

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“

ВАРНА

ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА ХИМИЯ

Ангелика Георгиева

Изследване на полициклични ароматни въглеводороди и  
токсични елементи в лечебни растения и оценка на безопасност

## АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.2. Химични науки

Научна специалност: Биоорганична химия, химия на природните и  
физиологично активни вещества

Научен ръководител:

Доц. Станислава Георгиева, дх

ВАРНА, 2024

Дисертационният труд съдържа 172 страници, включващи 36 фигури, 23 таблици и 5 приложения. Цитирани са 225 литературни източника, от които 200 са на латиница и 25 на кирилица.

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в научната лаборатория в Катедра Химия при Медицински университет - Варна.

Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен за защита на заседание на катедрен съвет на Катедра Химия при Медицински университет - Варна.

## **Научно жури**

Външни членове:

1. Проф. Кирил Блажев Гавазов, д.х. - катедра Химически науки, Фармацевтичен Факултет, Медицински университет - Пловдив.
2. Доц. Галина Димитрова Николова, д.х. - катедра Медицинска химия и биохимия, секция Медицинска химия, Медицински Факултет, Тракийски университет - Стара Загора.
3. Доц. Ивайло Кънчев Иванов, д.х. - катедра Химия, Факултет по природни науки, Шуменски университет „Епископ Константин Преславски“, гр. Шумен

Вътрешни членове:

4. Проф. Албена Василева Мерджанова, д.х. - Катедра Химия, Факултет Фармация, Медицински университет - Варна.
5. Доц. Станислава Кателиева Георгиева, д.х. - Катедра Химия, Факултет Фармация, Медицински университет - Варна

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 18.10.2024 г. от 11 ч. в Медицински университет - Варна и във Webex. Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Медицински университет - Варна: [www.mu-varna.bg](http://www.mu-varna.bg)

## СЪДЪРЖАНИЕ

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....                                                                                                                 | 4  |
| ВЪВЕДЕНИЕ.....                                                                                                                             | 5  |
| I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....                                                                                                                       | 7  |
| II. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ.....                                                                                                              | 8  |
| II.1. Обект на изследване – видове лечебни растения.....                                                                                   | 8  |
| II.2. Събиране на проби лечебни растения.....                                                                                              | 9  |
| II.3. Аналитична процедура за анализ на PAHs.....                                                                                          | 10 |
| II.3.1. Пробоподготовка на лечебни растения и сухи билкови чайове за определяне на съдържанието на PAHs .....                              | 11 |
| II.3.2. Екстракция на полициклични ароматни въглеводороди в лечебни растения.....                                                          | 11 |
| II.3.3. Колонно пречистване на екстрактите от лечебни растения .....                                                                       | 12 |
| II.3.4. Пробоподготовка на водни и алкохолни екстракти от изсушени билкови чайове за анализ на PAHs.....                                   | 13 |
| II.3.5. Качествено и количествено определяне на PAHs чрез Газова хроматография с масдетекция (GC-MS).....                                  | 14 |
| II.3.6. Валидиране на метода и контрол на качеството на анализите.....                                                                     | 18 |
| II.4. Аналитична процедура за определяне на токсични елементи в лечебни растения.....                                                      | 20 |
| II.4.1. Микровълново минерализиране на лечебни растения.....                                                                               | 20 |
| II.4.2. Определяне на токсични елементи в лечебни растения чрез Атомно-емисионна спектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-OES)..... | 21 |
| II.4.3. Определяне на токсични елементи в лечебни растения чрез масспектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS).....                | 22 |
| II.4.4. Верифициране на метода и контрол на качеството на анализите .....                                                                  | 23 |
| II.5. Статистическа обработка и анализ на резултатите.....                                                                                 | 24 |
| III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.....                                                                                                             | 25 |
| III.1. Резултати за съдържание на полициклични ароматни въглеводороди.....                                                                 | 25 |
| III.1.1. Съдържание на PAHs в лечебни растения, събрани в района на Варна.....                                                             | 25 |
| Обобщение на резултатите за съдържание на PAHs в лечебни растения.....                                                                     | 40 |
| III.1.2. Съдържание на PAHs в изсушени билкови чайове и техни водни и етанолови екстракти.....                                             | 42 |
| Обобщение на резултатите за нивата на PAHs в изсушени билкови чайове и екстракти....                                                       | 47 |
| III.1.3. Оценка на безопасност свързана със замърсяването на лечебните растения с PAHs. ....                                               | 48 |
| Обобщение на резултатите от оценка на безопасност на лечебните растения.....                                                               | 55 |
| III.2. Резултати за съдържание на токсични елементи.....                                                                                   | 56 |
| III.2.1. Съдържание на токсични елементи в лечебни растения, събрани в района на Варна .....                                               | 56 |
| III.2.2. Сравнение на концентрации на токсични елементи по райони.....                                                                     | 56 |
| Обобщение на резултатите за токсични елементи в лечебни растения.....                                                                      | 62 |
| IV. ИЗВОДИ.....                                                                                                                            | 63 |
| V. ПРИНОСИ.....                                                                                                                            | 65 |
| Списък на публикации.....                                                                                                                  | 66 |
| Списък на участия в научни форуми.....                                                                                                     | 66 |

## **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ**

### **На кирилица**

МОСВ - Министерство на околната среда и водите

СЗО - Световна здравна организация

УОЗ - Устойчиви органични замърсители

### **На латиница**

DI - Дневен прием

ЕС - Европейска комисия

EFSA - Европейският орган за безопасност на храните

GPC - Гел проникваща хроматография

HQ - Коефициента на опасност

IARC - Международна агенция за изследване на рака

IUPAC - Международен съюз за чиста и приложна химия

JECFA - Съвместен експертен комитет на ФАО/СЗО по хранителните добавки

LLE - Течно течна екстракция

MOE - Границата на експозиция

RSD - относително стандартно отклонение

RfD - референтна доза

HRGC-MS - газова хроматография с висока разделителна способност

LOD - Граница на откриване

LOQ - Граница на количествено определяне

PAH - Полициклически ароматен въглеводород

PAHs - Полициклически ароматни въглеводороди

QuEChERS метод - бърз, лесен, евтин, ефективен, надежден и безопасен метод за подготовка на проби

SCF - Научен комитет по храните на Европейския съюз

SPE - Твърдофазна екстракция

USE - Екстракция с ултразвук

US-EPA - Американската агенция за опазване на околната среда

WHO - Световна здравна организация

## ВЪВЕДЕНИЕ

През последните тридесет години в световен мащаб има непрекъснато нарастване на глобалния интерес към употребата на лечебните растения. По данни на Световната здравна организация (СЗО) процентът на хората, които използват лечебни растения е 70–80% от общото население. В сравнение с други държави България е на едно от първите места в Европа по производство и износ на билки. Това се дължи на благоприятните климатични и почвени условия и многообразието от местни видове лечебни растения в страната ни. По тези причини в България има дългогодишни традиции при използването на лечебните растения в изсушено състояние за приготвяне на чайове, отвари и тинктури за перорално приложение или като компреси за външна употреба в дерматологията. Билките се използват при производството на козметични средства, фармацевтични препарати и хранителни добавки за профилактика и лечение на болести. Някои от лечебните растения са суровина за парфюмерийната и хранително-вкусовата промишленост. Например мащерка, мента, босилек се използват като подправки в кулинарията.

Предимствата на билките са безспорни, защото са богати на полезни биологично активни компоненти, но последните проучвания показват, че те могат да съдържат токсични вещества, включително полициклични ароматни въглеводороди (РАНs) и токсични елементи. Тези съединения са устойчиви замърсители и затова са широко разпространени в околната среда. Могат да попаднат в лечебните растения при растежа, събирането, съхранението и обработката им.

РАНs най-често се отделят в околната среда в резултат на непълно горене на дървесина, въглища, нафта, бензин и други горива при различни човешки дейности. Основни източници на РАНs са автомобилният трафик и промишлените предприятия. Поради начина на формиране, РАНs са широко разпространени в околната среда и следователно могат да попаднат в лечебните растения и от там да въздействат върху здравето на човека. Международната агенция за изследване на рака (IARC) класифицира бензо[а]пирен в група 1 като канцерогенен за хора, но също така класифицира бенз[а]антрацен, бензо[б]флуорантен и хризен в група 2В - с възможни канцерогенни свойства за хора. EFSA посочва данни за надвишени стойности на бензо[а]пирен и сума от 4РАНs (бензо[а]пирен, хризен, бенз[а]антрацен и бензо[б]флуорантен) в различни видове храни. Резултатите от проучването на EFSA за нивата на бензо[а]пирен, бенз[а]антрацен, бензо[б]флуорантен и хризен и класифицирането им от IARC с висок риск за здравето на хората ги определя като приоритетни РАНs и маркери при оценка при експозицията на тези замърсители.

Токсични елементи като мед, цинк, олово, кадмий и хром се отделят под формата на аерозоли или фини прахови частици в емисиите от промишлените предприятия и автомобилният транспорт и могат да попаднат върху листата и цветовете на растенията. Токсични елементи могат да преминат в билките през кореновата система и като разтворими хелатни комплекси. Според класификация на СЗО, елементи с подчертан токсичен или канцерогенен ефект са олово, кадмий, живак и арсен. Токсичните елементи не са биоразградими и се натрупват в околната среда и живите организми. Микроелементите желязо, мед, цинк, хром при високи концентрации също могат да проявят токсично действие. Токсичните елементи могат да инхибират активността на някои протеини и ензими, могат да генерират свободни радикали, които да увредят липидите, протеините и молекулите на ДНК в човешкия организъм и да предизвикат образуването на карциноми.

Световната здравна организация (СЗО) определя необходимостта от разработване на методология за наблюдение и осигуряване на безопасност и качество на лечебните растения и фармацевтичните продукти на тяхна основа. Определянето на нивата на РАНs и токсични елементи в лечебните растения има отношение не само за директна оценка на безопасността на лечебните растения като храна, но и за екологична оценка на района, от който са събрани билките.

Въпреки доказаният неблагоприятен ефект на РАНs и токсичните елементи върху околната среда и човешкото здраве, в България все още не се извършва системен контрол на тези замърсители в лечебни растения, сушени билки и чай. Извършени са само епизодични изследвания за определяне съдържанието на токсични елементи в билки от отделни райони в България. Необходимо е да се определят нивата на тези замърсители в най-често използваните лечебни растения, за да се направи оценка на тяхната експозиция по отношение на определени замърсители. Тази информация дава възможност да бъде оценено каква част от съдържащите се в лечебните растения замърсители могат да попаднат в организма на човека при консумация на билков чай и прием на хранителни добавки.

**Цел:**

Определяне на полициклични ароматни въглеводороди (РАНs) и токсични елементи в пет вида лечебни растения от район Варна и оценка на тяхната безопасност.

**Основни задачи:**

1. Събиране на проби лечебни растения от определени райони на област Варна.
2. Разработване и валидиране на аналитичен метод за определяне на полициклични ароматни въглеводороди (РАНs) в лечебни растения чрез газова хроматография с масдетекция.
3. Определяне съдържанието на РАНs и токсични елементи в пет вида лечебни растения от различни райони.
4. Определяне съдържанието на РАНs във водни и етанолови екстракти от изсушени билки.
5. Обработка и анализ на получените резултати за нивата на РАНs и токсични елементи в лечебните растения.
6. Оценка на безопасност на лечебните растения, използвани за приготвяне на чайове и като хранителни добавки.

## II. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

### II.1. Обект на изследване – видове лечебни растения

Според Закона за лечебните растения "Лечебни растения" са тези, които могат да бъдат използвани за получаване на билки. "Билки" са отделни морфологични растителни части или цели растения, както и плодове и семена от тях, които в свежо или изсушено състояние са предназначени за лечебни и профилактични цели, за производство на лекарствени продукти, за хранителни, козметични и технически цели (Закон за лечебните растения, 2000).

В проучване на български автори са проведени флористични и етноботанични изследвания на лечебни растения, разпространени по Северното Черноморие на България (Северни Черноморски влажни зони). В района са установени 251 вида лечебни растения (в смисъла на Закона за лечебните растения), които представляват около 40 % от общо 679 вида висши растения (Чернева, 2017). Най-често срещаните растителни видове са *Matricaria chamomilla* L., *Tilia tomentosa* Moench, *Ginkgo biloba* L., *Sambucus nigra* L., *Mentha piperita* L., *Valeriana officinalis* L. и *Thymus serpyllum* L. (Bachev & Yaneva, 2018). Редица проучвания сред населението в България и анкета сред местното население на Северното Черноморие показват, че едни от най-популярните билки, използвани от населението на региона са лайка, мащерка, бял равнец, липа и черен бъз (Cherneva et al., 2017; Чернева, 2017; Nikolova et al., 2018; Kozuharova et al., 2013; Stoyanov et al., 2018; Gentscheva et al., 2010, Popova et al., 2018).

В настоящото изследване са подбрани видове лечебни растения с широко разпространение в североизточна България и които са най-често използваните от населението – Таблица 1. Растителните видове са определени от „Определител на висшите растения в България“ (Кожухаров, 1992).

**Таблица 1.** Видове лечебни растения, подбрани за настоящото изследване

| Българско име     | Латинско име                    | Семейство                    | Използвана част     |
|-------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------|
| Черен бъз         | <i>Sambucus nigra</i> L.        | Caprifoliaceae (Бъзови)      | цвят                |
| Бял равнец        | <i>Achillea millefolium</i> L.  | Asteraceae (Сложноцветни)    | цвят                |
| Лечебна лайка     | <i>Matricaria chamomilla</i> L. | Asteraceae (Сложноцветни)    | цвят                |
| Дива мащерка      | <i>Thymus serpyllum</i> L.      | Сем. Lamiaceae (Устноцветни) | цвят, листа, стъбло |
| Сребролистна липа | <i>Tilia tomentosa</i> Moench   | Сем. Tiliaceae (Липови)      | цвят                |



## II.2. Събиране на проби лечебни растения

През периода 2018 – 2019 г. са събрани проби лечебни растения от различни райони на област Варна, съобразно направеното проучване в научната литература - 43 проби лечебни растения.

*Райони за вземане на проби в близост до транспортни източници на замърсяване*

Избрани са три района за оценка на въздействието на интензивния трафик върху нивата на РАНs и токсични елементи в лечебните растения: бул. Сливница, ул. Батак, ул. Първа (кв. Галата). Булевард Сливница е определена като главен градски път във Варна, България. Характеризира се с интензивен трафик - 2124 превозни средства/час (ОС - Приложение А, 2017). В доклад на Регионална инспекция по околната среда и водите (РИОСВ) се отчита, че е едни от най-натоварените улици във Варна. Районът на ул. Батак е избран като район с транспортен източник, т.к. е определен от Регионална инспекция по околната среда и водите – Варна (РИОСВ) за измерване на замърсители в атмосферен въздух, включително РАНs и токсични елементи. Улица Първа е натоварен извънградски път до местност Ракитника и на около 4 км южно от варненския квартал Галата. Поради застрояване на този район последните години се засилва и автомобилния трафик.

*Райони за вземане на проби в близост до промишлени източници на замърсяване:* Девня цимент, ТЕЦ-Девня, Асфалтова база, Екарисаж

*Райони за вземане на проби без потенциални източници на замърсяване (Екологично чист район)* - местност Фичоза. Местност Фичоза се намира на около 15 км югоизточно от Варна. Характеризира се със сравнително слаб автомобилен трафик. Екологично чистият район беше избран, за да се сравнят нивата на РАНs в растителните видове от райони с интензивен трафик и райони с промишлени източници на замърсяване с нивата в билки от този район.

| Район                                                  | Място на пробовземане                                   |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Близо до транспортни източници на замърсяване          | ул. Батак<br>бул. Сливница<br>ул. Първа, кв. Галата     |
| Близо до райони до промишлени източници на замърсяване | Екарисаж<br>Асфалтова база<br>Девня цимент<br>ТЕЦ Девен |
| Близо до Екологично чист район                         | м. Фичоза                                               |

Растителните видове *Matricaria chamomilla* L., *Achillea millefolium* L., *Tilia tomentosa* Moench, *Sambucus nigra* L. и *Thymus serpyllum* L. са събрани от определените райони през месеците май - юли 2018 г. и май - юли 2019 г. От всеки вид са взети 5-6 произволно избрани растения, поставени са в хартиени пликове и транспортирани до лабораторията.

Освен диворастващи растения, са взети проби от търговската мрежа от същите видове под формата на изсушени билки в насипно състояние и пакетирани билкови чайове (тип филтър). Изборът на вида на анализираният чайове се основава на широко използвани в България билкови чайове. Взети са по една проба насипен билков чай и по една проба пакетираният чай (филтър) от всеки вид билка (Приложение №1). От всички 10 вида проби от търговската мрежа са взети за анализ по 2-3 опаковки.

### **II.3. Аналитична процедура за анализ на PAHs**

Направено е проучване на научната литература във връзка с подбор на подходящи методи за пробоподготовка и инструментален анализ при определяне концентрациите на PAHs в лечебни растения. В България и Европейският съюз все още няма стандартизирани методи за анализ на полициклични ароматни въглеводороди (PAHs) в лечебни растения. В научната литература за определяне на PAHs се използват различни методи за екстракция и пречистване на проби лечебни растения като най-често се използват органични разтворители или техни смеси (Seongyu, 2016; Zelinkova & Wenzl, 2015 b; Rozental et al., 2018). Полученият екстракт се концентрира и екстрактите се анализират за качествено идентифициране и количествено определяне най-често чрез газова хроматография с маспектрометрия (GC-MS).

В настоящото изследване е разработена аналитична процедура, която се основава на аналитичен метод, публикуван от Kowalski et al., 2015 за определяне на Полициклични ароматни въглеводороди (PAHs) в изсушени билкови чайове. Този метод е модифициран в етапа екстракция на анализите и пречистване на получените екстракти, а количественото определяне е извършено чрез Газова хроматография с маспектрометрия.

#### **Апаратура и технически средства**

Газов хроматограф модел Focus GC с маспектрометър Ion Trap Polaris Q и autosampler AI 3000, Thermo Scientific Electron Corporation, САЩ, Ротационен вакуум изпарител (Hei-Vap Precision Heidolph, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Германия), Аналитична везна KERN ABJ 220-4M, Центрофуга EBA21, Вортекс VELP Scientifica

#### **Всички реактиви, използвани при анализите са с висока чистота HPLC/GC:**

- Ацетон, дихлорометан, хексан, вода (с чистота LC-MS), ултрачиста вода Milli-Q, Merk
- Магнезиев сулфат, anhydrous, reagentplus (R),  $\geq 99.5\%$ , Натриев хлорид, anhydrous,  $\geq 99\%$
- Силикагел за колонна хроматография, Silica gel G60, high-purity grade, 60 Å, 70-230 mesh
- PSA, адсорбент за SPE (твърдофазна екстракция), на фирма Supelco

**Аналитичната процедура за анализ на PAHs в лечебни растения включва следните етапи:**

1. Предварителна подготовка на пробите – изготвяне на средна лабораторна проба, хомогенизиране, претегляне.
2. Екстракция на анализирания съединения от изсушени лечебни растения, билкови чайове.
3. Пречистване на екстрактите.
4. Приготвяне на водни и етанолови екстракти
5. Качествено идентифициране и количествено определяне чрез газова хроматография с масдетекция.
6. Обработка на резултати и статистически анализ на данните.

### II.3.1. Пробоподготовка на лечебни растения и сухи билкови чайове за определяне на съдържанието на PAHs

#### Изготвяне на средна лабораторна проба

Средна проба от всеки вид билка е събрана от минимум 5-6 произволно избрани отделни растения. Събраните билки се изсушават при естествени условия – стайна температура, атмосферно налягане в сухи, проветриви, хладни помещения няколко дни, като се разстилат между филтърна хартия. След това сухите нарязани лечебни растения се стриват в хапан и се хомогенизират. Стритата проба се претегля на аналитична везна (1.5 g) в стъклена центрофужна епруветка (50 mL). Хомогенизирана проба от сухи билкови чайове се приготвя като съдържанието на 5-7 филтър-пакетчета (от всеки вид) се обединява и хомогенизира. Пробите насипен билков чай (от всеки вид) се хомогенизират като се смесва съдържанието на 2-3 опаковки. На аналитична везна се претеглят в стъклена центрофужна епруветка 1.5 g хомогенизирана проба.

#### II.3.2. Екстракция на полициклични ароматни въглеводороди в лечебни растения

При разработването на аналитичния метод е използван метод публикуван от Kowalski et al., 2015 за определяне на Полициклични ароматни въглеводороди (PAHs) в растението Yerba Mate Tea чрез използване на QuEChERS метод и Газова хроматография с масспектрометрия. Този метод е модифициран по отношение на екстракцията на анализите от изсушените билки и колонното пречистване на получените екстракти. По отношение на екстракцията бяха апробирани различни разтворители и техни смеси – ацетонитрил, хексан/ацетон (1:1, v/v), хексан/ацетон (4:1, v/v) с цел оптимално извличане на PAHs като се използват по-малки обеми от разтворители и реактиви за по-кратко време, което осигурява не само икономичност на процедурата, а и безопасност при работа. Същевременно се постигат много добри параметри на метода като сравнително по-високи добиви и ниски граници на откриване на анализите (Таблица 2).

Получените резултати за добив при използване на различни екстракционни разтворители показаха, че хексан/ацетон (4:1, v/v) е смес с най-високи екстракционни свойства за съединения от приоритетните PAHs, за разлика от ацетонитрил, който е най-често използвания разтворител при екстракция на пестициди (Sadowska-Rociek et al., 2013).

**Таблица 2.** Сравнение на различни разтворители при екстракция на PAHs в изсушена билка с добавка на стандартен разтвор PAHs (EPA 525 PAH Mix B, Supelco) – добив, %.

| Наименование          | PAHs  | Екстракционни разтворители |                         |                          |
|-----------------------|-------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                       |       | Ацетонитрил                | Хексан:Ацетон (1:1,v/v) | Хексан:Ацетон (4:1, v/v) |
|                       |       | Добив, %                   | Добив, %                | Добив, %                 |
| аценафтилен           | ACL   | 75.6                       | 86.8                    | 99.7                     |
| флуорен               | FL    | 79.0                       | 87.1                    | 98.0                     |
| фенантрен             | PHE   | 83.5                       | 96.2                    | 108.3                    |
| антрацен              | AN    | 82.3                       | 91.4                    | 102.1                    |
| пирен                 | PY    | 80.1                       | 90.5                    | 100.6                    |
| бенз[а]антрацен       | BaA   | 71.5                       | 84.6                    | 98.0                     |
| хризен                | CHR   | 73.2                       | 85.1                    | 98.5                     |
| бензо[б]флуорантен    | BbFA  | 70.1                       | 82.5                    | 92.5                     |
| бензо[к]флуорантен    | BkFA  | 72.4                       | 83.3                    | 92.4                     |
| бензо[а]пирен         | BaP   | 78.0                       | 87.0                    | 98.1                     |
| индено[1,2,3-cd]пирен | IP    | 61.4                       | 72.7                    | 81.8                     |
| дибенз[а, h]антрацен  | DbahA | 63.5                       | 73.2                    | 82.3                     |
| бензо[ghi]перилен     | BghiP | 60.1                       | 70.1                    | 80.3                     |

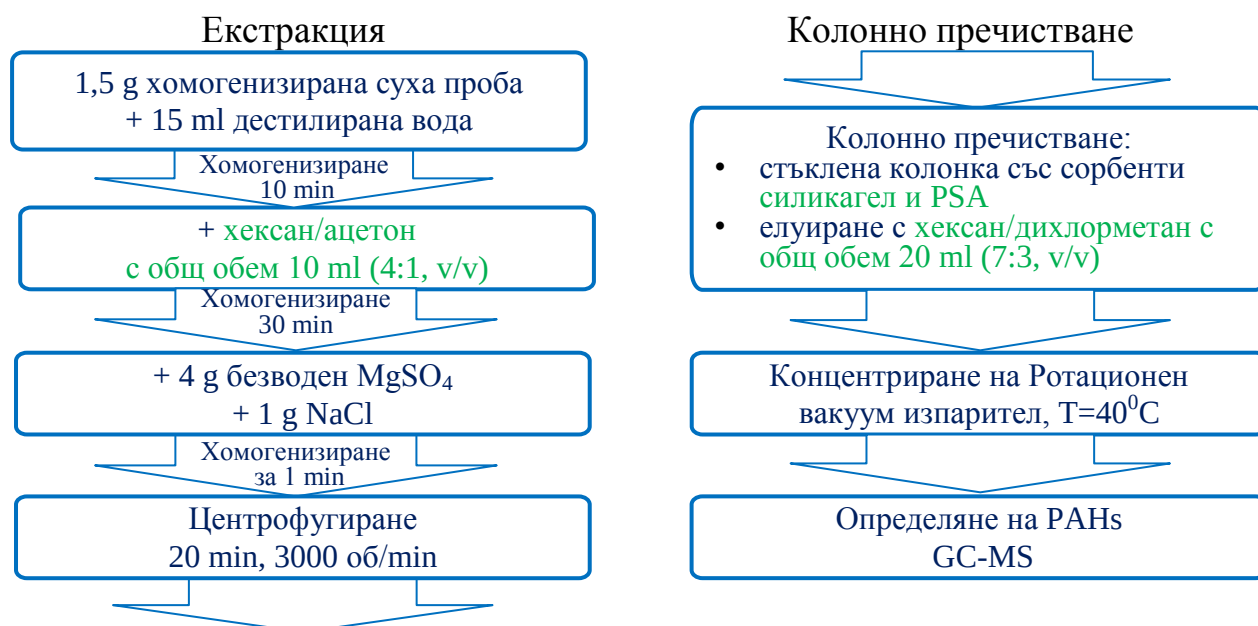
По отношение на пречистването на получените екстракти бяха приложени различни методи на пречистване - QuEChERS метод (Sadowska-Rociek et al., 2013), колонно пречистване със сорбенти силикагел и PSA в различно съотношение с цел постигане на оптимално изолиране на търсените анализи и отстраняване на пречещи вещества. Приложеният QuEChERS метод се оказва неподходящ, поради високо съдържание на остатъчни пигменти, които затрудняват идентификацията на отделните съединения PAHs при анализа на газовия хроматограф. Приложихме адсорбционна хроматография чрез колонно пречистване със силикагел и смес силикагел + PSA сорбент (Primary secondary amine), подходящ за отстраняване на полярни пигменти (Sadowska-Rociek et al., 2013). Резултатите показаха, че колонно пречистване със смес силикагел/ PSA сорбент осигурява ефективно отстраняване на преченията от растителните пигменти като същевременно добивът на PAHs е оптимален. Пречистването само със силикагел не е достатъчно ефективно. Използваните елуенти при колонното пречистване на растителните екстракти са хексан и дихлорметан в съотношение 7:3. Разработената модифицирана аналитична процедура за определяне на PAHs в лечебни растения и сухи билкови чайове включва следните етапи (Фигура 1).

