фенолни съединения: фенолни киселини (22 бр.), флавонолни гликозиди (6 бр.), антоциани (15 бр.), танини (4 бр.) и феноли (1 бр.) . Базата от данни позволява бързо и лесно идентифициране на съответните вещества в различни образци.

2.3 Установените високата антивирусна активност на базовия екстракт от българска черна боровинка, както и обогатената фракция „C” спрямо *in vitro* репликациите на коксакивирус с CV-B1, грипен вирус A/H3N2 и респираторно-синцитиалния вирус са сериозна предпоставка за изследване и върху *in vivo* модели.

2.4 Високата активност на фракции „B” и „C” срещу *C. albicans* е съпоставима с тази на търговския продукт нистатин. Силно изразена е активността на тези фракции и срещу Грам отрицателните и Грам положителните тест-бактерии в сравнение с използвания като контрола стандартен антибиотик тобрамицин. Тези резултати налагат необходимостта от продължаване на изследванията и върху *in vivo* модели, с оглед на тяхното потенциално приложение като фармацевтични продукти.

2.5 Високата антибактериална активност на фракции „C” спрямо *Enterococcus faecalis* и *Streptococcus mutans* е предпоставка за последващи изследвания, с оглед приложение в денталната патология, имайки предвид увеличаващата се резистентност на бактериалните патогени към обичайните лекарствени средства.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Публикации

1.2 Ivayla Dincheva & Ilian Badjakov. (2016). Assesment of the anthocyanin variation in Bulgarian bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Science*, vol. 6 (3), 39-50.

1.1 Lubomira Nikolaeva-Glomb, Luchia Mukova, Nadya Nikolova, Ilian Badjakov, **Ivayla Dincheva**, Violeta Kondakova, Lyuba Doumanova, Angel Galabov. (2014). *In Vitro* Antiviral Activity of a Series of Wild Berry Fruit Extracts against Representatives of Picorna-, Orthomyxo- and Paramyxoviridae. *Natural Product Communications*, vol. 9 (1), 51-54.

2. Доклади

2.1 18th International Conference on Medicinal Plants and Natural Products, ICMPNP 2016, Paris, France, July 25 - 26, 2016

Presentation: “Assessment of Genetic Diversity among Wild Bulgarian Berries as Determined by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)”. Ilian Badjakov, **Ivayla Dincheva**, Violeta Kondakova, Rossitza Batchvarova

2.2 8th Meeting with International Participation, Pleven, Bulgaria, October 24-25, 2014, Together in Cancer Control: Immunology, Viruses, Natural Remedies.

Presentation: “*In Vitro* Antiviral Activity of Wild Berry Fruit Extracts”. I.Badjakov, **I. Dincheva**, L. Nikolaeva-Glomb, V. Kondakova, A. Atanasov

2.3 8th Balkan Congress of Microbiology MICROBIOLOGIA BALKANICA 2013, Bulgaria, Veliko Tarnovo, October 2 - 5, 2013

Presentation: “Antiviral activity in vitro of a series of wild berry plant extracts against representatives of *Picorna*-, *Orthomyxo*- and *Paramyxoviridae*”. Lubomira Nikolaeva-Glomb, Luchia Mukova, Nadya Nikolova, Ilian Badjakov, **Ivayla Dincheva**, Violeta Kondakova, Lyuba Doumanova, Angel S. Galabov.

2.4 XVIth Scientific conference with international participation, Bulgaria, Troyan, May 30-31, 2013.

Presentation: “Phenolic profile and antioxidant potential of wild berry species”. Badjakov, I., Dincheva, I., Georgieva, M., Kondakova, V.

3. Постери

3.1 4th ICSD 2016, Rome, Italy, September 16 - 17, 2016

Poster: „Future challenges for the breeders struggling the climatic changes”. Badjakov I., Tsvetkov I., Dincheva I., Kondakova V., Atanasov A.