- **Екстракция на полициклични ароматни въглеводороди в лечебни растения**

Екстракция на полициклични ароматни въглеводороди в лечебни растения се извършва чрез – модифицирана екстракция по QuEChERS метод. Към 1.5 g от пробата за анализ (сухи лечебни растения от различни райони или сухи билки от търговската мрежа) се добавя 15 mL вода (с чистота LC-MS), за да се улесни процеса на екстракция на PAHs, след което се хомогенизира на вортекс 10 минути. Пробата се екстрахира като към нея се добавя 10 mL смес хексан/ацетон (4:1, v/v) и се хомогенизира 30 минути на вортекс. Прибавят се 4 g безводен  $MgSO_4$  и 1 g NaCl. След последващо бързо хомогенизиране на вортекс 1 минута, пробата се центрофугира 20 минути, 3000 об/min (Kowalski et al., 2015).

### **II.3.3. Колонно пречистване на екстрактите от лечебни растения**

Хроматографска стъклена колона (10 x 250 mm) се пълни в следната последователност - 1 g безводен  $Na_2SO_4$ , предварително приготвена смес от 5 g силикагел (G60) и 0.4 g първичен/вторичен амин сорбент (Primary/Secondary Amine - PSA) и отново 1 g безводен  $Na_2SO_4$ . PSA-сорбентът представлява силикагел с полимерно свързана етилендиамин-N-пропилова фаза, която съдържа първични и вторични амини. Запълнената със сорбенти колона се промива с хексан. Концентрираният хексанов екстракт след центрофугиране се прехвърля в хроматографската колона и се елуира с 20 mL смес хексан: дихлорметан (7:3, v/v). Елуатът се концентрира при температура 40°C на ротационен вакуум изпарител и се прехвърля в шишенце за газова хроматография. Елуатът се изпарява под азот до почти сухо и се разтваря в 0.5 mL хексан.



Фигура 1. Етапи на пробоподготовка при определяне на ПАХс в лечебни растения

#### II.3.4. Пробоподготовка на водни и етанолови екстракти от изсушени билкови чайове за анализ на ПАХс

Средната лабораторна проба при анализ на ПАХс във водни и алкохолни екстракти от изсушен билков чай се приготвя по същия начин както в точка II.3.1.

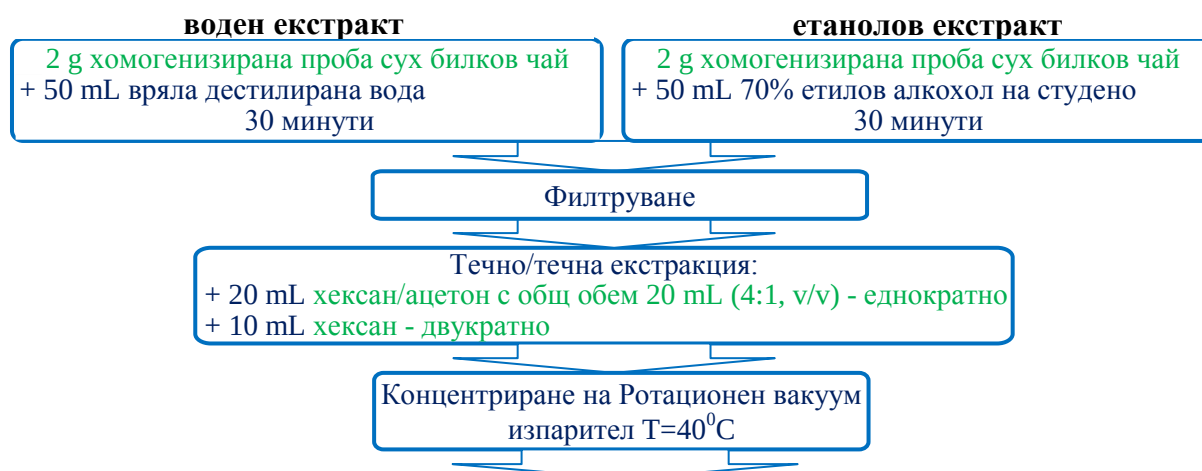
##### Приготвяне на водни и етанолови билкови екстракти (Фигура 2)

Билковите чайове обикновено се приготвят като към изсушен билков чай (обикновено 2 g) се прибавят 250 mL гореща вода. Съдържанието на ПАХс в екстракти, приготвени в съотношение 2:250 маса-обем, е много ниско и е близо до границата на откриване (LOD) на метода (Zachara et al., 2018). Затова с цел постигане на по-добра чувствителност на метода водните екстракти бяха приготвени като към 2 g хомогенизирана проба се добавят 50 mL вода (ултрачиста вода Milli-Q). Водните екстракти се приготвят в стъклена колба с шлифт и се оставят да престоят минимум 30 мин. до пълно охлаждане при стайна температура.

Етанолов екстракт се приготвя като към 2 g хомогенизираната проба от изсушени билки се добавя 70% етанол (50 mL) при стайна температура и пробата се оставя да престои 30 минути, при затворена колба. Получените екстракти се филтруват през филтър (FiltrateCH) (с висока скорост на филтруване) директно в делителна фуния (обем 250 mL). Течно-течната екстракция се извършва последователно:

- еднократно с 20 mL смес n-хексан:ацетон (4:1, v/v)
- двукратно с 10 mL n-хексан.

За по-добро извличане на полицикличните ароматни въглеводороди (ПАХс) се добавя 0.5 g NaCl. Органичните екстракти (горен слой) се смесват и се концентрират до 2 mL при 40°C на ротационен вакуум изпарител. Колонното пречистване се извършва по същия начин както е описано в точка II.3.3. и на Фигура 1. На Фигура 2 е представена схема на етапите на пробоподготовка при определяне на ПАХс в билкови екстракти:



**Фигура 2.** Етапи на пробоподготовка при определяне на PAHs в билкови екстракти

### II.3.5. Качествено и количествено определяне на PAHs чрез Газова хроматография с масдетекция (GC-MS)

Пречистените и концентрирани екстракти се анализират на Газов хроматограф Thermo Scientific Electron Corporation, модел Focus GC с маспектрометър Ion Trap Polaris Q, САЩ и autosampler AI 3000. Инжекторът е в режим splitless (без разделяне на потока), с температура 250 °C. Обемът на инжектираната проба е 1 µL. Използвана е капилярна колона Thermo TG-5ms (неподвижна фаза 5%-полифенил-95% метилсилоксан) с дължина 30 m, вътрешен диаметър 0.25 mm и дебелина на филма 0.25 µm. Като газ-носител се използва хелий с чистота 99.999% при скорост на потока 1 mL/min. Разработена е температурна програма на термостатната камера: 40°C (1 мин), 40°C/min до 130°C (3 min), 12°C/min до 180°C, 7°C/min до 280°C, 10°C/min до 310°C с окончателно задържане за 5.0 min. При тези условия е постигнато пълно разделяне на анализираните компоненти. Параметрите на маспектрометър - Ion Trap са: температура на трансферната линия 250°C, а на йонният източник - 220°C, с електронна йонизация (EI) - 70 eV, филамент - Current Emission 250 uA.

Хроматографските условия са оптимизирани като е използван многокомпонентен сертифициран стандартен разтвор - EPA 525 PAH Mix B, Supelco с концентрация 500 µg/mL за всеки компонент в ацетон (Bellefonte, PA, USA) (аценафтилен, антрацен, бенз[а]антрацен, бензо[б]флуорантен, бензо[к]флуорантен, бензо[ghi]перилен, бензо[а]пирен, хризен, дибенз[а,h]антрацен, флуорен, индено[1,2,3-cd]пирен, фенантрен и пирен). От този стандартен разтвор чрез разреждане с хексан се приготвят серия работни стандартни разтвори с концентрации 10, 50 и 100 ng/mL. Всеки стандартен разтвор се анализира трикратно на газовия хроматограф. От получените средни стойности за трите стандартни разтвори се построява калибрационна права за всеки PAHs.

Идентифицирането на PAH се извършва чрез сравняване на времената на задържане на анализираните компоненти в пробата с тези на сертифицирания стандартен разтвор и чрез сравняване на получените маспектри с маспектрите в базата данни към газовия хроматограф. За количествена обработка на резултатите от хроматограмите се използва софтуер Finnigan Xcalibur. Детекцията на анализите е извършена чрез маспектрометър Polaris Q. Използван е MS<sup>n</sup> режим на работа на детектора, като са избрани подходящи параметри за йон трап система IT-MS POLARIS Q. Определени са подходящи йони (прекурсор йони) за всеки анализит и съответни енергии за разлагане на йона (CID). Използва се подходящата енергия на разлагане на прекурсор йон при конкретни интервали от време. В

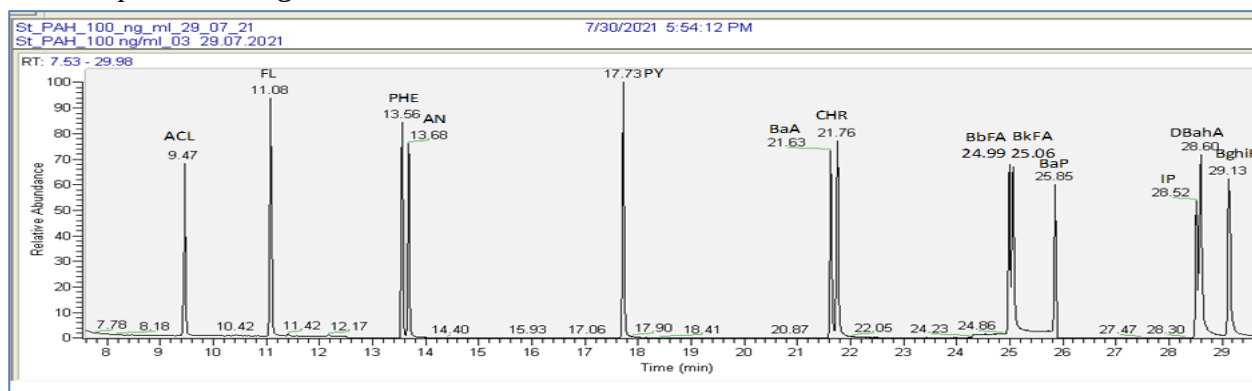
резултат на това се получава вторичен масспектр за всеки йон. Идентифицирането на РАН се извършва не само чрез сравняване на времената на задържане на всеки компонент с тези в стандартния разтвор, но и чрез специфичния вторичен масспектр на Прекурсор йона. Това е особено важно при сложни матрици каквито са билковите екстракти.

Времената на задържане на анализирани съединения РАНs (RT), прекурсор йоните, енергиите на разпад (CID), характерните резултатни йони (продуктови йони) са представени в Таблица 3. Оптимизирани параметрите на газовия хроматограф и масдетектора осигуряват максимална чувствителност на метода и добро разделяне на компонентите.

**Таблица 3.** Оптимизирани параметри на режим MS<sup>n</sup> на масспектрометъра

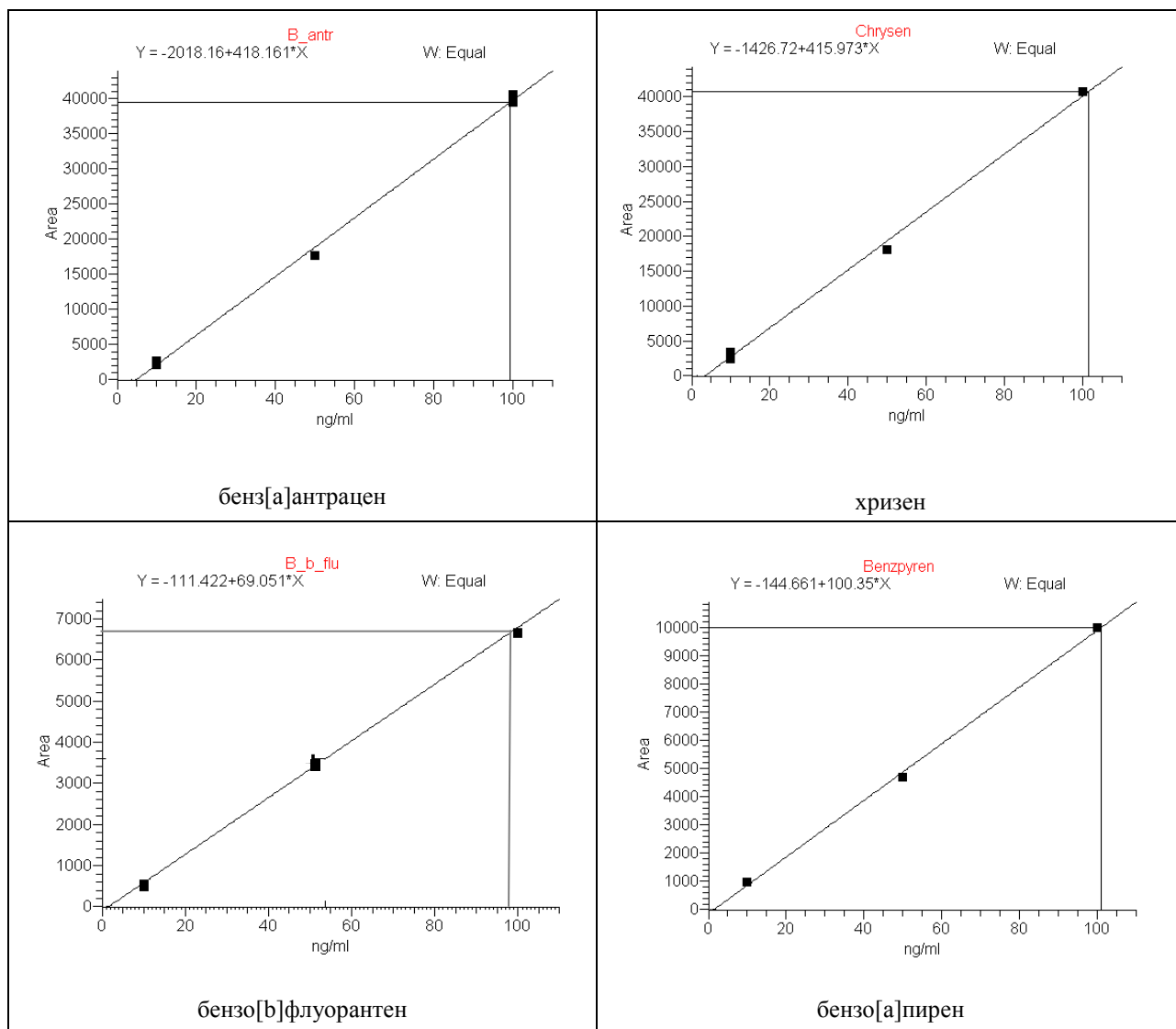
| РАНs<br>(наименование) | РАНs<br>абриви-<br>тура | Начално<br>време на<br>сегмента<br>min | Време на<br>задържане<br>min | Прекурсор<br>йон<br>m/z | CID<br>енергии за<br>разлагане,<br>eV | Обхват на<br>масите на<br>продуктовите<br>йони, m/z | Продуктови йони,<br>m/z |
|------------------------|-------------------------|----------------------------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|
| аценафтилен            | ACL                     | 8.00                                   | 9.47                         | 152.1                   | 3.00                                  | 76.0-160.0                                          | 98.1, 126.1, 152.1      |
| флуорен                | FL                      | 10.60                                  | 11.08                        | 165.1                   | 3.00                                  | 82.0-170.0                                          | 139.1, 165.2            |
| фенантрен              | PHE                     | 12.52                                  | 13.56                        | 178.1                   | 3.00                                  | 89.0-185.0                                          | 98.1, 152.1, 176.1      |
| антрацен               | AN                      |                                        | 13.68                        | 178.1                   | 3.00                                  | 89.0-185.0                                          | 98.1, 152.1, 176.1      |
| пирен                  | PY                      | 17.30                                  | 17.73                        | 202.2                   | 3.00                                  | 101.0-208.0                                         | 122.1, 174.1, 200.1     |
| бенз[а]антрацен        | BaA                     | 21.20                                  | 21.63                        | 228.2                   | 3.00                                  | 114.0-235.0                                         | 146.0, 200.1, 226.1     |
| хризен                 | CHR                     |                                        | 21.76                        | 228.2                   | 3.00                                  | 114.0-235.0                                         | 170.1, 202.1, 224.1     |
| бензо[б]флуорантен     | BbFA                    | 24.30                                  | 24.99                        | 252.2                   | 5.00                                  | 126.0-256.0                                         | 193.1, 179.1, 224.1     |
| бензо[к]флуорантен     | BkFA                    |                                        | 25.06                        | 252.2                   | 5.00                                  | 126.0-256.0                                         | 193.1, 179.1, 224.1     |
| бензо[а]пирен          | BaP                     |                                        | 25.85                        | 252.2                   | 5.00                                  | 126.0-256.0                                         | 193.1, 179.1, 224.1     |
| индено[1,2,3-сd]пирен  | IP                      | 28.10                                  | 28.52                        | 276.2                   | 4.00                                  | 138.0-288.0                                         | 222.1, 248.2, 274.2     |
| дибенз[а, h]антрацен   | DbahA                   |                                        | 28.60                        | 276.2                   | 4.00                                  | 138.0-288.0                                         | 224.2, 248.2, 274.2     |
| бензо[ghi]перилен      | BghiP                   |                                        | 29.13                        | 276.2                   | 4.00                                  | 138.0-288.0                                         | 222.1, 248.2, 274.2     |

На Фигура 3 е представена примерна хроматограма на стандартен разтвор на 13 РАНs с концентрация 100 ng/mL



**Фигура 3.** Хроматограма на стандартен разтвор на EPA 525 РАН Mix B, Supelco с концентрация на всеки аналит - 100 ng/mL

Калибрирането на Газовия хроматограф с масдетектор е извършено по метода на абсолютната калибровка като се използват сертифицирани стандартни разтвори (EPA 525 РАН Mix B, Supelco) в три концентрационни нива чрез интегриране на площите на хроматографските пикове. Калибрационни прави на стандартни разтвори на четирите приоритетни РАНs са дадени на Фигура 4, а останалите прави – в Приложение 2.



**Фигура 4.** Калибрационни прави на стандартни разтвори на 4 ПАНs

Резултатите за съдържанието на всяко отделно съединение от групата на полицикличните ароматни въглеводороди (ПАНs) са изчислени по формулите:

- Концентрацията на ПАНs в **изсушени билки и изсушени билкови чайове** се изчислява на база сухо тегло на билките и се изразява в  $\mu\text{g/kg dw}$ :

$$C_1 = \frac{C_{\text{ex}} \cdot V_{\text{ex}}}{m_1}$$

$C_1$ - концентрация на индивидуални ПАН в изсушена билка или билков чай,  $\text{ng/g dw}$  ( $\mu\text{g/kg dw}$ )

$C_{\text{ex}}$  - концентрация на индивидуални ПАН в пречистения екстракт, отчетена от Газовия хроматограф (GC-MS),  $\text{ng/mL}$

$V_{\text{ex}}$  - обем на пречистения и концентриран екстракт,  $\text{mL}$

$m_1$  - масата на изсушената билка или билков чай, взети за анализ  $\text{g}$



- Концентрацията на всеки индивидуален анализ от групата на РАНs във **воден екстракт** от изсушен билков чай се изчислява по формулата:

$$C_2 = \frac{C_{ex} \cdot V_{ex}}{V}$$

$C_2$  - концентрация на РАН във воден екстракт от изсушен билков чай, ng/L

$C_{ex}$  - концентрация на РАН в пречистения екстракт, отчетена от GC-MS, ng/mL

$V_{ex}$  - обем на пречистения и концентриран, mL

$V$  - обем на анализирания воден екстракт от изсушен билков чай, L

- Концентрацията на РАНs в **етанолови екстракти** от изсушени билки може да се изчисли на база сухо тегло на билките по формулата:

$$C_3 = \frac{C_{ex} \cdot V_{ex}}{m_2}$$

$C_3$  - концентрация на РАН в изсушена билка (спрямо масата на изсушената билка, от която е приготвен етаноловият екстракт) ng/g dw ( $\mu\text{g/kg dw}$ )

$C_{ex}$  - концентрация на РАН в пречистения екстракт, отчетена от GC-MS, ng/mL

$V_{ex}$  - обем на пречистения и концентриран екстракт, mL

$m_2$  - масата на анализирания изсушен билка, g

- **Степента на преминаване** (степен на екстракция)  $T\%$  на РАН от изсушен билков чай към негов воден или етанолов екстракт се изчислява по формулата:

$$T\% = \frac{m_{\text{РАН}_2} \cdot m_1}{m_2 \cdot m_{\text{РАН}_1}} \cdot 100$$

$m_{\text{РАН}_1}$  - маса на РАН, анализиран в изсушен билков чай, ng

$m_1$  - маса на изсушен билков чай при анализ на РАН в изсушен билков чай, g

$m_{\text{РАН}_2}$  - маса на РАН, във воден или етанолов екстракт на изсушен билков чай, ng

$m_2$  - маса на изсушен билков чай при анализ на РАН във воден или етанолов екстракт, g

### II.3.6. Валидиране на метода и контрол на качеството на анализите

Съгласно изискванията на БДС EN ISO/IEC 17025:2018 „Общи изисквания за компетентността на лаборатории за изпитване и калибриране“ са оценени аналитичните параметри на разработените методи. За количествено определяне на индивидуалните ПАХс (калибриране на газовия хроматограф) и параметрите на метода е използван сертифициран референтен стандартен разтвор (EPA 525 ПАХ Mix B, 500 µg/mL за всеки компонент в ацетон, Supelco). Метод на външния стандарт и анализ на сертифициран референтен материал са използвани, за да се оценят параметрите на метода - линейност, линеен обхват, LOD, LOQ, добив и повторяемост. Параметрите на валидиране на метода за анализ на ПАХс в лечебни растения и изсушени билкови чайове са представени в Таблица 4.

Границите на откриване (LOD) и границите на количествено определяне (LOQ) при анализ на ПАХс в лечебни растения и сухи билкови чайове са изчислени въз основа на стандартното отклонение, определено за анализирана празна проба с добавка на стандартен разтвор. LOD са определени като 3 пъти стандартното отклонение, а LOQ е концентрацията на анализа, съответстваща на 10 пъти стандартното отклонение. Границата на откриване (LOD) при анализ на ПАХс в лечебни растения и изсушени билкови чайове е от 0.15 до 0.36 µg/kg, а граница на количествено определяне (LOQ) - от 0.46 до 1.09 µg/kg (Таблица 4).

**Таблица 4.** Аналитични параметри на метод за количествено определяне на ПАХс в лечебни растения и изсушени билкови чайове.

| ПАХ   | Линеен обхват, µg/kg | Линейност, R <sup>2</sup> | Граница на откриване (LOD), µg/kg (n = 6) | Граница на количествено определяне (LOQ), µg/kg (n = 6) | Добив, % (n = 6) | Повторяемост RSDr, % (n = 6) |
|-------|----------------------|---------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------|------------------------------|
| ACL   | 2.5 - 200            | 0.9984                    | 0.23                                      | 0.75                                                    | 83.7 - 99.7      | 3.6 - 9.0                    |
| FL    | 2.5 - 200            | 0.9991                    | 0.16                                      | 0.54                                                    | 83.0 - 98.0      | 2.6 - 4.6                    |
| PHE   | 2.5 - 200            | 0.9992                    | 0.36                                      | 1.09                                                    | 91.3 - 108.3     | 4.1 - 6.3                    |
| AN    | 2.5 - 200            | 0.9997                    | 0.34                                      | 1.03                                                    | 83.1 - 102.1     | 5.0 - 5.6                    |
| PY    | 2.5 - 200            | 0.9998                    | 0.27                                      | 0.89                                                    | 83.6 - 100.6     | 4.2 - 7.4                    |
| BaA   | 2.5 - 200            | 0.9986                    | 0.17                                      | 0.51                                                    | 83.0 - 98.0      | 2.8 - 6.0                    |
| CHR   | 2.5 - 200            | 0.9978                    | 0.20                                      | 0.67                                                    | 83.5 - 98.5      | 3.2 - 5.9                    |
| BbFA  | 2.5 - 200            | 0.9971                    | 0.30                                      | 0.90                                                    | 77.5 - 92.5      | 5.3 - 7.3                    |
| BkFA  | 2.5 - 200            | 0.9995                    | 0.31                                      | 1.04                                                    | 77.4 - 92.4      | 5.4 - 8.5                    |
| BaP   | 2.5 - 200            | 0.9986                    | 0.15                                      | 0.46                                                    | 83.1 - 98.1      | 2.3 - 6.7                    |
| IP    | 2.5 - 200            | 0.9978                    | 0.27                                      | 0.89                                                    | 74.8 - 81.8      | 4.6 - 5.4                    |
| DbahA | 2.5 - 200            | 0.9998                    | 0.30                                      | 1.00                                                    | 75.3 - 82.3      | 5.1 - 9.1                    |
| BghiP | 2.5 - 200            | 0.9985                    | 0.19                                      | 0.59                                                    | 72.3 - 80.3      | 3.4 - 9.5                    |

n – брой анализи; R - коефициент на корелация; RSDr - повторяемост (относително стандартно отклонение)

Повторяемостта и точността на метода за анализ на ПАХс в лечебни растения и изсушени билкови чайове са установени чрез провеждане на пълна аналитична процедура на празни проби със стандартна добавка. Процедурата е проведена със стандартен разтвор на 13 ПАХс в три концентрационни нива - 2.5 µg/kg, 20.0 µg/kg и 200 µg/kg. Средните стойности на добив при метода за анализ на ПАХс в сухи билки и чайове са в диапазона 72.3 - 108.3%. Относителното стандартно отклонение в условия на повторяемост (RSDr) се определя като

една и съща проба, се анализира шест пъти в рамките на един ден ( $n = 6$ ). RSDr е в диапазона 2.3 - 9.5%, което показва, че методът има добра повторяемост в рамките на деня.

Границата на откриване (LOD) за метода на анализ на PAHs във водни екстракти на лечебни растения и билкови чайове варира в диапазона от 1.38 до 4.31 ng/L, а границата на количествено определяне (LOQ) варира от 4.61 до 14.38 ng/L (Таблица 5).

Точността и повторяемостта на метода за анализ на PAHs в водни екстракти на билков чай са определени чрез извършване на пълна аналитична процедура на празни проби със стандартна добавка на стандартен разтвор на 13 PAHs в три концентрационни нива: 20 ng/L и 100 ng/L и 300 ng/L. Средните стойности на добив за метода за инфузии при отделните PAHs варират в диапазона 72.0 - 89.2%. RSDr е в диапазона 2.8 - 11.5% (Таблица 5).

**Таблица 5.** Параметри на валидиране на метода за анализ на PAHs във водни екстракти на лечебни растения и билкови чайове.

| PAH   | Линеен обхват, ng/L | Линейност, $R^2$ | Граница на откриване (LOD), ng/L ( $n = 6$ ) | Граница на количествено определяне (LOQ), ng/L ( $n = 6$ ) | Добив, % ( $n = 6$ ) | Повторяемост RSD, % ( $n = 6$ ) |
|-------|---------------------|------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| ACL   | 20 - 300            | 0.9989           | 2.65                                         | 8.83                                                       | 80.0 - 83.5          | 5.5 - 11.1                      |
| FL    | 20 - 300            | 0.9995           | 1.38                                         | 4.61                                                       | 82.8 - 88.8          | 2.8 - 4.7                       |
| PHE   | 20 - 300            | 0.9993           | 3.05                                         | 10.17                                                      | 85.6 - 89.2          | 5.9 - 7.8                       |
| AN    | 20 - 300            | 0.9997           | 2.65                                         | 8.83                                                       | 81.3 - 83.4          | 5.4 - 6.6                       |
| PY    | 20 - 300            | 0.9996           | 4.18                                         | 13.95                                                      | 82.5 - 86.3          | 8.4 - 10.5                      |
| BaA   | 20 - 300            | 0.9989           | 3.86                                         | 12.87                                                      | 80.6 - 87.8          | 8.0 - 9.1                       |
| CHR   | 20 - 300            | 0.9988           | 2.31                                         | 7.70                                                       | 81.1 - 85.9          | 4.7 - 6.6                       |
| BbFA  | 20 - 300            | 0.9991           | 2.75                                         | 9.15                                                       | 73.5 - 76.8          | 6.2 - 8.3                       |
| BkFA  | 20 - 300            | 0.9995           | 3.58                                         | 11.93                                                      | 74.9 - 75.2          | 8.0 - 11.5                      |
| BaP   | 20 - 300            | 0.9988           | 4.31                                         | 14.38                                                      | 82.8 - 84.3          | 7.1 - 8.8                       |
| IP    | 20 - 300            | 0.9986           | 2.85                                         | 9.51                                                       | 72.2 - 75.5          | 6.6 - 7.4                       |
| DbahA | 20 - 300            | 0.9998           | 1.54                                         | 5.12                                                       | 71.4 - 72.1          | 3.6 - 11.0                      |
| BghiP | 20 - 300            | 0.9995           | 2.07                                         | 6.89                                                       | 72.0 - 75.8          | 4.8 - 11.5                      |

$n$  – брой анализи;  $R$  - коефициент на корелация; RSDr - повторяемост (относително стандартно отклонение);

Европейската комисия определя изискванията за аналитичните параметрите на методите за анализ на приоритетни PAHs в храни в Регламент (ЕС) № 836/2011 на ЕС от 19 август 2011 година. Тези изисквания включват - LOD по-малко или равно на 0.30  $\mu\text{g/kg}$ , LOQ по-малко или равно на 0.90  $\mu\text{g/kg}$  за всяко анализирано съединение. Изискването за аналитичния добив за тези PAHs е от 50 до 120% (Регламент (ЕС) № 836/2011). Изчислените аналитични параметри в настоящото изследване показват, че разработената аналитична процедура за определяне на PAHs съответства на изискванията на регламента.

### **Контрол на качеството**

Контролът на качеството е осигурен чрез: метод на стандартната добавка, анализ на празни и паралелни проби. Референтни стандартни разтвори са използвани за калибриране на Газов хроматограф, за количествено определяне на анализираните PAHs и определяне на

процентен добив. Празни проби (ултрачиста вода с чистота LC-MS или Milli-Q) са анализирани между всеки 5 проби, за да се наблюдава възможно лабораторно замърсяване на използваните реактиви и консумативи от околната среда. Проверка на стабилността на стандартните прави е осъществено чрез инжектиране на стандартни разтвори от анализирани компоненти непосредствено преди всяка серия от анализи. В случай, че разликата между сигналите на стандартните разтвори е по-голяма от 10%, е направена нова калибровка на хроматографската система. Стандартните прави се построяват отново.

От всяка индивидуална проба изсушена билка са разработени две паралелни проби (през целия аналитичен ход) и всеки получен пречистен екстракт е анализиран трикратно на Газов хроматограф с масдетекция. Полученият резултат е изчислен като средна стойност от шесте измерени концентрации.

#### **II.4. Аналитична процедура за определяне на токсични елементи в лечебни растения**

Определянето на токсични елементи е извършено съгласно аналитична процедура, описана в стандартизирани методи БДС EN 16943:2017 и БДС EN ISO 17294-2:2016, които включват минерализиране на изсушените лечебни растения (чрез микровълново разграждане с киселини), последвано от инструментално определяне на елементите Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Al и Co.

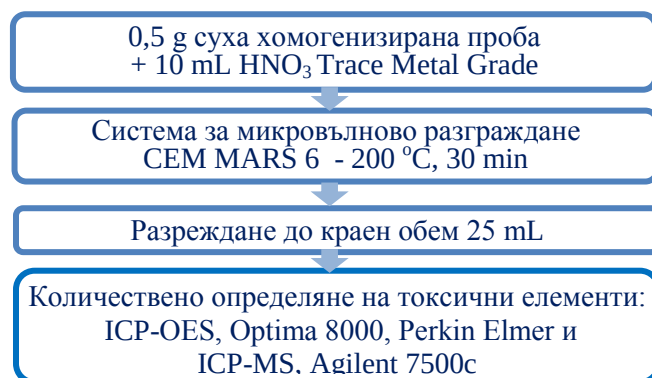
##### **II.4.1. Микровълново минерализиране на лечебни растения**

Изсушените билки от всеки вид проба се нарязват с керамичен нож и се стриват в порцеланов хапан. Стритата и хомогенизирана проба се претегля на аналитична везна (0.5 g) в тefлонов съд за микровълново разграждане. Към пробата се добавя 10 mL концентрирана азотна киселина (67-70% HNO<sub>3</sub> за ICP-OES с висока чистота „Trace Metal Grade“) и се минерализира чрез Система за микровълново разграждане CEM MARS 6 с програмиране на температурата - Таблица 6.

**Таблица 6.** Програма за контрол на температурата на Системата за микровълново разграждане CEM MARS 6

| Програма за контрол на температурата на Системата за микровълново разграждане |                     |                  |                    |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------|--------------------|
| Стъпка                                                                        | Начална температура | Време            | Крайна температура |
| 1.                                                                            | 25 <sup>0</sup> C   | 15 min нагряване | 200 <sup>0</sup> C |
| 2.                                                                            | 200 <sup>0</sup> C  | 15 min задържане | 200 <sup>0</sup> C |
| 3.                                                                            | 200 <sup>0</sup> C  | охлаждане        | 25 <sup>0</sup> C  |

След минерализиране, пробата се изчаква да се охлади и се прехвърля количествено в мерителна колба, като се разрежда до 25 mL с двойно дейонизирана вода. За всяка серия проби се анализира празна проба. Тя се подготвя като 10 mL от концентрираната азотна киселина се минерализира със Системата за микровълново разграждане при същите условия. След това празната проба се разрежда до 25 mL с двойно дейонизирана вода. Краткото време на подготовка и по-малките количества на реагенти подпомагат безопасната работа и правят метода по-евтин в дългосрочен план. На Фигура 5 е представена схема с етапите на пробоподготовка при определяне на токсични елементи в лечебни растения.



**Фигура 5.** Етапи на пробоподготовка при определяне на токсични елементи в лечебни растения

#### **II.4.2. Определяне на токсични елементи в лечебни растения чрез Атомно-емисионна спектроскопия с индуктивно свързана плазма (ICP-OES)**

Количественото определяне на Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Al в минерализираните проби изсушени билки е извършено чрез Оптично-емисионен спектрометър с индуктивно-свързана плазма (ICP-OES) Optima 8000, Perkin Elmer (в катедра Химия, МУ-Варна). Инструменталните параметри на спектрометъра при анализ на токсични елементи са представени в Таблица 7:

**Таблица 7.** Инструментални параметри на Оптично-емисионен спектрометър с индуктивно-свързана плазма Optima 8000, Perkin Elmer

| Параметър                                 | Стойност                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Радиочестотен генератор / RF power        | 1450 W                                                                                                                                                               |
| Наблюдение на плазмата / Plasma view      | Axial                                                                                                                                                                |
| Скорост на потока аргон (Ar) в плазмата   | 10 L/min                                                                                                                                                             |
| Скорост на допълнителния газов поток (Ar) | 0.4 L/min                                                                                                                                                            |
| Скорост на Ar в пулверизатора             | 0.6 L/min                                                                                                                                                            |
| Скорост на перисталтичната помпа          | 1.5 mL/min                                                                                                                                                           |
| Циклонна камера / Spray chamber           | Cyclonic glass                                                                                                                                                       |
| Пулверизатор / Nebulizer                  | Concentric glass                                                                                                                                                     |
| Брой измервания / Replicates              | 3                                                                                                                                                                    |
| Аналитични дължини на вълната (nm)        | Cd (228.80; 214.44), Cr (267.72; 283.56), Cu (327.39; 324.75), Fe (238.20; 259.94), Mn (257.61), Ni (231.60), Pb (220.35; 225.35), Zn (206.20; 213.86), Al (394.401) |

При оптимизиране на параметрите на ICP-OES е приложен метод на аксиално наблюдение на плазмата, т.к. очакваните стойности на токсичните елементи са в нисък концентрационен интервал. При този режим се постигат по-ниски граници на откриване на елементите. Количествено определяне на токсичните елементи в лечебните растения се извършва по метода на калибрационната права. Използван е многокомпонентен сертифициран сравнителен материал - стандартен разтвор ICP Calibration Standard – 23 components CPAchem, с концентрация 1000 mg/l за всеки компонент в 2% HNO<sub>3</sub> (Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Al). От този стандартен разтвор чрез разреждане с 2% HNO<sub>3</sub> се приготвят серия работни стандартни разтвори. Всеки стандартен разтвор се анализира трикратно на ICP-OES. От получените средни стойности за трите стандартни разтвори се построяват калибрационни прави за всеки елемент и на базата на направените калибровки елементите могат да бъдат количествено определени. Подготвя се празна калибровъчна проба (Calibration blank) (2 % азотна киселина), спрямо която се анализират трите стандартни разтвори за всеки елемент.

#### II.4.3. Определяне на токсични елементи в лечебни растения чрез масспектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS)

Получените резултати от анализите на токсични елементи в проби билки, събрани през 2018 г. показваха много ниски стойности за елементите Cd, Pb, Cr, Ni (някои от тях под границата на откриване). Преценихме, че е по-подходящо количественото определяне на елементите в пробите лечебни растения, събрани през 2019 г., да се извърши чрез инструментален метод с по-висока чувствителност като масспектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS), с цел получаване на по-прецизни резултати.

По тази причина минерализираните проби лечебни растения (събрани в периода май – юни 2019) бяха анализирани чрез масспектрометър с индуктивно свързана плазма (ICP-MS) модел Agilent 7500c (Agilent Technologies, US) в Регионална лаборатория – Варна, Изпълнителна агенция по околна среда. Предимството на този инструментален метод е, че извършва бързо и едновременно измервания на множество елементи в различни проби с изключително ниски граници на откриване. Неговата висока чувствителност позволява откриването на микроелементи в сложни матрици, каквито са лечебните растения. Усъвършенстваната йонна оптика на инструмента и мощният квадруполен мас-филтър осигуряват много висока разделителна способност на масите и прецизни изотопни измервания, повишавайки точността на резултатите. Системата също така предлага широк концентрационен диапазон на измерване, позволяващ анализ на елементи както при следи, така и при по - високи концентрации.

Количествено е определено съдържанието на елементите Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Al и Co в минерализираните проби лечебни растения (събрани през 2019) чрез ICP-MS, модел Agilent 7500c – инструменталните параметри са представени в Таблица 8.

**Таблица 8.** Инструментални параметри на масспектрометър с индуктивно свързана плазма (ICP-MS) модел Agilent 7500c.

| Параметър                                                              | Стойност                                |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Плазма и въвеждане на пробите:</b>                                  |                                         |
| Радиочестотен генератор / RF power                                     | 1550 W                                  |
| Скорост на потока (Ar) в плазмата / Plasma gas flow                    | 15 L/min                                |
| Скорост на потока (Ar) / Carrier gas flow                              | 1.05 L/min                              |
| Пулверизатор тип / Nebulizer:                                          | Babington                               |
| Помпа на пулверизатора / Nebulizer pump:                               | 0.15 rps                                |
| Интерфейс: Никелов конус за вземане на проби и никелов конус за скимер |                                         |
| Напрежения на йонните леци-оптимизирани за чувствителност              | 10 µg/L tuning solution (Li,Y,Ce,Tl,Co) |
| <b>Циклонна камера / Spray chamber Water-cooled double pass</b>        |                                         |
| Температура на циклонната камера                                       | 5°C                                     |
| Torch H                                                                | 0.6 mm                                  |
| Torch V                                                                | -0.2 mm                                 |
| <b>Параметри на детектора:</b>                                         |                                         |
| Pulse HV:                                                              | 1240 V                                  |
| Analog HV:                                                             | 1770 V                                  |
| <b>Data Acquisition - режим</b>                                        | Peak hopping                            |
| <b>Време за интегриране:</b>                                           |                                         |
| за Fe                                                                  | 0.1 s/point                             |
| за Cd, Zn                                                              | 0.2 s/point                             |
| за Ni, Cr, Pb, Cu, Mn, Al и Co                                         | 0.3 s/point                             |
| Peak pattern                                                           | 6 points/peak                           |
| Брой измервания / Replicates                                           | 3 за стандартите, 3 за пробите          |
| <b>Параметри на реакционната клетка</b>                                |                                         |
| Скорост на потока He в клетката / Cell gas flow:                       | He 5.0 mL/min                           |

Използван е многокомпонентен сертифициран стандартен разтвор за ICP - Initial Calibration Standard solution – 26 components CPAchem, с концентрация на различните компоненти от 1000 mg/l до 10 mg/l в 5% HNO<sub>3</sub> (Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Al, Co). От този стандартен разтвор чрез разреждане се приготвят работните стандартни разтвори. Всеки стандартен разтвор се анализира трикратно на ICP-MS и се построява стандартна права чрез софтуера на апарата. Приготвянето на стандартните разтвори е съгласно БДС EN ISO 17294-2:2016. Дейонизирана вода (дейонизатор на Merck - Milli-Q® Direct Water Purification System) и азотна киселината на Merck – Suprapur са използвани при приготвяне на разтворите за калибриране на ICP-MS.

#### Изчисляване на резултатите:

Концентрацията на елемента в анализираната проба ( $C_{\text{проба}}$ , mg/kg dw) се изчислява съгласно формула:

$$C_{\text{проба}} = \frac{(C_{\text{анализ. р-р}} - C_{\text{анализ. р-р}}^0) \cdot V_{\text{минерализат}}}{m_{\text{анализ. проба}}},$$

където:  $C_{\text{анализ. р-р}}$  - концентрация на елемента в анализирания разтвор, µg/L

$C_{\text{анализ. р-р}}^0$  - концентрация на определяемия елемент в празна проба (µg/L)

$V_{\text{минерализат}}$  - обем на минерализата (0,025 L)

$m_{\text{анализ. проба}}$  - масата на взетата за анализ суха билка (g)

#### II.4.4. Верифициране на метода и контрол на качеството на анализите

Определени са границите на откриване (LOD) и границите на количествено определяне (LOQ) на елементите, анализирани с Атомно-емисионна спектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-OES метод). Границите на откриване и границите на количествено определяне на токсичните елементи с ICP-OES са в интервала съответно 0.004-0.720 mg/kg dw и 0.012-2.410 mg/kg dw.

Определени са границите на откриване (LOD) и границите на количествено определяне (LOQ) на елементите, анализирани с Масспектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS метод). Границите на откриване и границите на количествено определяне на токсичните елементи с ICP-MS са в интервала съответно 0.002-0.150 mg/kg dw и 0.005-0.500 mg/kg dw.

LOD са определени и за двата метода като 3 пъти стандартното отклонение, а LOQ е концентрацията на анализа, съответстваща на 10 пъти стандартното отклонение и за двата метода. Стандартното отклонение в условия на повторяемост (SDr) са определени като една и съща проба, се анализира три пъти в рамките на един ден ( $n = 3$ ).

Сертифициран референтен материал (SRM) в матрица - листа от *Camellia sinensis* (green tea, leaves) е анализиран по цялата процедура, за да бъде оценена точността на резултатите от анализ на елементите в настоящото изследване. Сертифицираният референтен материал е с кат.№ NIST3254 (15 g, 5 опаковки по 3g) и съдържа токсичните метали Pb, Cd, Cu, Fe, Zn със сертифицирани стойности за концентрации съответно 1.73, 0.037, 11.34, 273, 24.7 mg/kg dw. Сертифицираният референтен материал е разработен по метода, описан в експерименталната част: след микровълново разграждане са анализирани Pb, Cd, Cu, Fe, Zn с масспектрометър с индуктивно свързана плазма ICP-MS Agilent 7500с.

В Таблица 9 са представени резултатите от анализ на Сертифициран референтен материал (SRM) в матрица листа от *Camellia sinensis* (green tea, leaves).



**Таблица 9.** Резултати от анализ на Сертифициран референтен материал (SRM) в матрица листа от *Camellia sinensis* (green tea, leaves)

| Елемент   | Сертифицирана стойност, mg/kg dw | Анализирана стойност, mg/kg dw | Добив, % |
|-----------|----------------------------------|--------------------------------|----------|
| <b>Pb</b> | 1.73 ± 0.19                      | 1.61 ± 0.08                    | 93.24    |
| <b>Cd</b> | 0.037 ± 0.002                    | 0.036 ± 0.002                  | 97.23    |
| <b>Cu</b> | 11.34 ± 0.46                     | 10.93 ± 0.21                   | 96.40    |
| <b>Fe</b> | 273 ± 17                         | 259 ± 12                       | 94.75    |
| <b>Zn</b> | 24.7 ± 1.2                       | 21.8 ± 2.2                     | 88.23    |

За сравнение на сертифицираните и анализирани стойности на концентрациите на токсичните елементи в Сертифицирания референтен материал е използвана методика описана от Linsinger (Linsinger, 2005). Резултатите показваха, че концентрациите за Pb, Cd, Cu, Fe, Zn не се различават значително от сертифицираните им стойности, което доказва точността на метода. Средните стойности на добива при отделните токсични елементи варират в диапазона 88.23- 97.23%.

Контролът на качеството включва анализ на празна проба по време на инструменталното определяне на елементите в минерализата, която представлява 2 % HNO<sub>3</sub>. Празна проба (10 mL концентрираната азотна киселина) се анализира с всяка серия проби при микровълновото разграждане.

## II.5. Статистическа обработка и анализ на резултатите

Статистически изчисления са направени чрез софтуерен пакет SPSS V19.0, Windows (SPSS Inc., Чикаго, Илинойс, САЩ).

Определените концентрации на изследваните замърсители в проби лечебни растения са обработени статистически с чрез параметри на дискриптивната статистика: средни стойности, стандартни отклонения, минимална и максимална стойност. Направена е проверка на статистически хипотези за сравнение на получените средни стойности на замърсителите по видове билки и по райони. За ниво на статистическа сигурност е прието 95% ( $p < 0.05$ ). Статистическата хипотеза е предположение за вида на неизвестна функция на разпределение на наблюдавани случайни променливи величини или за параметрите на функция на разпределение от известен вид.

Дефинира се  $H_0$ , която гласи, че средните величини на измерените стойности в проби от двата изследвани района на замърсяване или между два различни вида билки не се различават съществено.  $H_1$  гласи, че средните величини на стойностите измерени в проби от двата изследвани района се различават съществено. Сравняват се възприетото равнище на значимост  $\alpha = 0.05$  (5% риск за грешка) при вероятност  $p = 95\%$  и оцененото гранично равнище на значимост  $p$ . Ако  $p > 0.05$  - може да се направи заключение, че няма основание да се отхвърли нулевата хипотеза  $H_0$  и вариацията на стойностите на измерените замърсители в двата изследвани района, както и техните средни стойности не се различават съществено. Ако  $p < 0.05$  се отхвърля нулевата и се възприема алтернативната хипотеза - съществува статистически значима разлика в средните стойности и вариацията на замърсителите в двата изследвани района.