3.2 6th EUCHEMS, Seville, Spain, September 11 - 15, 2016

Poster: “A comprehensive characterisation of anthocyanin profiles in bilberry and lingonberry originated from Bulgaria and Norway by LC-ESI-HRMS/MS”. **Ivayla Dincheva**, Ilian Badjakov, Violeta Kondakova, Mladen Naydenov, Rolf Nestby

3.3 10th World Congress on Polyphenols Applications: PORTO POLYPHENOLS 2016, Porto, Portugal June 29 - July 1, 2016.

Poster: “Metabolite Profiling of Bilberry and Lingonberry Leaves by LC-ESI-MS/MS”. **Ivayla Dincheva**, Ilian Badjakov, Violeta Kondakova, Rossitza Batchvarova

3.4 International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, Bulgaria, Bansko, November 3-6, 2013

Poster: “LC-PDA-ESI-MS/MS profiling of anthocyanins in wild bulgarian small berry fruits”. **Ivayla Dincheva**, Ilian Badjakov, Violeta Kondakova, Patricia Dobson, Gordon Mcdougall, Derek Stewart.

3.5 International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, Bulgaria, Bansko, November 3-6, 2013

Poster: “Assessment of genomic diversity among wild bulgarian berries as determined by random amplification of polymorphic DNA (RAPD)”. Ilian Badjakov, **Ivayla Dincheva**, Violeta Kondakova, Rossitza Batchvarova.

3.6 8th Balkan Congress of Microbiology MICROBIOLOGIA BALKANICA 2013, Bulgaria, Veliko Tarnovo, October 2 - 5, 2013

Poster: “Bioactive potential of wild berry fractions against human pathogens”. Vesselin Kussovski, **Ivayla Dincheva**, Ilian Badjakov, Ekaterina Krumova, Maria Angelova, Lyubka Doumanova, Hristo Najdenski.

4. Цитирания

Публикация: Lubomira Nikolaeva-Glomb, Luchia Mukova, Nadya Nikolova, Ilian Badjakov, Ivayla Dincheva, Violeta Kondakova, Lyuba Doumanova, Angel Galabov. (2014). *In Vitro* Antiviral Activity of a Series of Wild Berry Fruit Extracts against Representatives of Picorna-, Orthomyxo- and Paramyxoviridae. *Natural Product Communications*, vol. 9 (1), 51-54.

4.1 Li, Y., Zhang, J. J., Xu, D. P., Zhou, T., Zhou, Y., Li, S., & Li, H. B. (2016). Bioactivities and Health Benefits of Wild Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1258.

4.2 DiCaprio, E., Culbertson, D., & Li, J. (2015). Evidence of the internalization of animal caliciviruses via the roots of growing strawberry plants and dissemination to the fruit. *Applied and environmental microbiology*, 81(8), 2727-2734.

4.3 Kruczek, M., Kostecka-Gugała, A., Augustynowicz, J., Ledwożyw-Smoleń, I., Orzeł, A., Król-Dyrek, K., & Kaszycki, P. (2015). Liście maliny i jeżyny jako surowiec dla przemysłu farmaceutycznego. *Przemysł Chemiczny*, 94, 1431-1436.

4.4 DiCaprio, E. L. (2015). Internalization and Dissemination of Human Norovirus and Animal Caliciviruses in Fresh Produce and Non-thermal Processes to Inactivate Human Norovirus (Doctoral dissertation, The Ohio State University).

4.5 Kostecka-Gugała, A., Ledwożyw-Smoleń, I., Augustynowicz, J., Wyżgolik, G., Kruczek, M., & Kaszycki, P. (2015). Antioxidant properties of fruits of raspberry and blackberry grown in central Europe. *Open Chemistry*, 13(1).

4.6 Zasowska-Nowak, A., & Nowak, P. (2014). Prozdrowotne efekty konsumpcji truskawek. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 58(07-08).