## III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

### III.1. Резултати за съдържание на полициклични ароматни въглеводороди

В настоящата работа са определени нивата на тринадесет сродни съединения PAHs - аценафтилен, флуорен, фенантрен, антрацен, пирен, бенз[а]антрацен, хризен, бензо[б]флуорантен, бензо[к]флуорантен, бензо[а]пирен, индено[1,2,3-сd]пирен, дибенз[а, h]антрацен, бензо[ghi]перилен в проби диворастящи лечебни растения, сухи билкови чайове, водни и етанолови екстракти на сухи билкови чайове.

#### III.1.1. Съдържание на PAHs в лечебни растения, събрани в района на Варна

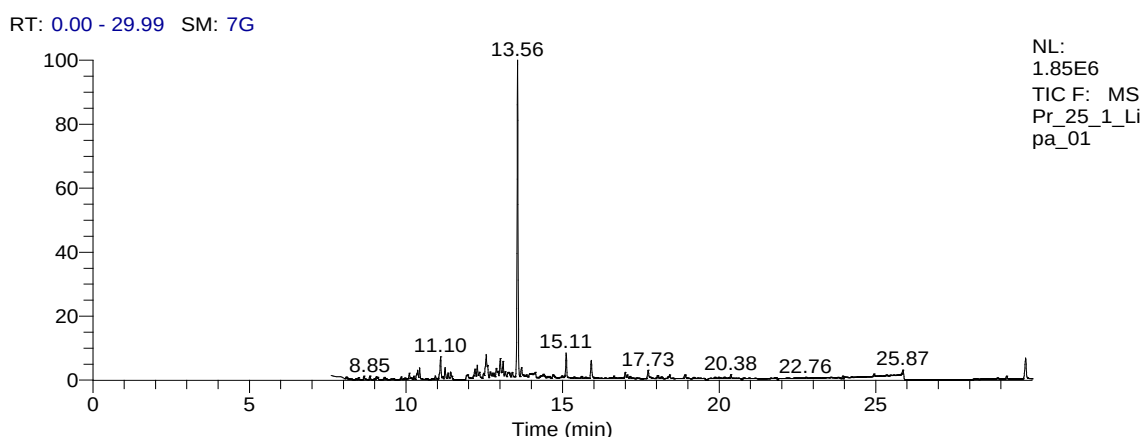
Анализирани са 43 проби от пет вида лечебни растения *Matricaria chamomilla* L., *Achillea millefolium* L., *Tilia tomentosa* Moench, *Sambucus nigra* L. и *Thymus serpyllum* L. събрани в период от две години (2018 г. - 2019 г.) от екологично чист район (местност Фичоза), от райони с натоварен автомобилен трафик в гр. Варна (бул. Сливница, ул. Батак и ул. Първа) и промишлени райони в област Варна (ТЕЦ-Девня, Девня-цимент, Екарисаж, Асфалтова база).

Резултатите от направеното проучване са обобщени по видове билки, по райони на пробовземане и по години. Концентрациите на PAHs са представени на база сухо тегло на всяка билка.

EFSA е определила четири полициклични ароматни въглеводороди (4PAHs) като маркери за експозицията на PAHs: бензо[а]пирен, бенз[а]антрацен, бензо[б]флуорантен и хризен, заради тяхното неблагоприятно влияние върху човешкото здраве.

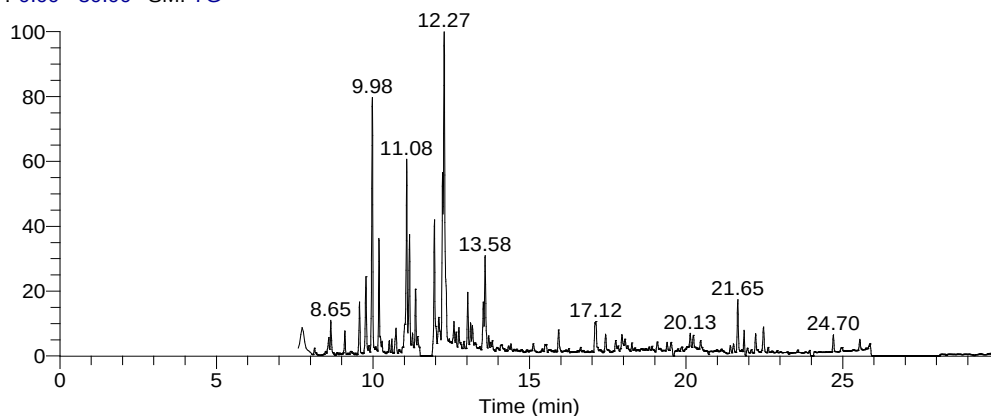
#### Съдържание на PAHs по видове лечебни растения

На Фигури 6, 7, 8, 9 и 10 са представени избрани хроматограми от Газов хроматограф на изследвани различни видове лечебни растения: *Tilia tomentosa* Moench, *Achillea millefolium* L., *Sambucus nigra*, *Thymus serpyllum* L. и *Matricaria chamomilla* L.:



Фигура 6. Хроматограма на проба № Pr\_25\_1 липа

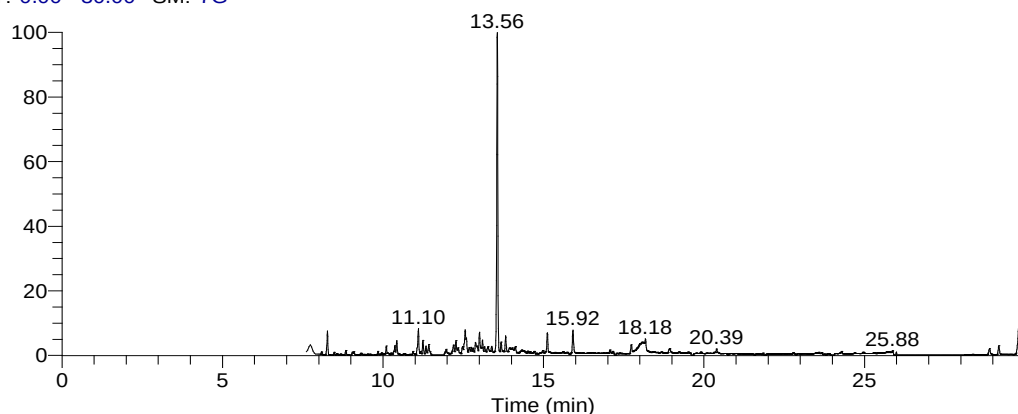
RT: 0.00 - 30.00 SM: 7G



NL:  
1.40E6  
TIC F: MS  
Pr\_9\_3\_Bja  
l\_ravnec\_0  
2

**Фигура 7.** Хроматограма на проба № Pr\_9\_3 бял равнец

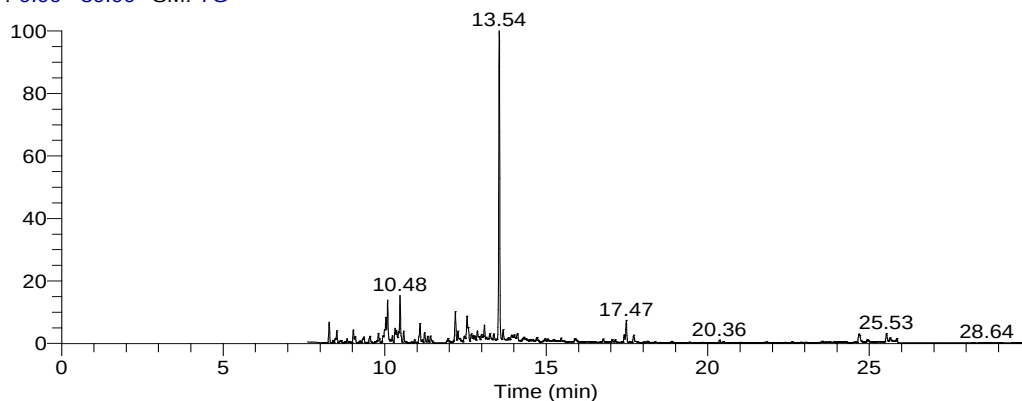
RT: 0.00 - 30.00 SM: 7G



NL:  
4.67E6  
TIC F: MS  
Pr\_23\_1\_B  
uzz\_d\_MS  
\_01

**Фигура 8.** Хроматограма на проба № Pr\_23\_1 черен бъз

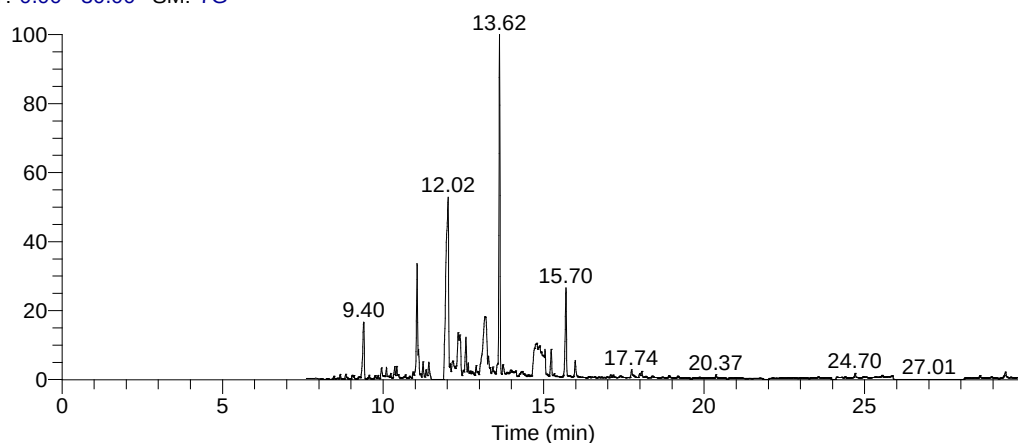
RT: 0.00 - 30.00 SM: 7G



NL:  
3.52E6  
TIC F: MS  
Proba\_14\_  
1\_2\_Master  
ka\_bez\_do  
bavka

**Фигура 9.** Хроматограма на проба № Pr\_14\_1 машерка

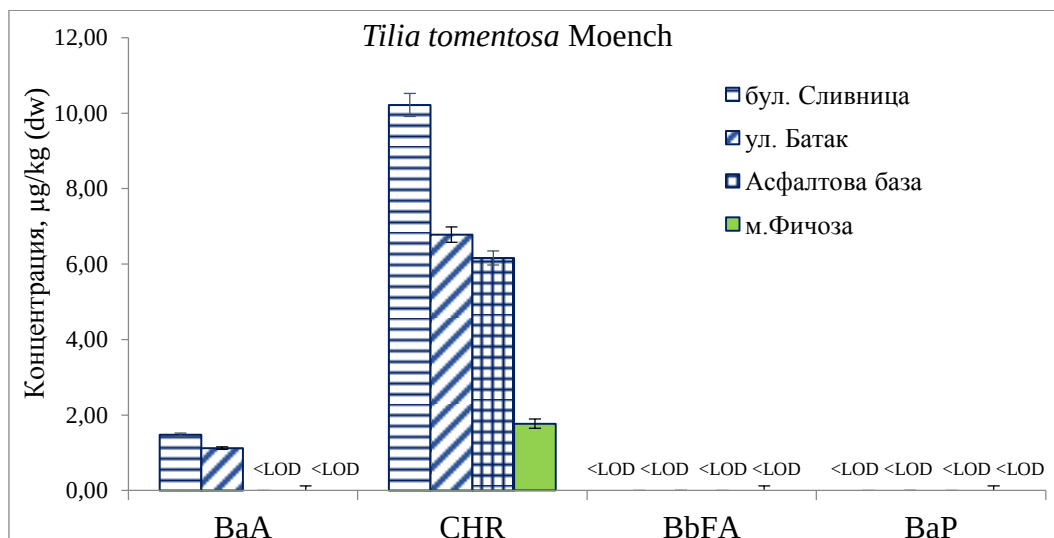
RT: 0.00 - 30.00 SM: 7G



NL:  
5.48E6  
TIC F: MS  
Pr\_24\_1\_L  
ajka\_01

**Фигура 10.** Хроматограма на проба № Pr\_24\_1 лайка

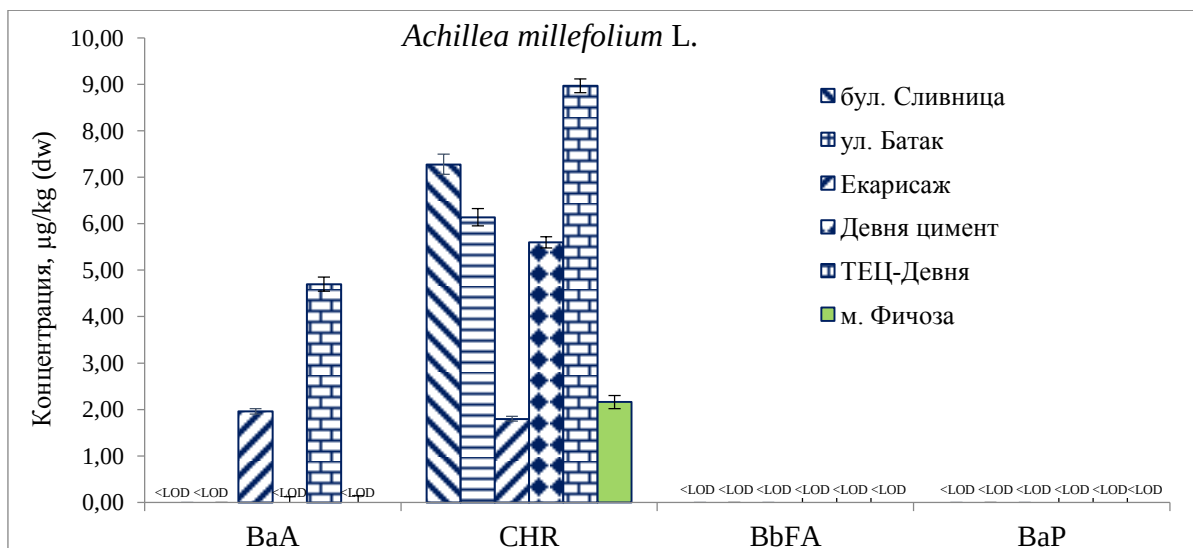
На Фигура 11 са сравнени средни концентрации на 4РАНs, определени от ЕС като маркери (Регламент (ЕС) 2015/1933) в Сребролистна липа, събрана от различни райони за целия период на пробовземане:



**Фигура 11.** Сравнение на средни концентрации на 4РАНs, определени в Сребролистна липа, събрана от различни райони за целия период на пробовземане (<LOD – под границата на откриване на метода)

За събраните от всички райони лечебни растения от вид *Tilia tomentosa* Moench, от четирите определени от EFSA приоритетни PAHs, хризенът беше установен като най-разпространеното съединение. Най-висока е средната стойност на това съединение за липа, събрана 2018 и 2019 г. в района на бул. Сливница. Средната концентрация на хризен в липа, събрана от Фичоза е по-ниска от средните концентрации на билката, събрана от райони близо да източници на замърсяване. Средните концентрации на бенз[а]антрацен са над границата на откриване на метода само за билки, събрани в района на булевард Сливница и Батак. Вероятно това се дължи на влиянието на високия автомобилен трафик и неравномерната скорост на транспортните средства в района. Бензо[а]пирен във всички проби липа е по-нисък от определената от Европейската комисия максимално допустима концентрация от 10 µg/kg. За бензо[а]пирен и бензо[б]флуорантен нивата за липа са под границата на откриване на метода за билки, събрани от всички райони (Фигура 11).

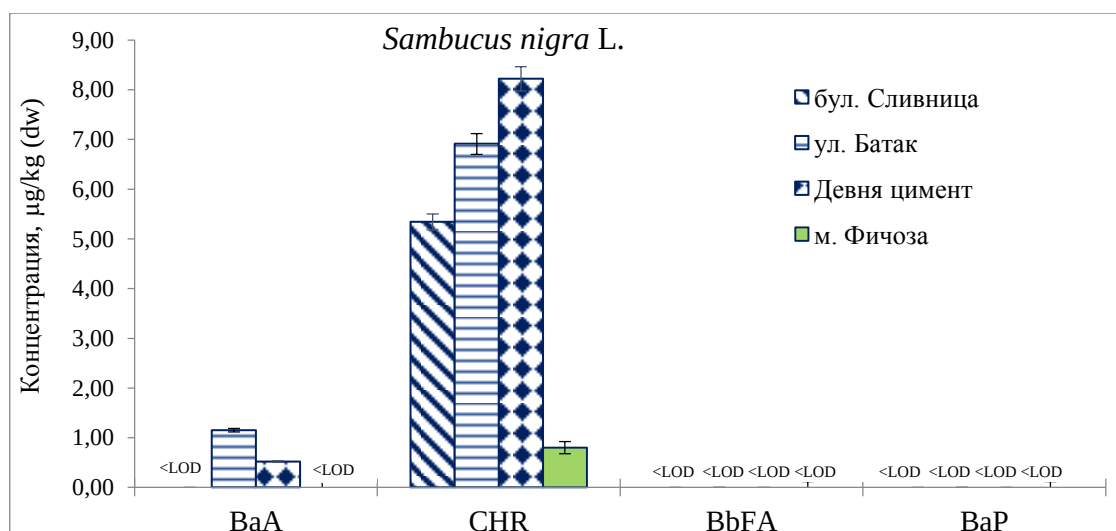
Идентичен е профилът на приоритетните PAHs (определени от Европейската комисия) и в проучвания на други автори. В изследвани проби липа от 4-те PAHs преобладават нивата на хризен – 8.58 µg/kg (Ciecierska & Obiedzinski, 2009), 11 µg/kg (Schulz et al., 2014) и 72.4 µg/kg (Ciemniak et al., 2019). В изследвания на други автори нивата на бенз[а]пирен (BaP) също са ниски. Например за BaP са под границата на количествено определяне в проби от изсушен чай от липа (Ciecierska & Obiedzinski, 2009). На Фигура 12 са сравнени средни концентрации на 4РАНs в Бял равнец, събран от различни райони за целия период



**Фигура 12.** Сравнение на средни концентрации на 4РАНs в Бял равнец, събран от различни райони за целия период на пробовземане (<LOD – под граница на откриване на метода)

Нивото на хризен в *Achillea millefolium* L. е най-високо за всички райони. Най-висока е средната стойност на хризен в бял равнец от района на ТЕЦ-Девня. Средната концентрация на хризен, установена в *Achillea millefolium* L., взета от района на ТЕЦ-Девня е по-висока отколкото в този вид билка, събрана в район с висок трафик вероятно поради по-високи моментни концентрации на тези съединения в атмосферния въздух, движение на атмосферния въздух от източника към съответното място на пробовземане, наличието на дъждове преди района на пробовземане и отдалеченост на събраните растения от източника на замърсяване. Бенз[а]антрацен е анализиран над границата на откриване на метода само в бял равнец, събран от района около ТЕЦ-Девня и Екарисаж. Бензо[а]пирен във всички проби бял равнец е по-нисък от определената от Европейската комисия максимално допустима концентрация от 10 µg/kg dw. За бензо[а]пирен и бензо[б]флуорантен нивата за бял равнец са под границата на откриване на метода за билки, събрани от всички райони (Фигура 12).

Направено е сравнение на средни концентрации на 4РАНs в Черен бъз, събран от различни райони за целия период и е представено на Фигура 13:

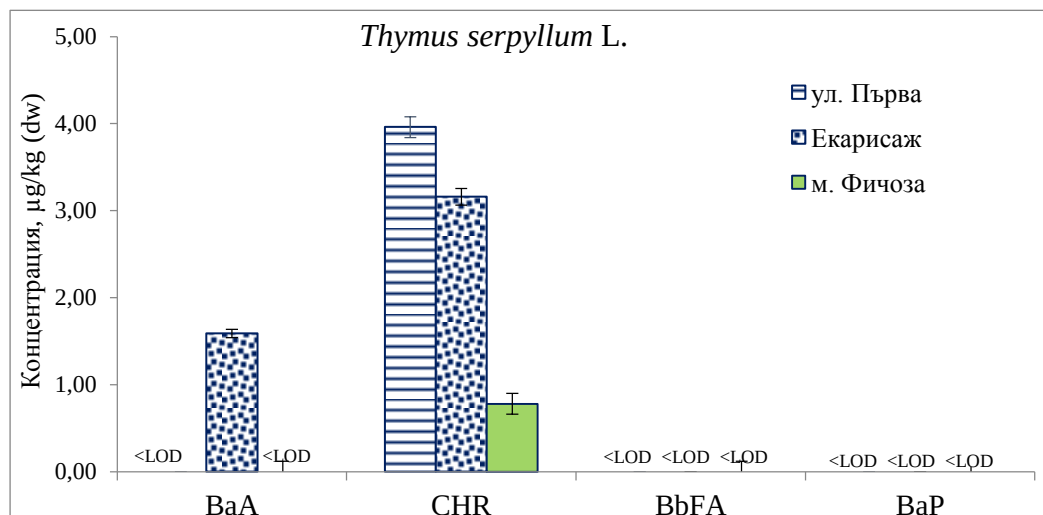


**Фигура 13.** Сравнение на средни концентрации на 4РАНs в Черен бъз, събран от различни райони за целия период на пробовземане (<LOD – под граница на откриване на метода)

Съдържанието на хризен е преобладаващо и в *Sambucus nigra* L. за всички райони на пробовземане. Най-висока е стойността му в Черен бърз, събран в района на ул. Батак. Вероятно се дължи на високото съдържание на ПАХs, отделени в отпадните газове от двигателите на автомобилите. Средната концентрация на хризен в Черен бърз, събран през 2018 и 2019г. от Фичоза е по-ниска от средните концентрации на билката, събрана от райони близо до източници на замърсяване. Бенз[а]антрацен е анализиран над границата на откриване на метода само в Черен бърз, събран от района около ул. Батак и Девня цимент. Бензо[а]пирен във всички проби Черен бърз е по-нисък от определената от Европейската комисия максимално допустима концентрация от 10 µg/kg dw. За бензо[а]пирен и бензо[б]флуорантен нивата за Черен бърз са под границата на откриване на метода за билки, събрани от всички райони (Фигура 13).

В проучване на Muntean са представени изследвания на ПАХs, в цветове на бърз (Muntean et al., 2017). В посочената публикация установените концентрации за бензо[а]пирен в бърз също са под определената норма от Европейската комисия - 10 µg/kg dw.

Направено е сравнение на средни концентрации на 4ПАХs в Дива мащерка, събрана от различни райони за целия период (Фигура 14):



**Фигура 14.** Сравнение на средни концентрации на 4ПАХs определени в Дива мащерка, събрана от различни райони за целия период на пробовземане (<LOD – под граница на откриване на метода)

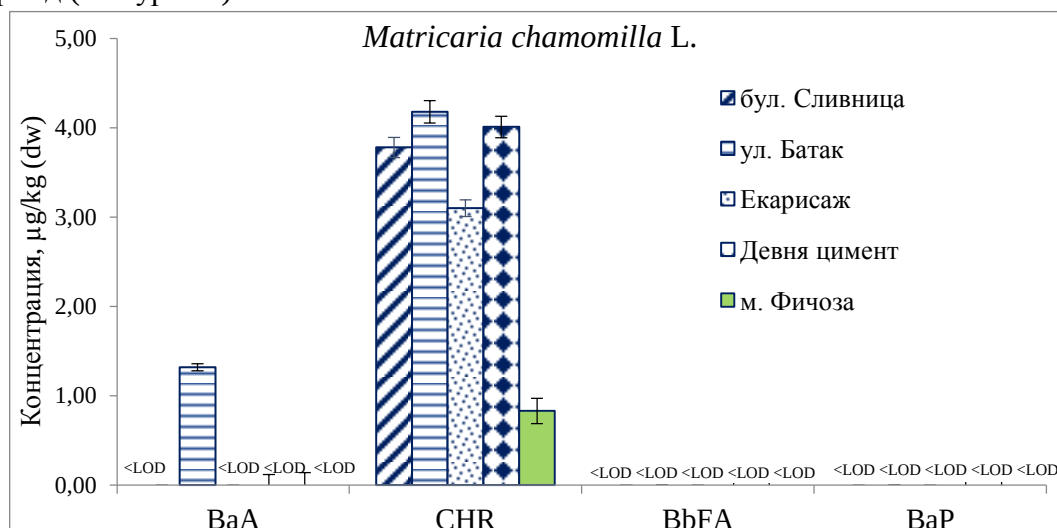
От четирите приоритетни ПАХs, средната концентрация на хризен за 2018 и 2019 г.в *Thymus serpyllum* L. е най-висока за всички райони. Най-висока е средната му стойност в Дива мащерка, събрана в района на ул. Първа. Вероятно се дължи на влиянието на процесите на горене и изпарение на горивото в двигателите на автомобилите. Средната концентрация на хризен в мащерка, събрана от Фичоза е по-ниска от средните концентрации на билката, събрана от райони близо до източници на замърсяване. Бенз[а]антрацен е анализиран над границата на откриване на метода само в Дива мащерка, събрана от района на Екарисаж. Бензо[а]пирен във всички проби мащерка е по-нисък от определената от Европейската комисия максимално допустима концентрация от 10 µg/kg dw. За бензо[а]пирен и бензо[б]флуорантен нивата за мащерка са под границата на откриване на метода за билки, събрани от всички райони (Фигура 14).

В две проучвания на Krajian и на Rozentale също установяват, че в проби мащерка от четирите приоритетни ПАХs най-високи са концентрациите на хризен. В първото проучване в

2013), а при второто в 25 анализирани проби мащерка средната стойност е 9.22 µg/kg, от които в един биопроduct - 2.95 µg/kg (Rozentale et al., 2018).

В 24 проби мащерка, взети от търговската мрежа в Полша и един биопроduct от Китай е установена средна концентрация на бензо[а]пирен съответно – 4.20 и 1.29 µg/kg. Стойностите на бензо[а]пирен са ниски и са под определената норма от Европейската комисия - 10 µg/kg. В това проучване концентрациите на хризен и бензо[а]пирен в биопроducta е по-ниска от останалите, както в нашето проучване е по-ниска концентрацията на тези конгенери в билки събрани от район Фичоза. (Rozentale et al., 2018).

Сравнени са средни концентрации на 4РАНs в Лечебна лайка, събрана от различни райони за целия период (Фигура 15):



**Фигура 15.** Сравнение на средни концентрации на 4РАНs определени в Лечебна лайка, събрана от различни райони за целия период на пробовземане (<LOD – под граница на откриване на метода)

Съдържанието на хризен е преобладаващо и в *Matricaria chamomilla* L. за всички райони на пробовземане. Най-висока е средната му стойност в Лечебна лайка, събрана 2018 и 2019 г. в района на ул. Батак. Средната концентрация на хризен в лайка, събрана от Фичоза е по-ниска от средните концентрации на билката, събрана от райони близо до източници на замърсяване. Бенз[а]антрацен е анализиран над границата на откриване на метода само в лайка, събрана от района на ул. Батак. Бензо[а]пирен във всички проби лайка е по-нисък от определената от Европейската комисия максимално допустима концентрация от 10 µg/kg (Регламент (ЕО) № 1881/2006 на ЕС). За бензо[а]пирен и бензо[б]флуорантен нивата за лайка са под границата на откриване на метода за билки, събрани от всички райони (Фигура 15).

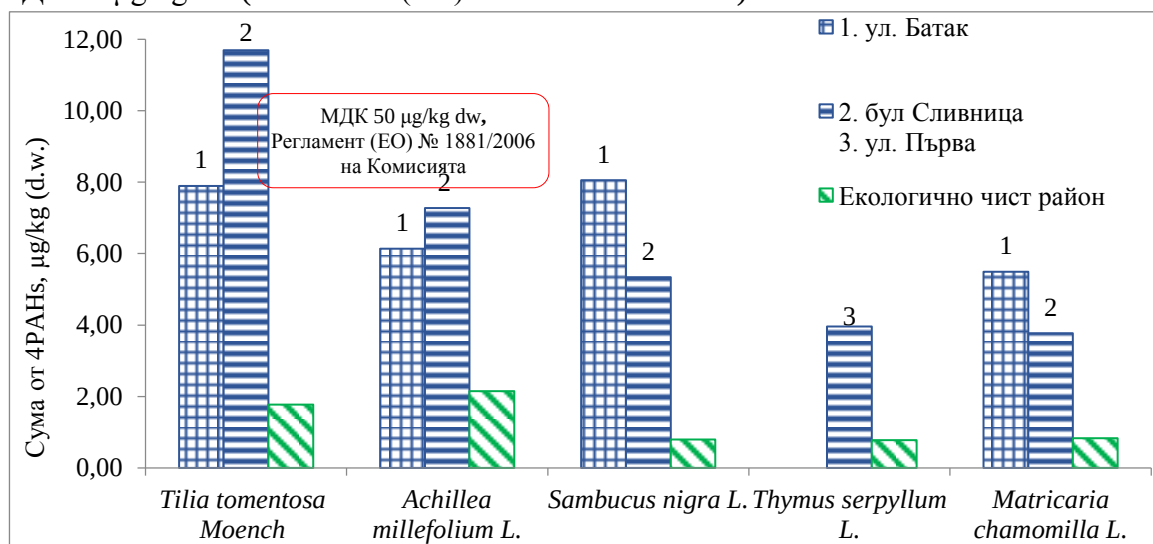
В проучвания на други автори от анализирани 4РАНs маркери в проби лайка също най-висока е концентрацията на хризен – от 3.4 до 6.0 µg/kg (Schulz et al., 2014), от 3.32 до 5.23 µg/kg (Holland et al., 2015) и 2.9 µg/kg (Ciemniak et al., 2019). Същият извод правят и автори от Румъния и Полша, като посочват хризен за преобладаващ маркер за оценка на експозицията на РАНs в лайка (Muntean et al., 2017).

В изследване на J. Holland, в проби чай от лайка, предоставени от Агенция за събиране на проби „Hallmark“ от Великобритания е установена концентрация на бензо[а]пирен 1.04 µg/kg (Holland et al., 2015). В друго проучване (Ciemniak et al., 2019) в чай от лайка, взети от търговски обекти в град Шчечин, Полша е определена концентрация на бензо[а]пирен 1.10 µg/kg. В посочените публикации установените концентрации за бензо[а]пирен в мащерка също са под определената норма от Европейската комисия - 10 µg/kg dw (Регламент (ЕО) №

1881/2006 на ЕС). Средните стойности на сумата от 13РАНs в пет вида лечебни растения, събрани от екологично чист район бяха сравнени. При статистическата обработка на данните се установи, че съществува статистически значима разлика между средната стойност на сумата от 13РАНs в липа и бял равнец ( $p < 0.05$ ), в липа и бъз ( $p < 0.05$ ), в липа и мащерка ( $p < 0.05$ ), в бял равнец и лайка ( $p < 0.05$ ), бъз и лайка ( $p < 0.05$ ) и мащерка и лайка ( $p < 0.05$ ).

### Съдържание на РАНs в лечебни растения по райони

На Фигура 16 е дадено сравнение на средната стойност на сумата от 4РАНs в лечебни растения от райони с интензивен трафик и екологично чист район за целия период на пробовземане. Сумата от 4РАНs в лечебните растения, събрани през целия период е значително по-висока за лечебни растения, събрани от райони с интензивен трафик в сравнение с проби от екологично чист район, вероятно поради интензивния автомобилен трафик като основен източник на РАНs. За лечебни растения, събрани през целия период от екологично чисти райони и райони с интензивен трафик няма стойности на сумата от 4РАНs над МДК 50  $\mu\text{g/kg dw}$  (Регламент (ЕО) № 1881/2006 на ЕС).



**Фигура 16.** Сравнение на средната стойност на сумата от 4РАНs в лечебни растения от райони с интензивен трафик и екологично чист район за целия период на проучването

Сумата от 4РАНs за всички растителни видове от екологично чист район (местност Фичоза) са в диапазона от 0.68 (*Sambucus nigra* L.) до 2.37  $\mu\text{g/kg dw}$  (*Achillea millefolium* L.) за първия период на пробовземане и от 0.73 (*Thymus serpyllum* L.) до 2.11  $\mu\text{g/kg dw}$  (*Tilia tomentosa* Moench) за втория период на пробовземане. Резултатите за билки, събрани през първия период на пробовземане от район с натоварен трафик показват най-високи нива на сумата от индивидуалните 4РАНs в *Tilia tomentosa* Moench 7.48  $\mu\text{g/kg dw}$  и 6.82  $\mu\text{g/kg dw}$  (съответно събрани до ул. Батак и бул. Сливница) и в *Sambucus nigra* L. 9.02  $\mu\text{g/kg dw}$  (ул. Батак), а най-ниски стойности в *Matricaria chamomilla* L. (1.80  $\mu\text{g/kg dw}$ , ул. Батак). Резултатите за билки, събрани през втория период на пробовземане от район с натоварен трафик са с най-високи стойности на сумата от 4РАНs в *Tilia tomentosa* Moench 8.31  $\mu\text{g/kg dw}$  и 16.57  $\mu\text{g/kg dw}$  (съответно събрани до ул. Батак и бул. Сливница), а най-ниски стойности в *Thymus serpyllum* L. (4.61  $\mu\text{g/kg dw}$ , ул. Батак).

Средната стойност на сумата от 4РАНs в липа за целия период е по-висока отколкото в другите билки и за двата транспортни района. Това вероятно се дължи на особеностите в повърхностния слой на това лечебно растение. Химичните свойства на епikuтикуларните

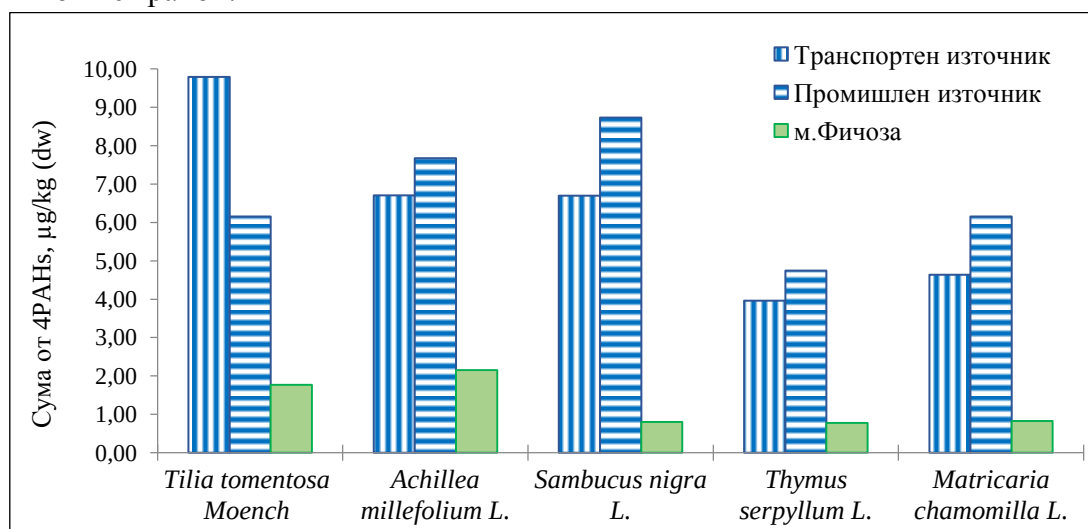


восъци, с които са покрити листата и цветовете на липата, наличието в тях на по-големи количества тритерпеноиди и  $\beta$ -амирин ацетат (доминиращ основен компонент на епikuтикуларните восъци) определят по-добрите адхезионни свойства на восъците и от там по-голямата количество адсорбирани прахови частици от атмосферния въздух, върху които са адсорбирани голяма част от PAHs (Jouraeva et al., 2002; Jouraeva et al., 2006)

Разликата за сумата от 4PAHs за целия период на пробовземане за една и съща билка, събрана от различни райони е най-голяма при *Sambucus nigra* L. Отчетените стойности за билката, събрана от район близо до транспортен източник е 8.06  $\mu\text{g/kg dw}$ , а за екологично чист район е 0.80  $\mu\text{g/kg dw}$ . В билки, събрани от промишлени райони сумата от 4PAHs варира от 10.92  $\mu\text{g/kg dw}$  за *Achillea millefolium* L. (ТЕЦ-Девня) до 2.47  $\mu\text{g/kg dw}$  за *Achillea millefolium* L. (Екарисаж). За целия период на пробовземане сумата от 4PAHs в анализираниите билки от всички райони (екологично чисти, с транспортен източник, промишлени) е под допустимата граница - 50  $\mu\text{g/kg dw}$  (Регламент (ЕО) № 1881/2006 на ЕС).

Резултатите показват, че сумата от 4PAHs в лечебните растения е значително по-висока в проби от райони с интензивен трафик и промишлени райони в сравнение с проби от екологично чист район (местност Фичоза). Потенциални източници на токсични вещества в билките и билковите продукти могат да бъдат условията на отглеждане, околната среда, методът на сушене (FAO, 2009), условията на съхранение и производствените процеси (Chan et al., 2003; Kosalec et al., 2009). По-високото съдържание на замърсители в билките от райони бул. Сливница, ул. Батак и ул. Първа вероятно се дължи на интензивния автомобилен трафик като основен източник на PAHs в тези райони. Причината за високите нива на PAHs от районите до ТЕЦ-Девня, Девня-цимент, Екарисаж, Асфалтова база вероятно се дължат основно на емисиите от промишлените обекти в съответния район, т.к. са отдалечени от автомобилния трафик.

Направено е сравнение на средните стойности на сумата от 4PAHs за целия период на пробовземане (Фигура 17). Средните стойности на сумата от 4PAHs за двете години за всички билки са по-високи в промишлени и райони с транспортен източник отколкото за екологично чист район.



**Фигура 17.** Сравнение на средни стойности на сумата от 4PAHs за целия период на пробовземане по райони

Стойностите на сумата от 4 PAHs за трите вида лечебните растения, събрани в нашето проучване от екологично чист район - местност Фичоза са близки. Сумата от 4PAHs е най-



висока за *Tilia tomentosa* Moench (1.43 µg/kg dw), следвана от стойността за *Thymus serpyllum* L. и *Matricaria chamomilla* L. (съответно 0.82 и 0.86 µg/kg dw). Средната стойност на сумата от 4РАНs за лечебни растения, събрани от всички промишлени и с натоварен трафик райони е най-висока за *Tilia tomentosa* Moench (8.58 µg/kg dw), следвана от стойността за *Matricaria chamomilla* L. (5.40 µg/kg dw) и *Thymus serpyllum* L. (4.35 µg/kg dw). По-високите стойности за сумата от 4РАНs за липа спрямо лайка се потвърждават и в проучване на полски учени. В изследването се посочва, че най-високи стойности на сумата за 4РАНs са установени за липа - средно 213.5 µg/kg, в сравнение с други изследвани билки, включително и лайка - средно 5.6 µg/kg (Ciemniak et al., 2019).

По високите нива на РАНs в липа в сравнение с другите анализирани лечебни растения в нашето проучване се потвърждават и в изследване на Ciecierska. Авторите обясняват по-високите стойности на РАНs в липа с факта, че тя е популярно декоративно дърво, което се отглежда в близост до улиците именно с цел да задържи замърсителите, отделени с горивните газове от автомобилите. За разлика от другите билки, цветовете на липата е по-вероятно да бъдат събрани от райони в близост до интензивен трафик, който е основен източник на РАНs (Ciecierska & Obiedzinski, 2009).

Средни стойности на сумата от 4РАНs в нашето проучване за *Thymus serpyllum* L. и *Matricaria chamomilla* L. (от промишлени и райони с интензивен трафик) са близки (съответно 4.35 и 5.40 µg/kg dw), което съответства на резултатите за мащерка и лайка в изследване на Krajian (съответно 3.44 и 3.99 µg/kg dw). Стойностите за сумата от ВаА, СНR, ВbFA и ВаР в това проучване за лайка и мащерка са по-близките до средни стойности на сумата от 4 РАНs в нашето проучване за съответните билки от промишлени и райони с интензивен трафик, отколкото от екологично чисти райони (Krajian et al., 2013).

Средната стойност на сумата от 4РАНs за всички видове лечебни растения (с изключение на *Tilia tomentosa* Moench) за промишлен район е близка по стойност или по-висока отколкото за билки събрани от район с транспортен източник. Причината за това вероятно е, че в промишлените райони източниците на РАНs (въглища, кокс, петрококс) отделят РАН с по-високо молекулни съединения отколкото тези в районите с транспортен източник (бензин, газьол). Пробите липа от промишлен район и за двете години са взети от района на Асфалтова база, и вероятно е смесен източник. Липата е дървесен вид и вероятно това също определя различната способност да задържа РАНs.

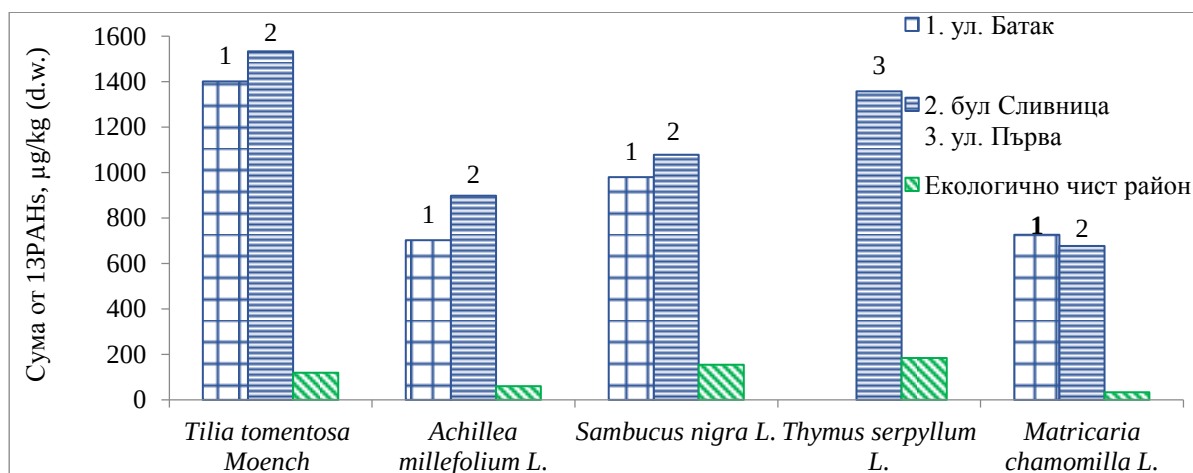
При статистическата обработка на данните се установи, че съществува статистически достоверна разлика между стойността на сумата от 4РАНs в лечебни растения, събрани от райони с транспортен източник и екологично чист район ( $p < 0.05$ ) и в лечебни растения, събрани от райони с промишлен източник и екологично чист район ( $p < 0.05$ ). Средните стойности на сумата от 4РАНs в отделните райони на пробовземане – промишлен и транспортен източник са близки.

### **Сравнение на сумата от 13РАНs в лечебни растения по райони**

На Фигура 18 е представено сравнение на сумата от 13РАНs в лечебни растения от райони с интензивен трафик и екологично чист район за целия период

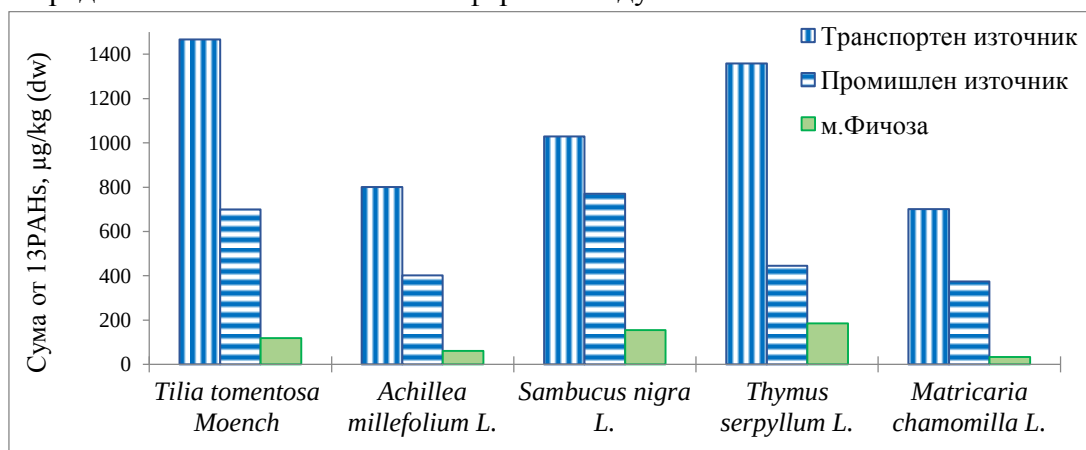
Общите нива на РАНs (като сума от 13РАНs) в лечебни растителни видове от местност Фичоза варират от 20.19 µg/kg dw (*Matricaria chamomilla* L.) до 342.70 µg/kg dw (*Thymus serpyllum* L.). Нашите резултати са по-ниски в сравнение с данните от скорошни проучвания (Ishizaki et al., 2011; Yu et al., 2012). Ishizaki (2011) съобщава общото съдържание на 15 РАНs

(в пет чая и 29 лечебни билки) в диапазона от 6.5 до 1112.1  $\mu\text{g/kg}$ , а Yu (2012) е изследвал 16 PAHs в девет китайски лечебни билки и сумата от 16 PAHs варира от 98.2  $\mu\text{g/kg}$  (семена от касия) до 2245  $\mu\text{g/kg}$  (кора от еукомия) (Ishizaki et al., 2011; Yu et al., 2012).



**Фигура 18.** Сравнение на сумата от 13РАНs в лечебни растения от райони с интензивен трафик и екологично чист район – за целия период

Сумата от 13РАНs в билки, събрани от райони с интензивен трафик е най-висока в *Tilia tomentosa* Moench, събрана до бул. Сливница (1705.8  $\mu\text{g/kg dw}$ ), а най-ниска в *Matricaria chamomilla* L., събрана до ул. Батак (596.26  $\mu\text{g/kg dw}$ ). Установено е, че нивата на 13РАНs са значително по-високи в проби от градска зона в сравнение с проби от района на Фичоза. Резултатите от настоящото изследване показват, че отглеждането и събирането на лечебни растения от райони в близост до пътища с интензивен трафик води до възможен риск от натрупване на високи концентрации на РАНs. На Фигура 19 са представени средните стойности на сумата от 13РАНs за целия период. Средните стойности на сумата от 13РАНs за двете години за всички билки са по-високи в промишлени райони с транспортен източник отколкото за екологично чист район. За всички билки средната стойност на сумата от 13РАНs за целия период е по-висока за райони с транспортен, отколкото за райони с промишлен източник. Причината отново вероятно са различните източници на РАНs в двата района. В районите с транспортен източник при изпаряване и при горивни процеси на бензин и газьол се отделят по-голям процент високо летливи РАНs, отколкото при въглища, кокс и петрококс. При използване на течни горива като бензин и газьол се отделят приоритетно представители на РАНs с по-ниска молекулна маса като фенантрен, флуорен и др., които са основни представители на РАНs в атмосферния въздух.

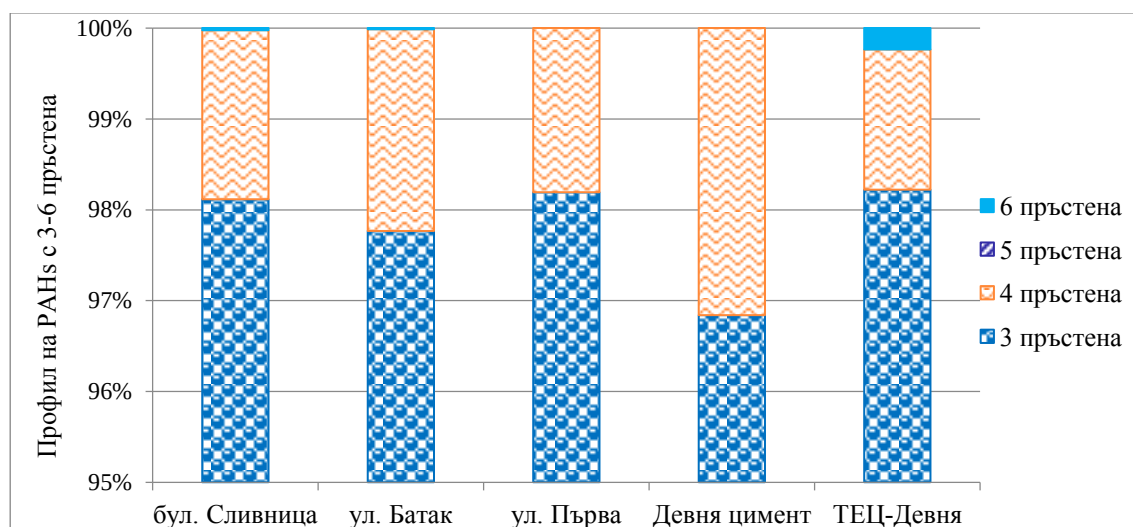


**Фигура 19.** Сравнение на средна стойност на сумата от 13РАНs за целия периода по райони

При статистическата обработка на данните се установи, че съществува статистически достоверна разлика между стойността на сумата от 13РАНs в лечебни растения, събрани от райони с транспортен източник и екологично чист район ( $p < 0.05$ ) както и между в лечебни растения, събрани от райони с промишлен източник и екологично чист район ( $p < 0.05$ ). Средните стойности на сумата от 13РАНs за всички билки са по-високи от промишлени райони и райони с транспортен източник отколкото от екологично чистия район. Статистическият анализ показва, че съществува статистически значима разлика между средната стойност на сумата от 13РАНs в лечебни растения в райони с транспортен и промишлен източник ( $p < 0.05$ ). Средните стойности на сумата от 13РАНs от всички билки, събрани от райони с транспортен източник са по-високи отколкото от райони с промишлен източник.

### ***Профил на разпределение на РАНs в лечебни растения***

Изчислено е процентното съотношение на нискомолекулни РАНs (с 3 и 4 пръстена) и високомолекулни РАНs (с 5 и 6 пръстена) спрямо общото съдържание в изследваните проби билки. За лечебните растения, взети от райони с транспортен източник на замърсяване процентът на РАНs с 3 пръстена е най-висок - от 97.8 до 98.2 %, следван от РАНs с 4 пръстена - от 1.8 до 2.2 % - Фигура 20.



**Фигура 20.** Профил на разпределение на нискомолекулни и високомолекулни РАНs (с 3-6 пръстена) в лечебни растения по райони на вземане на проби

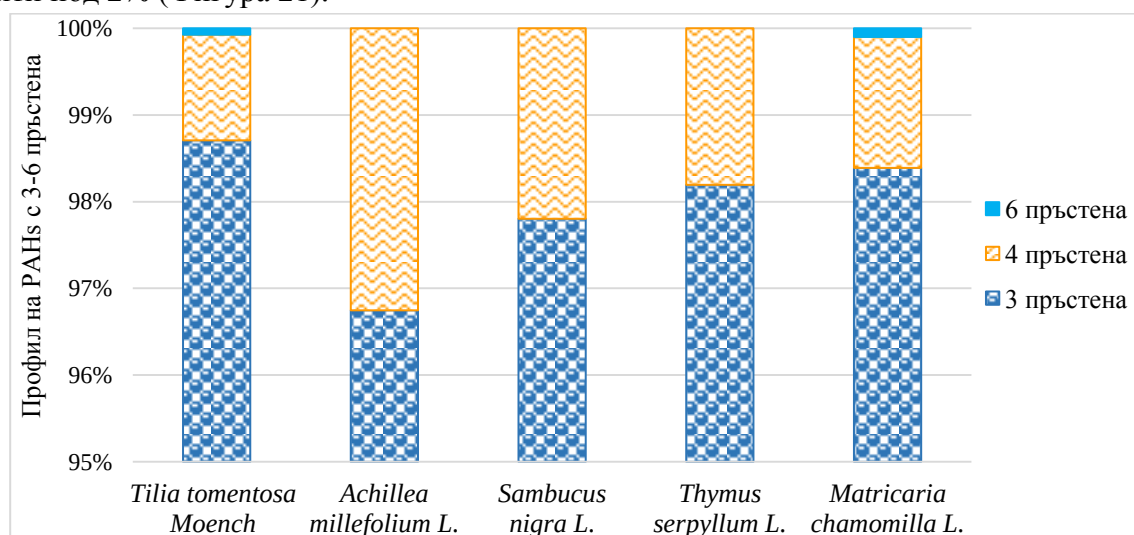
По-високото съдържание на РАНs с 3 пръстена в билките от райони с интензивен трафик вероятно се дължи на отработените газове от бензинови и дизелови двигатели. Според Yan Lv и съавтори в емисиите от изгорелите газове от превозните средства фракцията на РАНs е около 8%, а на РАНs с 4 пръстена е 15% (Yan Lv et al., 2016). Полицикличните въглеводороди с 3 пръстена, съдържащи се в горивата, използвани в автомобилния транспорт са с висок парен натиск и присъстват в атмосферния въздух на градовете. РАНs с 3 пръстена от атмосферния въздух попадат върху повърхността на лечебните растения, събрани в райони с интензивен трафик.

Процентното съдържание на нискомолекулни РАНs с 3 пръстена в билки, събрани от района на Девня цимент е по-нисък (96.8%) отколкото в билки, събрани от райони с транспортен източник. Основното гориво, използвано в Девня цимент е петрококс. През 2018 г. в Девня цимент са използвани въглища като малка част от употребяваното гориво.

Вероятно затова в билките, събрани от района на Девня цимент е установен по-нисък процент на PAHs с 3 пръстена спрямо районите с транспортен източник.

Процентът на PAHs с 3 пръстена в билки, събрани от района на ТЕЦ-Девня (98.3%) е близък до този в лечебни растения, събрани от райони с транспортен източник на замърсяване – Фигура 20. ТЕЦ-Девня използва за производството на електроенергия петрококс и въглища. Приоритетно е използван петрококс, но за разлика от Девня цимент делът на използваните въглища е по-голям (Годишен доклад по околна среда за изпълнение на дейностите през 2018г.(а), Годишен доклад по околна среда за изпълнение на дейностите през 2018г.(в). Yan Lv и съавтори са установили, че съдържанието на нискомолекулни PAHs с 3 пръстена в емисиите при изгаряне на въглища е около 10%, а Lui Ding-chao, че в емисиите при изгаряне на петрококс е между 30% и 50% (Yan Lv et al., 2016; Ding-chao et al., 2018). Вероятна причина за по-високото процентно съдържание на PAHs с 3 пръстена е влиянието на транспортния източник на замърсяване върху нивата на PAHs в билките от район ТЕЦ-Девня, който е в близост до път, с интензивно движение на тежки превозни средства.

Профилът на PAHs с 3-6 пръстена в проби лечебни растения, събрани от райони с интензивен трафик е показан на Фигура 21. PAHs с 3 пръстена (PHE, FL, AN) са преобладаващи при всички лечебни растения и представляват 96.8-98.7% от общото съдържание на PAHs, докато PAHs с 4 пръстени (BaA, CHR, PY) и 6 пръстена (BghiP) са открити под 2% (Фигура 21).



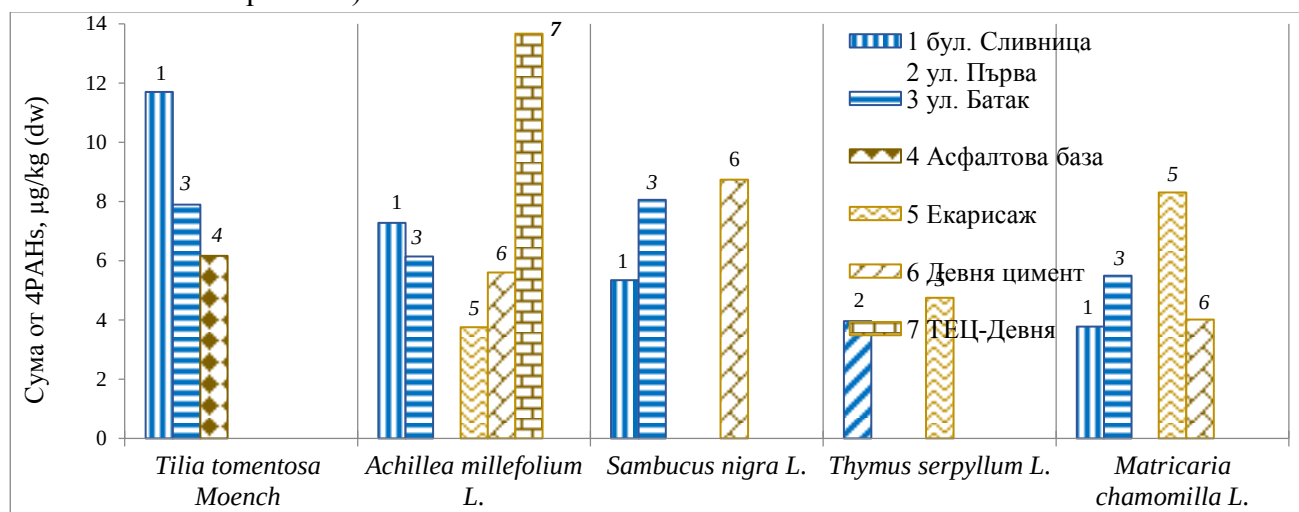
**Фигура 21.** Профил на PAHs с 3-6 пръстена в лечебни растения от райони с интензивен трафик

Yu (2012), Ciemniak (2019) и Lin (2005) съобщават за подобно разпределение на нискомолекулни и високомолекулни съединения от групата на PAHs. PAHs с ниско молекулно тегло (PHE, FL, AN и PY) бяха открити като доминиращи замърсители в лечебни растения, изследвани в тези проучвания (Yu et al., 2012; Ciemniak et al., 2019; Lin et al., 2005).

#### **Сравнение на PAHs в лечебни растения по райони на вземане на проби**

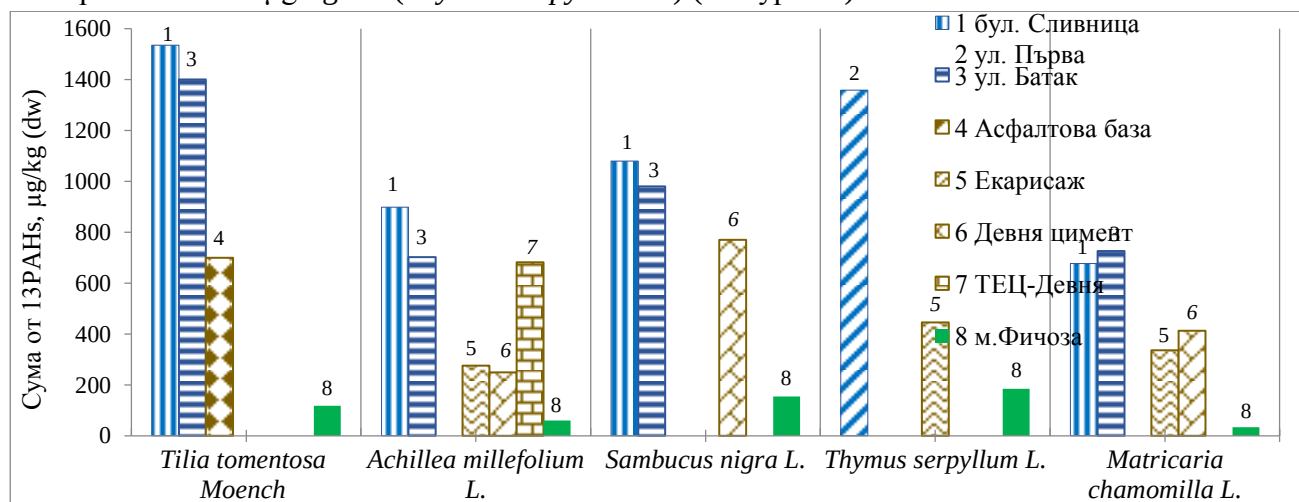
Направено е сравнение на нивата на PAHs в билки, представени като 4PAHs (сума от четирите приоритетни съединения, определени от EFSA 2005) по райони на вземане на проби. Резултатите за средни стойности на 4PAHs за целия период на изследване са представени на Фигура 22. Най-висока стойност на 4PAHs е установена в бял равнец от района на ТЕЦ Девня, което вероятно е повлияно от потенциалния източник на замърсяване.

Някои автори посочват, че изгарянето на въглища допринася в по-голяма степен за замърсяването с бензо(а)пирен (BaP), който е най-токсичният от групата на четирите приоритетни (4РАНs) (Jang et al., 2013). Наблюдават се по-високи стойности на сумата 4РАНs в липа, бял равнец и черен бяз от районите бул. Сливница и ул. Батак (транспортен източник на замърсяване).



**Фигура 22.** Средни стойности на сумата от 4РАНs в 5 вида билки от замърсени райони за целия период на изследване.

На Фигура 23 са представени средните стойности на сумата от 13РАНs в билки по райони за целия период на пробовземане. Най-високата стойност на сумата 13РАНs в билки е по-висока за район с интензивен трафик 1534.3 µg/kg dw (*Tilia tomentosa* Moench) и промишлен район 770.19 µg/kg dw (*Sambucus nigra* L.), отколкото в пробите от екологично чист район 184.38 µg/kg dw (*Thymus serpyllum* L.) (Фигура 23).



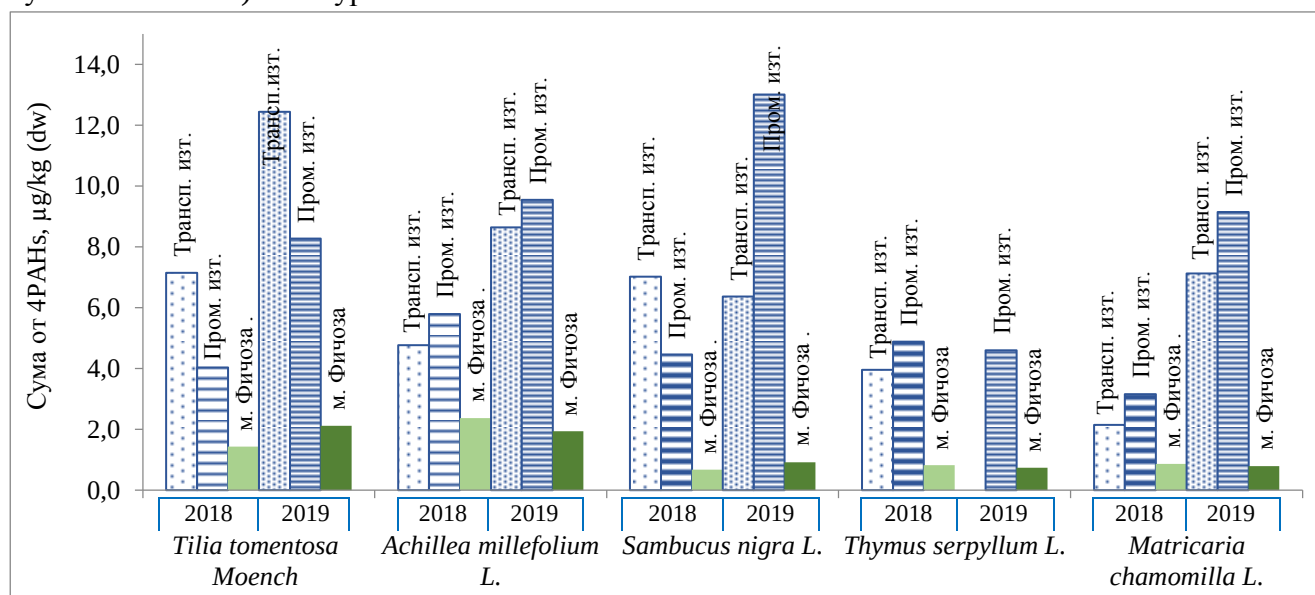
**Фигура 23.** Средни стойности на сумата от 13РАНs в билки по райони за целия период на пробовземане (2018 и 2019 година)

Средна стойност на сумата 13РАНs в билки целия период е по-висока за район с интензивен трафик 1039.6 µg/kg dw и промишлен район 483.79 µg/kg dw, отколкото за екологично чист район 110.35 µg/kg dw. Вероятно това се дължи на разликата в нивата на РАНs в атмосферния въздух в двата района, т.к. тези замърсители се пренасят от атмосферните течения и се адсорбират по повърхността на растенията.

Най-високата стойност на сумата от 13РАНs от всички билки, събрани от райони с интензивен трафик за двете години е определена в *Tilia tomentosa* Moench до бул. Сливница.

Най-високата стойност на сумата от 13РАНs, определената за всички лечебни растения, събрани от промишлени райони е установена в *Sambucus nigra* L. събрана до Девня цимент. По-високата от двете установени за най-високи стойности е определена в проби от района с интензивен трафик (Фигура 23). Средната стойност на 13РАНs за целия период на изследването за билки, събрани от райони с интензивен трафик е по-висока отколкото за лечебни растения, събрани от промишлени райони. Това вероятно се дължи на по-високите концентрации на РАНs в атмосферен въздух в райони с интензивен трафик и кореспондира с проучванията в научната литература и данни от Министерството на околната среда и водите за емисиите на РАНs в България за изследвания период (МОСВ, 2021).

Направено е сравнение на нивата на РАНs в билки по години (като средни стойности на сумата от 4РАНs) - Фигура 24.



**Фигура 24.** Сравнение на сумата от 4РАНs в лечебни растения по години

През двата периода на пробовземане стойностите на 4РАНs са сравнително близки при всеки вид билка (от района на м. Фичоза), което предполага, че това са фонове нива на тези замърсители. Докато стойностите на 4РАНs в лечебни растения от райони с потенциални източници на замърсяване са значително по-високи през втората година (при липа, черен бяз и лайка). Сумата от 4РАНs в пробите от потенциално замърсени райони зависи от натоварването на мощностите на съответния промишлен източник, от интензивността на автомобилния трафик, от метеорологичните условия и от други фактори.

#### **Сравнение на нивата на сума 4РАНs в лечебни растения с други проучвания**

Направено е сравнение на средни стойности на сумата от 4РАН в сушени билки, събрани от местност Фичоза през целия период с данни от други проучвания (Таблица 10). Изчислената сума от 4РАНs във всички анализирани билки в настоящото проучване е по-ниска от определената норма от Европейската комисия - 50 µg/kg (Регламент (ЕО) № 1881/2006 на ЕС). При изследване на РАНs в липа, мащерка и лайка от други автори също се установяват по-ниски от максимално допустимите стойности (Ciecierska & Obiedzinski, 2009; Krajian et al., 2013; Schulz et al., 2014; Holland et al., 2015; Rozentale et al., 2018; Ciemniak et al., 2019) (Таблица 10). В проучване на Muntean всички четири РАНs маркери, изследвани в черен бяз (цвят) са ниски, а сумата им е значително по-ниска от регламентираната норма (Muntean et al., 2017).

**Таблица 10.** Сравнение на средни стойности на сумата от 4РАН в сушени билки, събрани през целия период от местност Фичоза с данни от други проучвания ( $\mu\text{g/kg dw}$ ).

| Държава                                      | Суша билка/<br>билков чай   | Сума от 4РАNs, $\mu\text{g/kg dw}$   |                                      |                                         | Източници                      |
|----------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|
|                                              |                             | <i>Tilia tomentosa</i> Moench (липа) | <i>Thymus serpyllum</i> L. (мащерка) | <i>Matricaria chamomilla</i> L. (лайка) |                                |
| Полша, гр. Варшава                           | сух чай от липа             | 14.81                                | -                                    | -                                       | Ciecierska & Obiedzinski, 2009 |
| гр. Дамаск, Сирия                            | мащерка, лайка              | -                                    | 3.44                                 | 3.99                                    | Krajian et al., 2013           |
| Германия                                     | сух чай лайка, сух чай липа | 12 - 29                              | -                                    | 6.1 - 8.7                               | Schulz et al., 2014            |
| Великобритания                               | сух чай лайка               | -                                    | -                                    | 11.42; 10.97; 9.46; 8.52; 10.58         | Holland et al., 2015           |
| Произход Полша, биопроduct от Китай          | мащерка                     | -                                    | 25.76                                | -                                       | Rozentale et al., 2018         |
| Биопроduct от Китай, предоставен от Германия | мащерка                     | -                                    | 6.88                                 | -                                       | Rozentale et al., 2018         |
| Полша, гр. Шчечин                            | сух чай липа, сух чай лайка | 213.5                                | -                                    | 5.5                                     | Ciemniak et al., 2019          |
| Местност Фичоза                              | билки                       | 1.77                                 | 0.78                                 | 0.83                                    | Настоящо изследване            |

При преглед на нивата на РАNs в липа, лайка мащерка и бъз от други автори са установени стойности на сумата от 4РАNs над допустимата концентрация само в чай от липа, взет от търговски обекти, гр. Шчечин, Полша. Изчислената сума от 4РАNs в пробите е повече от 4 пъти по висока от регламентираната норма (Ciemniak et al., 2019). Средните стойности на сумата от 4РАNs в настоящото изследване за *Tilia tomentosa* Moench ( $1.77 \mu\text{g/kg dw}$ ), *Thymus serpyllum* L. ( $0.78 \mu\text{g/kg dw}$ ) и *Matricaria chamomilla* L. ( $0.83 \mu\text{g/kg dw}$ ), събрани от екологично чист район Фичоза през 2018 и 2019 г. са от 121 до 4.4 пъти по-ниски отколкото в проучвания на други автори. В изследване на Ciemniak и Ciecierska сумата от 4РАNs за липа, взета от търговски обекти в Полша е съответно  $213.5 \mu\text{g/kg}$  (гр. Шчечин) и  $14.81 \mu\text{g/kg}$  (гр. Варшава) (Ciemniak et al., 2019; Ciecierska & Obiedzinski, 2009). Irina Rozentale и съавтори установяват в проби мащерка, с произход Полша и мащерка - биопроduct от Китай стойности на сумата от 4РАNs съответно  $25.76 \mu\text{g/kg}$  и  $6.88 \mu\text{g/kg}$  (Rozentale et al., 2018). Сумата от 4РАNs в мащерка, изследвана в нашето проучване е най-близка до представената от Krajian стойност  $3.44 \mu\text{g/kg}$  (Krajian et al., 2013). В изследване на Holland и Ciemniak сумата от 4РАNs за анализирани проби лайка е съответно  $9.46 \mu\text{g/kg}$  (лайка, предоставена от агенция за събиране на проби Hallmark, Великобритания) и  $5.6 \mu\text{g/kg}$  (лайка, взета от търговската мрежа в гр. Шчечин) и  $3.99 \mu\text{g/kg}$  (лайка, взета от търговски обекти, гр. Дамаск, Сирия) (Holland et al., 2015; Ciemniak et al., 2019; Krajian et al., 2013) (Таблица 10).

Най-високите стойности на сумата от 4РАNs, установени в нашето изследване от всички райони за дадения вид лечебно растение са от 28.5 до 3.3 пъти по-ниски отколкото в проучвания на други автори за съответния вид билка. Най-високата (за всички райони) и средна стойност (за промишлени и райони с интензивен трафик) в нашето проучване на сумата от BaA, CHR, BbFA и BaP е съответно за *Tilia tomentosa* Moench  $11.69$  и  $8.58 \mu\text{g/kg dw}$ , за *Thymus serpyllum* L. е  $4.75$  и  $4.35 \mu\text{g/kg dw}$  и за *Matricaria chamomilla* L. е  $8.30$  и  $5.40 \mu\text{g/kg dw}$ . Резултатите за сумата от 4РАNs в другите проучвания са много по-близки до средните (или до най-високите) за нашето изследване стойности от промишлени и райони с интензивен трафик, отколкото от местност Фичоза.



## ОБОБЩЕНИЕ

### на резултатите за съдържание на ПАХs в лечебни растения

- Проведени са изследвания и са анализирани 13 съединения от групата на ПАХs, включително четирите индикаторни ПАХs, в 43 индивидуални проби лечебни растения, събрани от различни райони на област Варна.
- Доминиращ замърсител от групата на ПАХs е фенантрен, който се среща във всички изследвани проби в лечебни растения и варира от 16.10 до 1239.61  $\mu\text{g/kg dw}$ .
- Профилът на замърсителите от групата на ПАХs показва по високо съдържание на ниско молекулни ПАХs с 2, 3 и 4 кондензирани ядра в сравнение с високомолекулните ПАХs.
- Във всички анализирани лечебни растения не се откриват бензо[а]пирен и бензо[б]флуорантен.
- Средните стойности на сумата от концентрациите на четирите приоритетни 4ПАХs в лечебни растения са в границите от 0.68 до 16.57  $\mu\text{g/kg dw}$  при всички изследвани лечебни растения. Сумата 4ПАХs в проби билки формират от 0.24 % до 1.22 % от общите нива на ПАХs.
- Получените резултати за сумата от четирите приоритетни 4ПАХs са под допустимата стойност 50  $\mu\text{g/kg dw}$  за сухи билки, определена в Регламент (Регламент (ЕС) 2015/1933).
- Получените резултати са обобщени и систематизирани по видове билки и по райони на вземане на проби:

#### По видове билки

- Направеният статистически анализ доказва статистически значима разлика между нивата на ПАХs в изследваните пет вида лечебни растения.
- Най-високо съдържане на сумата от 13ПАХs е определено в липа (*Tilia tomentosa* Moench - 1705.84  $\mu\text{g/kg dw}$ , бул. Сливница), а най-ниска в лайка (*Matricaria chamomilla* L. - 20.19  $\mu\text{g/kg dw}$ , м. Фичоза).
- Сравнението между видовете лечебни растения събрани от екологично чист район показва сравнително по-високи нива на 13ПАХs в мащерка 184.39  $\mu\text{g/kg dw}$ , което вероятно се дължи на по-голяма склонност на този вид да биоаккумулира тези замърсители.



#### *По райони за събиране на проби*

- Установени са статистически значими разлики между нивата на ПАХs в билки от екологично чист район и райони с потенциални източници на замърсяване.
- Сравнението на нивата на 4ПАХs в пробите билки от райони с различни източници на замърсяване показват статистически значими разлики:
  - Средната стойност на сума 4ПАХs от район с транспортен източник е по-висока от средното ниво в билките събрани от район с промишлено замърсяване при лайка, бял равнец, мащерка и черен бъз.
  - Анализът на резултатите показва статистически значими разлики между нивата на ПАХs в лечебни растения събрани от крайградски райони (приети за екологично чисти) и райони с потенциални източници на замърсяване.
- Сравнително разглеждане на получените данни с резултати от проучвания на други автори показва, че нивата на замърсяване лечебни растения от района на Варна са по-ниски или сравними с резултати от проучвания в други европейски страни.

### III.1.2. Съдържание на ПАХs в изсушени билкови чайове и техни водни и етанолови екстракти

Анализирани са общо 10 проби изсушен насипен билков чай и пакетирен чай (тип филтър). Взети са от пет различни вида билков чай по една проба насипен и една проба пакетирен. В приложение към дисертацията са описани подробно опаковките и видовете изсушен билков чай, закупен от различни търговски обекти и аптеки (Приложение №1). Съдържанието на 13 индивидуални съединения ПАХs е определено във всяка проба изсушен билков чай, в приготвени водни и етанолови екстракти.

В анализираните проби изсушени билкови чайове са установени концентрации на фенантрен, антрацен, флуорен, пирен, а само в някои от пробите се откриват бенз[а]антрацен и хризен. От регулираните 4ПАХs, определени от ЕС като маркери за експозиция, само хризен и бенз[а]антрацен са открити в изсушени билкови чайове. Най-висока стойност за хризен, е установена в чай от липа и бъз, съответно 14.12 и 14.97 ng/g dw. По-ниски са концентрациите на бенз[а]антрацен в изсушени билкови чайове и се открива само в липа, бъз и мащерка. Във всички анализирани изсушени билкови чайове не се откриват концентрации на бензо[а]пирен и бензо[б]флуорантен. Сумата от 4ПАХs е най-висока при изсушен чай от липа (20.03 ng/g dw) като за всички анализирани проби е под установеното максимално допустимо ниво – 50 ng/g dw (Регламент (ЕС) 2015/1933).

В Таблица 11 са представени резултати за концентрациите на индивидуални ПАХs в изсушени билкови чайове, ng/g dw; стойности за Сума от 4ПАХs и Сума от 13ПАХs.

**Таблица 11.** Концентрации на ПАХs в изсушени билкови чайове, ng/g dw

| Билка-чай                                    | № на пробата | FL    | PHE    | AN    | PY     | BaA  | CHR   | BbFA | BaP  | Сума от 4ПАХs | Сума от 13ПАХs |
|----------------------------------------------|--------------|-------|--------|-------|--------|------|-------|------|------|---------------|----------------|
| Липа<br><i>Tilia tomentosa</i> Moench        | PR_3_LR      | 26.76 | 186.86 | 37.27 | 125.52 | <LOD | 14.12 | <LOD | <LOD | 14.12         | 390.52         |
|                                              | PR_10_LR     | 9.75  | 80.91  | 5.79  | 37.37  | 6.36 | 13.68 | <LOD | <LOD | 20.03         | 153.86         |
| Бял равнец<br><i>Achillea millefolium</i> L. | PR_5_LR      | 17.92 | 71.52  | 4.97  | 13.89  | <LOD | <LOD  | <LOD | <LOD | <LOD          | 108.30         |
|                                              | PR_9_LR      | 6.44  | 24.07  | 4.15  | 9.13   | <LOD | <LOD  | <LOD | <LOD | <LOD          | 43.80          |
| Бъз<br><i>Sambucus nigra</i> L.              | PR_4_LR      | 20.28 | 104.84 | 5.88  | 33.30  | <LOD | 12.26 | <LOD | <LOD | 12.26         | 176.56         |
|                                              | PR_8_LR      | 6.60  | 37.74  | 2.80  | 24.72  | 4.56 | 14.97 | <LOD | <LOD | 19.53         | 91.39          |
| Мащерка<br><i>Thymus serpyllum</i> L.        | PR_2_LR      | 17.36 | 66.44  | 35.22 | 19.44  | <LOD | <LOD  | <LOD | <LOD | <LOD          | 138.46         |
|                                              | PR_6_LR      | 8.18  | 51.60  | 6.18  | 29.26  | 7.03 | 9.79  | <LOD | <LOD | 16.83         | 112.05         |
| Лайка<br><i>Matricaria chamomilla</i> L.     | PR_1_LR      | 8.62  | 60.65  | 23.78 | 15.44  | <LOD | <LOD  | <LOD | <LOD | <LOD          | 108.48         |
|                                              | PR_7_LR      | 6.14  | 42.39  | 4.26  | 20.91  | <LOD | 3.67  | <LOD | <LOD | 3.67          | 77.37          |

Съдържанието на фенантрен във всички анализирани изсушени билкови чайове е най-високо в сравнение с останалите ПАХs. Сред изследваните видове изсушени чайове най-високи са концентрациите на флуорен, антрацен и пирен в чай от липа, а нивата на хризен са най-високи в липа и бъз. Това би могло да се дължи на съдържанието на восьъчни съединения в цвета на липата и поради липофилните свойства на ПАХs, те се задържат в по-голяма степен. Концентрациите на аценафтилен, бензо[к]флуорантен, бензо[ghi]перилен, дибенз[а,h]антрацен и индено[1,2,3-cd]пирен в изсушени билкови чайове са по-ниски от границата на определяне на метода.

### Резултати за съдържание на PAHs във воден екстракт от изсушен билков чай

От изсушените проби билков чай са приготвени водни екстракти и концентрациите на PAHs са определени в приготвените билкови чайове, за да се оцени степента на преминаване на тези замърсители в готовия чай. Резултатите са представени в Таблица 12.

**Таблица 12.** Концентрации на PAHs във воден екстракт от изсушен билков чай, ng/L, средни стойности и стандартно отклонение

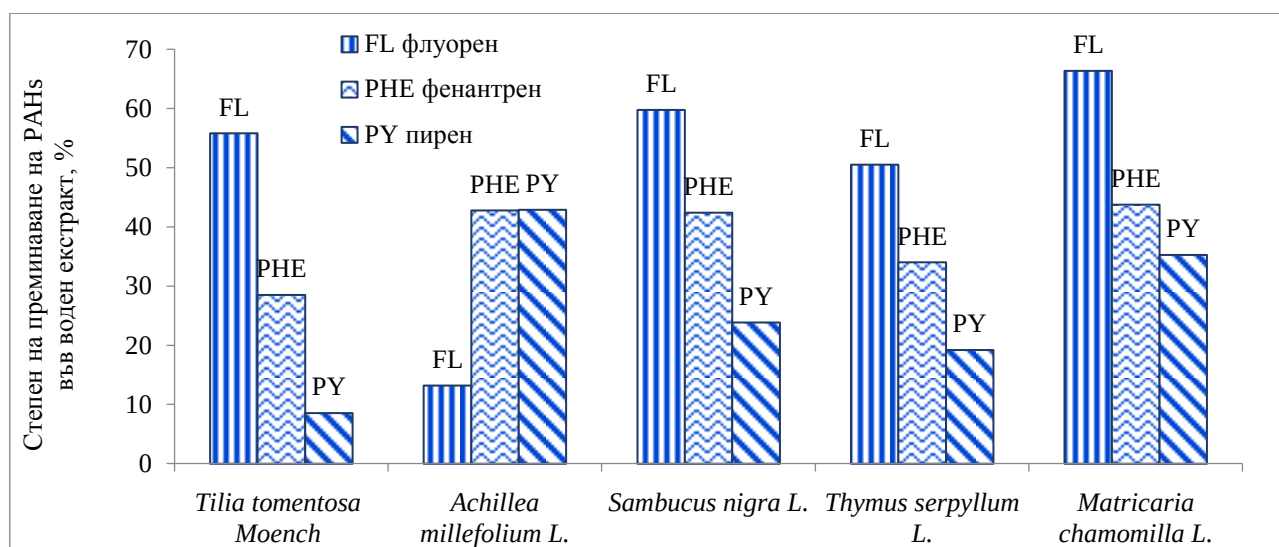
| Билка-чай                       | № на пробата | FL           | PHE          | AN   | PY         | BaA  | CHR        | BbFA | BaP  | Сума от 4PAHs | Сума от 13PAHs |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|------|------------|------|------------|------|------|---------------|----------------|
| Липа                            | PR_3_BI      | 119.3 ± 23.4 | 275.1 ± 64.2 | <LOD | 55.3 ± 4.1 | <LOD | <LOD       | <LOD | <LOD | <LOD          | 449.7          |
| <i>Tilia tomentosa</i> Moench   | PR_19_BI     | 34.9 ± 7.3   | 314.2 ± 42.3 | <LOD | 52.0 ± 3.4 | <LOD | 12.8 ± 0.8 | <LOD | <LOD | 12.8          | 413.9          |
| Бял равнец                      | PR_9_BI      | <LOD         | 227.6 ± 22.3 | <LOD | 47.3 ± 4.4 | <LOD | <LOD       | <LOD | <LOD | <LOD          | 274.9          |
| <i>Achillea millefolium</i> L.  | PR_17_BI     | 25.5 ± 5.9   | 99.2 ± 12.9  | <LOD | 31.5 ± 1.9 | <LOD | <LOD       | <LOD | <LOD | <LOD          | 156.2          |
| Бъз                             | PR_5_BI      | 98.7 ± 11.0  | 276.6 ± 32.2 | <LOD | 61.7 ± 4.9 | <LOD | <LOD       | <LOD | <LOD | <LOD          | 436.9          |
| <i>Sambucus nigra</i> L.        | PR_11_BI     | 26.2 ± 7.5   | 193.2 ± 29.8 | <LOD | 45.8 ± 5.1 | <LOD | 9.8 ± 1.8  | <LOD | <LOD | 9.8           | 275.0          |
| Мащерка                         | PR_1_BI      | 68.3 ± 14.4  | 101.0 ± 13.0 | <LOD | 37.4 ± 8.8 | <LOD | <LOD       | <LOD | <LOD | <LOD          | 206.6          |
| <i>Thymus serpyllum</i> L.      | PR_15_BI     | 34.2 ± 8.3   | 217.5 ± 10.2 | <LOD | 36.9 ± 2.8 | <LOD | <LOD       | <LOD | <LOD | <LOD          | 288.6          |
| Лайка                           | PR_7_BI      | 42.0 ± 7.6   | 80.6 ± 13.4  | <LOD | 56.2 ± 2.6 | <LOD | <LOD       | <LOD | <LOD | <LOD          | 178.8          |
| <i>Matricaria chamomilla</i> L. | PR_13_BI     | 31.0 ± 8.0   | 254.0 ± 13.5 | <LOD | 39.4 ± 3.5 | <LOD | <LOD       | <LOD | <LOD | <LOD          | 324.5          |

Резултатите показват, че във водни екстракти преминават предимно PAHs с по-ниска молекулна маса - флуорен, фенантрен и пирен. За голяма част от водните екстракти най-висока е концентрацията на фенантрен, т.к той преобладава и в изсушени билкови чайове. За повечето анализирани водни екстракти на билкови чайове, степента на преминаване на пирен спрямо флуорен и фенантрен е най-ниска, вероятно поради по-голямата му молекулна маса. В анализираните водни билкови екстракти не се откриват концентрации на антрацен над границата на определяне на метода.

Нивата на хризен във воден извлек на билкови чайове за повечето анализирани проби също са под границата на определяне на метода. Открити са ниски концентрации на хризен във водни екстракти на липа и бъз –  $1.27 \div 1.60$  ng/g dw, като степента на преминаване на хризен от билковите чайове във водните им инфузии е  $8.48 \div 11.71\%$ . Във водни екстракти не се откриват концентрации на бенз[а]антрацен.

Във всички анализирани водни инфузии на билкови чайове не се откриват концентрации на бензо[а]пирен и бензо[б]флуорантен, тъй като не се откриват и в изсушени билкови чайове. Концентрациите на аценафтилен, бензо[к]флуорантен, бензо[ghi]перилен, дибенз[а,h]антрацен и индено[1,2,3-cd]пирен във водни екстракти на билков чай са по-ниски от границата на определяне на метода тъй като не се съдържат в изсушени билкови чайове.

Нивата на флуорен, фенантрен и пирен в изсушен чай от липа (съответно 18.26; 133.89 и 81.45 ng/g dw) са по-високи отколкото в чай от лайка (съответно 7.38; 51.52 и 18.18 ng/g dw). Резултати съответстват на нивата на PAHs, посочени в проучване на Ciemniak et al., 2019. В това изследване представените концентрации на флуорен, фенантрен и пирен в чай от липа са съответно 30.4; 153.7 и 112.8 ng/g dw, а в чай от лайка съответно 21.0; 21.9 и 10.6 ng/g dw. На Фигура 25 са представени резултати за степента на преминаване на индивидуалните PAHs (%) от изсушени билкови чайове във водния екстракт.



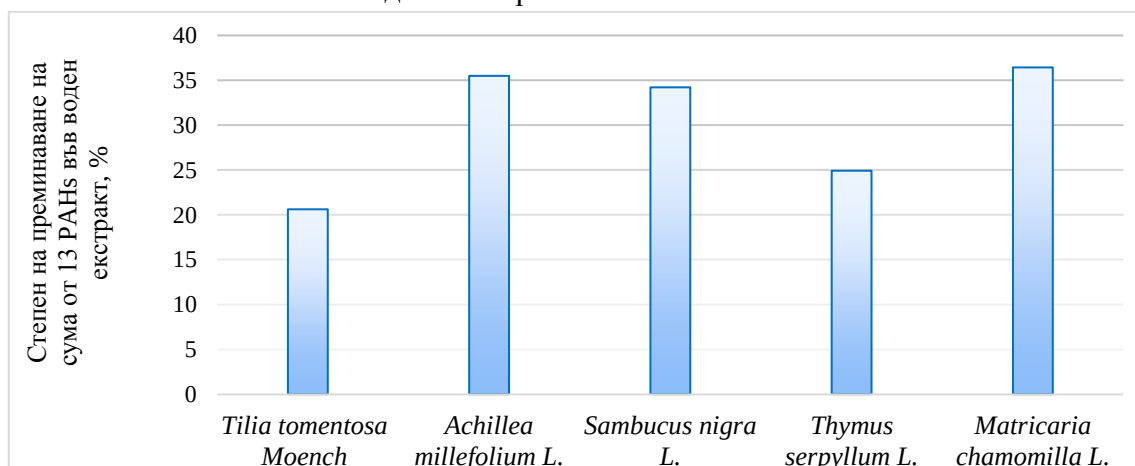
**Фигура 25.** Степен на преминаване (%) на PAHs от изсушени билкови чайове във водния екстракт

Въпреки по-високите нива на флуорен, фенантрен и пирен в чай от липа, степента им на преминаване във воден екстракт от чай от липа е по-ниска отколкото от чай от лайка (Фигура 25). Подобна връзка между нивата на PAHs в изсушен чай от липа и лайка и степента на преминаване на PAHs в техни водни инфузии е представена и от учени от Полша. Те представят също, че степента на преминаване на флуорен, фенантрен и пирен във воден екстракт от чай от липа (съответно 13.6%; 57.7% и 11.3%) е по-нисък отколкото от чай от лайка (съответно 14.9%; 81.3% и 27.2%) (Ciemniak et al., 2019).

Степента на преминаване на фенантрен във водните екстракти е приблизително равна при всички видове чайове. Степента на преминаване на пирен във воден екстракт от изсушен чай от липа е най-ниска от всички видове чайове.

Във всички видове водни екстракти степента на преминаване на флуорен (50.5÷66.4%) е по-висок отколкото на фенантрен (28.5÷43.8%), вероятно поради по-малката му молекулна маса, което е свързано с относително по-голяма разтворимост във вода. Пирен се характеризира с най-ниска степента на преминаване от изсушен чай във воден екстракт (8.6÷35.3%) при всички изследвани билкови чайове с изключение на бял равнец.

На Фигура 26 са представени степените на преминаване на сумата от 13PAHs от изсушени билкови чайове във водния екстракт.



**Фигура 26.** Сравнение на средната Степен на преминаване (%) на сумата от 13PAHs от изсушени билкови чайове във водния екстракт

Степента на преминаване на сумата от всички анализирани 13РАНs във водните екстракти при бял равнец, черен бъз и лайка е приблизително еднаква. Докато при липа и мащерка степента на преминаване на Сумата от 13РАНs от изсушените билки във водните екстракти е по-ниска.

### Резултати от изследване на РАНs в етанолови екстракти от изсушени билки

Приготвени са екстракти на изсушени билки в 70% етанол с цел да се оцени степента на преминаване на РАНs от изсушените билки. В Таблица 13 са представени концентрациите на РАНs в етанолов екстракт от билкови чайове.

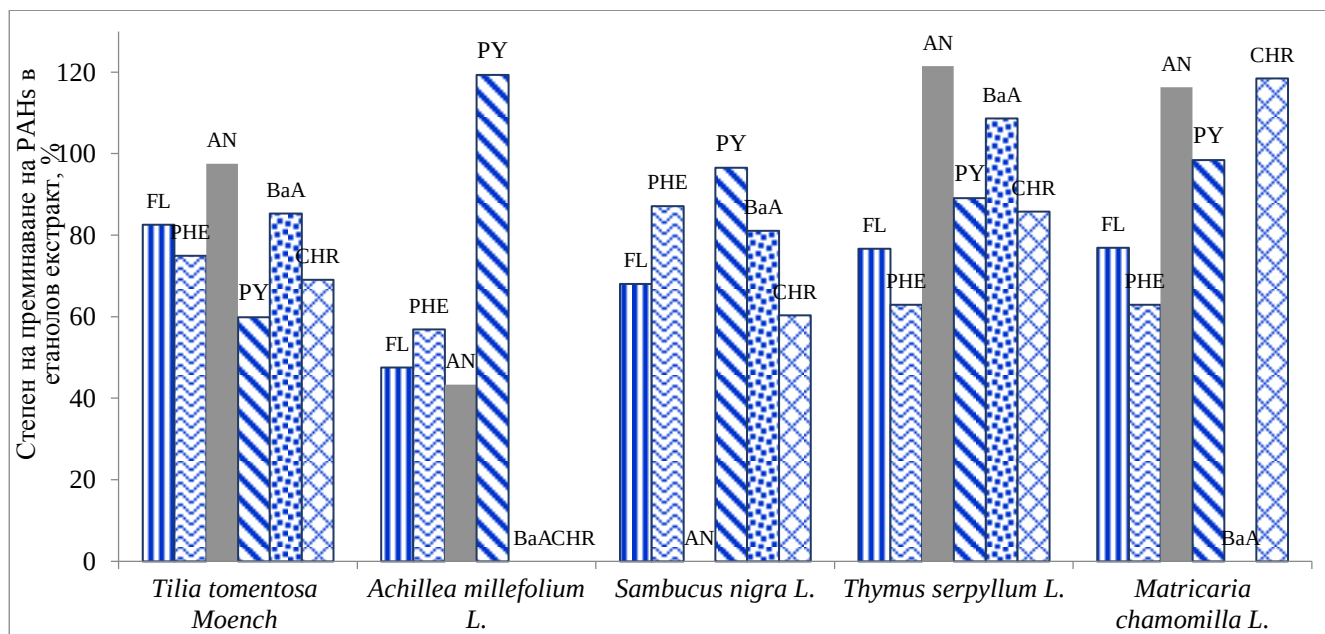
Подобно на концентрациите в изсушени билкови чайове и водните екстракти, фенантрен преобладава и в етаноловите екстракти. Най-високи концентрации в етанолови екстракти за флуорен, пирен и хризен са установени в пробите липа. Това вероятно се дължи на високото им съдържание в изсушения чай от липа. Във всички анализирани етанолови екстракти не се откриват концентрации на бензо[а]пирен и бензо[б]флуорантен. Концентрации на бенз[а]антрацен са установени в етанолов екстракт от липа, бъз и мащерка, за разлика от водните екстракти, в които не се открива при нито една от изследваните

**Таблица 13.** Концентрация на РАНs в етанолов екстракт от билкови чайове, ng/g dw

| Билка-чай                                    | № на пробата | FL    | PHE    | AN    | PY    | BaA  | CHR   | BbFA | BaP  | Сума от 4РАНs | Сума от 13РАНs |
|----------------------------------------------|--------------|-------|--------|-------|-------|------|-------|------|------|---------------|----------------|
| Липа<br><i>Tilia tomentosa</i> Moench        | PR_4_BI      | 21.59 | 126.01 | 36.48 | 65.49 | <LOD | 4.75  | <LOD | <LOD | 4.75          | 254.32         |
|                                              | PR_20_BI     | 8.56  | 74.86  | 5.52  | 32.07 | 5.43 | 14.45 | <LOD | <LOD | 19.88         | 140.89         |
| Бял равнец<br><i>Achillea millefolium</i> L. | PR_10_BI     | 7.10  | 27.30  | <LOD  | 16.67 | <LOD | <LOD  | <LOD | <LOD | <LOD          | 51.07          |
|                                              | PR_18_BI     | 4.49  | 27.09  | 3.95  | 10.81 | <LOD | <LOD  | <LOD | <LOD | <LOD          | 46.34          |
| Бъз<br><i>Sambucus nigra</i> L.              | PR_6_BI      | 14.72 | 90.14  | <LOD  | 29.62 | <LOD | 4.63  | <LOD | <LOD | 4.63          | 139.12         |
|                                              | PR_16_BI     | 3.58  | 34.18  | <LOD  | 26.43 | 3.70 | 11.80 | <LOD | <LOD | 15.51         | 79.69          |
| Мащерка<br><i>Thymus serpyllum</i> L.        | PR_2_BI      | 15.05 | 46.58  | 43.78 | 14.61 | <LOD | <LOD  | <LOD | <LOD | <LOD          | 120.03         |
|                                              | PR_12_BI     | 4.54  | 27.74  | 6.52  | 28.78 | 7.64 | 8.40  | <LOD | <LOD | 16.03         | 83.61          |
| Лайка<br><i>Matricaria chamomilla</i> L.     | PR_8_BI      | 6.26  | 29.34  | 28.28 | 15.57 | <LOD | <LOD  | <LOD | <LOD | <LOD          | 79.45          |
|                                              | PR_14_BI     | 5.10  | 35.51  | 4.33  | 20.23 | <LOD | 4.35  | <LOD | <LOD | 4.35          | 69.51          |

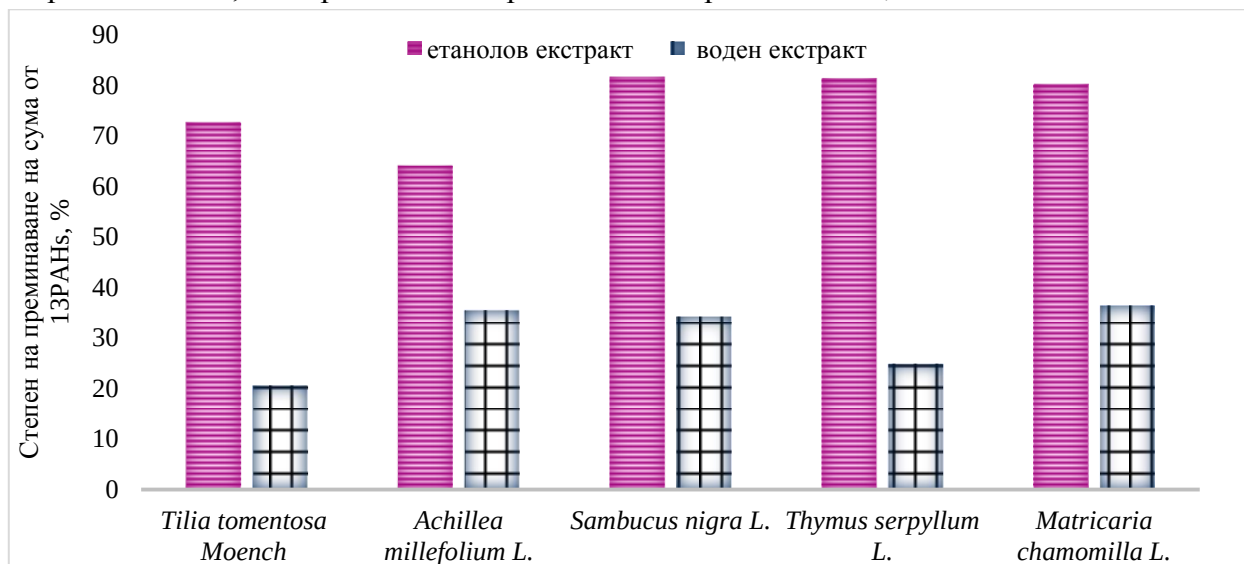
В 60% от етаноловите екстракти на анализираните проби се установяват нива на хризен, за разлика от водните екстракти, при които хризен е открит само при липа и бъз. Това вероятно се дължи на по-голямата му молекулна маса и относително по-ниска степен на преминаване във воден разтвор. Най-висока е концентрацията на хризен в етанолов екстракт на липа, в сравнение с другите изследвани билкови екстракти.

На Фигура 27 са представени степените на преминаване на РАНs от изсушени билки в етанолов екстракт.



**Фигура 27.** Степен на преминаване (%) на PAHs от изсушени билки в етанолов екстракт

Във всички анализирани етанолови екстракти на изсушени билки не се откриват концентрации на бензо[а]пирен и бензо[б]флуорантен, тъй като не се откриват и в изсушените билки, вероятно поради относително високите им молекулни маси. Нивата на аценафтилен, бензо[к]флуорантен, бензо[ghi]перилен, дибенз[а,h]антрацен и индено[1,2,3-cd]пирен в етаноловите екстракти са под LOD, подобно на концентрациите на тези замърсители в изсушените билки и водните екстракти. Степента на преминаване на сума от 13PAHs е по-висока в етаноловите екстракти в сравнение с нивата във воден екстракт на съответната билка – Фигура 28. Степента на преминаване за Сума от 13PAHs в етанолов екстракт на лайка, мащерка и бъз са приблизително равни: 80.2%, 81.3% и 81.7%.



**Фигура 28.** Сравнение на средни стойности на степента на преминаване на сума от 13PAHs от изсушени билки и билкови чайове във водни и етанолови екстракти

## ОБОБЩЕНИЕ

на резултатите за съдържание на PAHs в изсушени билкови чайове, водни и етанолови екстракти

- Най-висока средна стойност на сумата от 4PAHs в изсушени билкови чайове, техни водни и етанолови екстракти са определени за липа, съответно – 17.08, 0.80 и 12.32 ng/g dw. Сумата за 4PAHs в изсушените лечебни растения е по-ниска от максимално допустимата концентрация, определена от Европейската комисия 50 ng/g dw.
- Бензо[а]пиренът, който има най-висока токсичност от изследваните PAHs не се открива в изсушените билкови чайове, както и в техните водни и етанолови екстракти.
- Степента на преминаване на сумата от всички анализирани 13PAHs във водните екстракти при бял равнец, черен бъз и лайка е приблизително еднаква.
- Степента на преминаване на сума от 13PAHs е по-висока в етаноловите екстракти в сравнение с нивата във воден екстракт на съответната билка.
- Най-висока средна стойност на сумата от 13PAHs в изсушен билков чай, воден и етанолов екстракт са определени за чай от липа, съответно - 272.19, 56.12 и 197.61 ng/g dw.

### **III.1.3. Оценка на безопасност свързана със замърсяването на лечебните растения с PAHs**

Лечебните растения или екстракти от тях се влагат в състава на много хранителни добавки, фармацевтични препарати и козметични средства. В сушено състояние те се използват за директно приготвяне на чайове, отвари и тинктури за перорално приложение или като компреси за външна употреба в дерматологията. Много растителни видове като мащерка, мента, босилек и др. се използват като подправки в кулинарията.

Хроничното въздействие на PAHs върху човешкото здраве оказва негативно влияние върху имунната система, уврежда бъбреците и черния дроб, причинява проблеми с дишането (IARC, 2019). Дългосрочна експозиция на хората на PAHs предизвиква катаракти, увреждане на бъбреците, черния дроб и жлъчката. Бенз[а]антрацен, хризен, бензо[б]флуорантен и бензо[а]пирен са сред приоритетните замърсители, регулирани от Европейския орган за безопасност на храните. Те са определени от EFSA за биомаркери за оценка на безопасността на храните по отношение на PAHs. За останалите PAHs не са определени норми в Европейските регламенти. Международната агенция за изследване на рака (IARC) класифицира бензо[а]пирен в група 1 като карциногенен за хора, но също така класифицира бензо[а]антрацен, бензо[б]флуорантен и хризен в група 2B - с възможни карциногенни свойства за хора (IARC, 2019).

Важно е да бъде определено каква част от съдържащите се PAHs в лечебните растения могат да попаднат в организма на човека при консумация на билков чай и прием на хранителни добавки. За тази цел са прегледани нормативни документи и научна литература, свързани с методите, регламентите и нормите при определяне на оценка на безопасност на лечебните растения, използвани за хранителни добавки и фармацевтични продукти.

В настоящото изследване оценката на хранителната експозиция е направена въз основа на получените резултати за концентрации на PAHs в лечебните растения и потенциалният им прием чрез консумация на приготвен билков чай или чрез хранителни добавки на билкова основа.

#### **Оценка на потенциалната експозиция на полициклични ароматни въглеводороди (PAHs) при консумация на билкови чайове**

В настоящата работа бяха изследвани водни екстракти от изсушени билки и изсушен билков чай под формата на малки пакетчета като са определени концентрациите на PAHs чрез GC-MS метод. Резултатите са представени в Раздел III.1.1.

За оценка на потенциалната експозиция при консумация на билкови чайове са изчислени Дневен прием (DI) и коефициент на опасност HQ като са използвани средните концентрации за нивата на PAHs във воден екстракт от изсушени билкови чайове – Таблица 14. При изчисляване на DI приехме, че човек консумира средно дневно 1 чаша (250 mL) билков чай, приготвен от 2 g суха билка.

Дневният прием (DI) се изчислява по формулата (US EPA, 1989):

$$DI = \frac{C \cdot \text{Intake}}{BW}$$

където



DI е дневен прием на индивидуалните PAHs (ng/kg bw дневно),

C е концентрацията на индивидуалните PAHs във воден екстракт от билкови чайове, ng/L

Intake – дневна доза при прием на 1 чаша билков чай (L/дневно).

BW е средното телесно тегло на възрастен индивид (kg bw, при средното телесно тегло 70 kg).

Средните концентрации на PAHs във воден екстракт от изсушени билкови чайове са представени в Таблица 14.

**Таблица 14.** Средни концентрации на индивидуални PAHs във воден екстракт от изсушени билкови чайове, ng/L

| Воден екстракт | аценафтилен | флуорен | фенантрен | антрацен | пирен | хризен |
|----------------|-------------|---------|-----------|----------|-------|--------|
| Липа           | <LOD        | 77.1    | 294.6     | <LOD     | 53.65 | <LOD   |
| Бял равнец     | <LOD        | 13.1    | 163.4     | <LOD     | 39.4  | <LOD   |
| Черен бъз      | <LOD        | 62.5    | 239.4     | <LOD     | 53.7  | <LOD   |
| Мащерка        | <LOD        | 51.2    | 159.2     | <LOD     | 37.1  | <LOD   |
| Лайка          | <LOD        | 36.5    | 167.3     | <LOD     | 47.8  | <LOD   |

Легенда: LOD – Граница на откриване на метода

#### **Оценка на безопасността по отношение на индивидуални неканцерогенни PAHs**

Оценка на безопасността по отношение на индивидуални неканцерогенни PAHs е направена чрез изчисляване на коефициент на опасност (HQ). Флуорен, антрацен и пирен нямат доказани канцерогенни или възможни канцерогенни свойства и затова няма определени норми в европейското законодателство (нерегулирани PAHs). Американската агенция за опазване на околната среда (US EPA) е определила референтни дози за хронична орална експозиция (RfD) въз основа на неканцерогенен потенциал за антрацен, флуорен и пирен (Bulder et al., 2006; US-EPA, IRIS, 1990a; US-EPA, IRIS, 1990b).

Коефициентът на опасност HQ на флуорен и пирен е изчислен като е използван дневният прием за индивидуалните PAHs и референтна им доза за хронична орална експозиция (RfD) (US EPA, 1989; US EPA, 2005):

$$HQ = \frac{DI}{RfD}$$

където

DI - дневен прием на индивидуалните PAH (ng/kg bw дневно)

RfD - референтна доза за хронична орална експозиция (ng/kg bw за ден).

Според US EPA референтната доза (RfD) е оценка на ежедневната експозиция на хората на дадена потенциална опасност, която вероятно е без риск от вредни ефекти през целия живот. При коефициент на опасност, по-малък или равен на единица, рискът може да се счита за незначителен и няма вероятност да се появят неблагоприятни здравословни ефекти (US EPA, 1989).

Резултатите за Дневен прием и Коефициента на опасност при прием на билкови чайове са представени в Таблица 15. Най-високи стойности на DI за флуорен са изчислени при прием на чай от липа. Във всички билкови чайове фенантренът е преобладаващо съединение,

но Американската агенция по околна среда (US-EPA) не е определила RfD поради недостатъчни данни за неговата токсичност. Най-висока стойност за DI за пирен са изчислени при прием на чай от черен бъз и липа. Изчисленият дневен прием за флуорен и пирен във всички билкови чайове е много по-нисък от съответната Референтната доза. Изчислените коефициенти на опасност за флуорен и пирен са много по-ниски от единица, което предполага, че експозицията при прием на билкови чайове не представлява риск за здравето на хората.

Най-високи стойности на DI за флуорен са изчислени при консумация на чай от липа. Във всички билкови чайове фенантренът е преобладаващо съединение. Определените концентрации за антрацен са под границата на откриване на метода, а за пирен най-високи стойности за DI са изчислени при прием на чай от Черен бъз. Изчисленият дневен прием за флуорен и пирен във всички билкови чайове е много по-нисък от съответната Референтната доза.

**Таблица 15.** Дневен прием (DI, ng/kg bw дневно) и коефициент на опасност HQ за индивидуалните нискомолекулни PAHs във воден екстракт от билкови чайове

| Воден екстракт<br>от изсушен билков чай  | Дневен прием DI, ng/kg bw дневно |           |                   |
|------------------------------------------|----------------------------------|-----------|-------------------|
|                                          | флуорен                          | фенантрен | пирен             |
| Липа                                     | 0.275                            | 1.052     | 0.192             |
| HQ                                       | 0.0000069                        |           | 0.0000064         |
| Бял равнец                               | 0.047                            | 0.584     | 0.141             |
| HQ                                       | 0.0000012                        |           | 0.0000047         |
| Черен бъз                                | 0.223                            | 0.855     | 0.192             |
| HQ                                       | 0.0000056                        |           | 0.0000064         |
| Мащерка                                  | 0.183                            | 0.569     | 0.133             |
| HQ                                       | 0.0000046                        |           | 0.0000044         |
| Лайка                                    | 0.130                            | 0.598     | 0.171             |
| HQ                                       | 0.0000033                        |           | 0.0000057         |
| Reference Dose (RfD),<br>ng/kg bw дневно | 40 000                           | -         | 30 000            |
|                                          | US EPA IRIS,1990b                |           | US EPA IRIS,1990a |

Най високата стойност на HQ за флуорен е изчислена при прием на чай от липа (0.0000069), а за пирен при чай от черен бъз (0.0000056). Изчислените коефициенти на опасност за флуорен и пирен са много по-ниски от единица, което предполага, че експозицията при консумация на билкови чайове не би представлявала значим неканцерогенен риск.

### Оценка на потенциалната експозиция на полициклични ароматни въглеводороди (PAHs) чрез прием на хранителни добавки, съдържащи лечебни растения

Определянето на PAHs в хранителните добавки, които съдържат лечебни растения е трудно поради високото съдържание на пречещи вещества като алкалоиди, захари, органични киселини и пигменти. Разработен е Теоретичен модел за оценка на потенциалната експозиция чрез прием на хранителни добавки със съдържание на медицински растения на

базата на получените резултати за полициклични ароматни въглеводороди (PAHs) в сухи билки. Теоретичният подход предоставя възможност за оценка на безопасността на хранителните добавки въз основа на данни за PAHs в използваните билки, без да се извършват скъпо струващи химически анализи.

Подходът включва:

- Определяне на потенциалната експозиция на PAHs чрез изчисляване на Дневен прием (експозиция, DI) на базата на препоръчаната дневна доза от производителите на хранителни добавки.
- Оценка на безопасността по отношение на индивидуални неканцерогенни PAHs чрез Изчисляване на коефициент на опасност (HQ).
- Оценка на потенциалната експозиция на карциногенни и генотоксични съединения чрез Граница на експозиция (MOE).

#### ***Оценка на потенциалната експозиция на PAHs***

Потенциалната експозиция е определена чрез Дневен прием (DI), който е изчислен на базата на средните концентрации на индивидуалните PAHs в лечебните растения (или сумата от 4PAHs) и препоръчаната от производителя дневна доза за прием на хранителни добавки. За изчисляване на Дневен прием беше използвана препоръчаната от производителя дневна доза като са проучени листовките към девет вида хранителни добавки, които съдържат лечебни растения (капсули и тинктури). Дневният прием беше изчислен, като се използва еквивалентното съдържание на лечебно растение във всяка таблетка, капсула или тинктура от хранителната добавка и препоръчителната дневна доза (предоставена от производителя) - Приложение №3.

Дневният прием на индивидуалните PAH или за сумата от 4 регулирани PAHs (DI, ng/kg bw на ден) е изчислен по уравнението (US EPA, 1989):

$$DI = \frac{C \cdot \text{Intake}}{BW}$$

където: C - концентрация на индивидуалните PAH (или сумата от 4 регулирани PAHs) в лечебното растение (ng/g), BW - средно телесно тегло (kg bw, при средно телесно тегло 70 kg).

Intake – еквивалентно количество лечебно растение в дневната доза хранителна добавка, препоръчана от производителя, изразена като маса на съответната билка за ден (g/дневно) - Приложение №3.

Резултатите от изчисления дневен прием за флуорен, фенантрен, антрацен и пирен са представени в Таблица 16. Най-високи стойности на DI са изчислени за флуорен при прием на хранителни добавки – капсули от липа (DI = 3.474) и таблетки от бял равнец (DI = 3.934). Дневният прием за антрацен е най-висок при таблетки от бял равнец. Изчисленият дневен прием за всички хранителни добавки е много по-нисък от Референтната доза.

**Таблица 16** - Дневен прием (DI, ng/kg bw дневно) и коефициент на опасност (HQ) за хранителни добавки, съдържащи билки

| Хранителни добавки                        | Дневна доза*,<br>g/дневно | Дневен прием (DI), ng/kg bw дневно |              |                   |                   |
|-------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|
|                                           |                           | FL                                 | PHE          | AN                | PY                |
|                                           |                           | флуорен                            | фенантрен    | антрацен          | пирен             |
| Лайка тинктура                            | 0.600                     | 0.713                              | 1.797        | 0.018             | 0.031             |
| Лайка капсули                             | 1.000                     | 1.188                              | 2.995        | 0.030             | 0.051             |
| <b>средна стойност</b>                    |                           | <b>0.951</b>                       | <b>2.396</b> | <b>0.024</b>      | <b>0.041</b>      |
| HQ                                        |                           | 0.0000238                          | -            | 0.0000001         | 0.0000014         |
| Мащерка тинктура                          | 0.750                     | 2.132                              | 6.447        | 0.397             | 0.110             |
| HQ                                        |                           | 0.0000533                          | -            | 0.0000013         | 0.0000037         |
| Черен бъз капсули 1, 2                    | 0.460                     | 1.107                              | 3.155        | 0.283             | 0.065             |
| HQ                                        |                           | 0.0000277                          | -            | 0.0000009         | 0.0000022         |
| Бял равнец таблетки                       | 1.950                     | 3.934                              | 13.164       | 1.174             | 0.525             |
| Бял равнец тинктура                       | 0.750                     | 1.513                              | 5.063        | 0.452             | 0.202             |
| <b>средна стойност</b>                    |                           | <b>2.723</b>                       | <b>9.114</b> | <b>0.813</b>      | <b>0.363</b>      |
| HQ                                        |                           | 0.0000681                          | -            | 0.0000027         | 0.0000121         |
| Липа капсули 1                            | 0.700                     | 2.338                              | 6.198        | 0.324             | 0.070             |
| Липа капсули 2                            | 1.380                     | 4.610                              | 12.219       | 0.638             | 0.138             |
| <b>средна стойност</b>                    |                           | <b>3.474</b>                       | <b>9.209</b> | <b>0.481</b>      | <b>0.104</b>      |
| HQ                                        |                           | 0.0000869                          | -            | 0.0000016         | 0.0000035         |
| Референтна доза (RfD),<br>ng/kg bw за ден |                           | 40 000                             | -            | 300 000           | 30 000            |
|                                           |                           | US EPA IRIS,1990b                  |              | US EPA IRIS,1990a | US EPA IRIS,1990a |

\*- еквивалентно количество от лечебно растение, което се съдържа в дневната доза от хранителната добавка (препоръчана от производителя)

### Оценка на безопасността на хранителни добавки

Изчислен е коефициент на опасност (HQ), за да се оцени безопасността на хранителните добавки по отношение на индивидуални неканцерогенни PAHs. Резултатите от изчисленият коефициент на опасност показват, че най-висока стойност на HQ за антрацен и пирен е установена при добавки със съдържание на бял равнец (0.0000027 и 0.0000121, съответно). Най-висока стойност на HQ за флуорен беше изчислена за хранителна добавка със съдържание на липа (0.0000869), но тя е много по-ниска от единица, което предполага, че потенциалната експозиция при прием на добавки не би представлявала риск за здравето. Резултатите от настоящото изследване показват, че установените концентрации на флуорен, антрацен и пирен в лечебните растения са толкова ниски, че за да се превиши референтната доза трябва да се приемат повече от 30 000 капсули дневно.

### Оценка на Границите на експозиция (MOE) на канцерогенни и генотоксични PAHs

Оценката на експозиция на PAHs, с изразени генотоксични и канцерогенни свойства, се прави чрез изчисляване на Граница на експозиция (margin of exposure, MOE) по предложение на Научния комитет на Европейски орган по безопасност на храните (EFSA) (EFSA, 2005). Границата на експозиция е отношение на Долната граница на референтната доза (BMDL<sub>10</sub>)

към дневния прием на сумата от 4РАНs за даден вид хранителна добавка и е изчислена както следва (EFSA, 2005):

$$MOE_{4РАНs} = \frac{BMDL_{10}}{DI_{4РАНs}}$$

където:

$MOE_{4РАНs}$  е Граница на експозиция за сумата от 4 РАНs

$BMDL_{10}$  – е Референтна доза с по-малка от 10% граница на доверие (340 000 ng/kg bw дневно определена от EFSA, 2005)

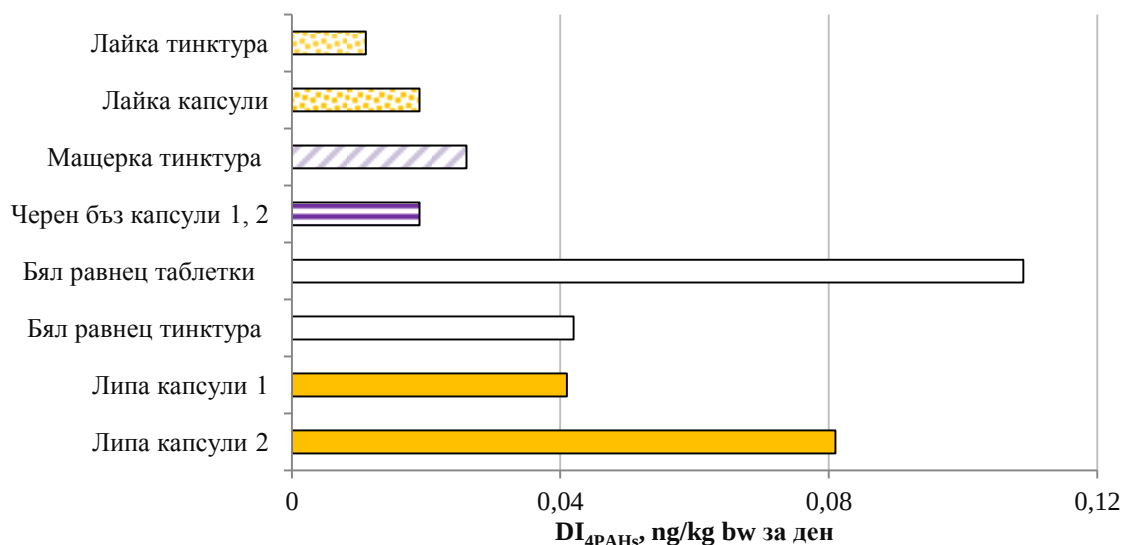
$DI_{4РАНs}$  е сумата от дневния прием за 4 РАНs (ng/kg bw дневно).

Граници на експозиция (MOEs) са изчислени за сумата от четирите регулирани РАНs като се използва Референтна доза с по-малка от 10% граница на доверие ( $BMDL_{10}$ ).  $BMDL_{10}$  е долната граница на 95% доверителен интервал на референтната доза, съответстваща на 10% туморна честота, избрана като референтна точка в кривата доза-отговор (EFSA, 2005).

Стойността на  $BMDL_{10}$  е определена от анализа на отношението доза - отговор за различните видове тумори, причинени от съответното въздействие на замърсителите. Culp и съавтори са определили при различни модели на анализ, че  $BMDL_{10}$  за сумата от 4РАН варират от 340 000 ng/kg bw за ден до 930000 ng/kg bw за ден. Тези стойности са определени въз основа на общия брой животни, при които въздействието е причинило образуване на тумори. При изчисляване на  $MOE$  относно замърсителите в хранителната верига EFSA препоръчва да се използва за  $BMDL_{10}$  за сумата от 4-те РАН - стойност 340 000 ng/kg bw за ден (EFSA, 2008).

Според Научния комитет на EFSA, Scientific Committee on Food (SCF) при стойности на  $MOE$  от 10 000 или по-високи може да се даде оценка, че няма потенциален риск за човешкото здраве (EFSA, 2005).

Потенциалната експозиция на хора по отношение на канцерогенни и генотоксични РАНs е оценена чрез дневен прием ( $DI_{4РАНs}$ ) на хранителни добавки и граница на експозиция ( $MOE_{4РАНs}$ ) за сумата от 4 РАНs. Резултатите са представени на Фигура 29 и обобщени в Таблица 17.



**Фигура 29.** Дневен прием за сума от 4РАНs в хранителни добавки, със съдържание на билки

DI<sub>4РАНs</sub> са изчислени в диапазона от 0.011 до 0.109 ng/kg bw на ден (съответно за добавки от лайка и бял равнец). В липа е установена по-висока, но близка стойност за сумата от 4РАНs спрямо тази за бял равнец. Изчислените стойности за Дневния прием (DI<sub>4РАНs</sub>) за таблетки с бял равнец обаче са по-високи, т.к. препоръчаната доза от производителя е по-висока за тази хранителна добавка – Фигура 29, Таблица 17. Това потвърждава, че оценката на безопасност на хранителни добавки, съдържащи лечебни растения трябва да се определя не само на базата на нивата на РАНs в лечебните растения, а и на препоръчаната доза от производителя. Най-високи стойности бяха определени в хранителна добавка с бял равнец, т.к. препоръчаната доза от производителя е най-висока. Получените стойности на МОЕ<sub>4РАНs</sub> в нашето проучване са по-високи от 10 000, което показва, че приемът на добавки не представлява риск за здравето хората.

**Таблица 17** - Граница на експозиция за сума от 4РАНs (МОЕ<sub>4РАНs</sub>) и средни стойности за дневен прием (DI) за сума от 4РАНs за хранителни добавки със съдържание на билки

| Растителни видове               | Хранителни добавки, съдържащи билки | Сума от 4РАНs, ng/g dw                   | DI <sub>4РАНs</sub> , ng/kg bw дневно | МОЕ <sub>4РАНs</sub>    |
|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| <i>Matricaria chamomilla</i> L. | Лайка                               | 1.33                                     | 0.011 ÷ 0.019                         | 17 894 737 ÷ 29 824 561 |
| <i>Thymus serpyllum</i> L.      | Мащерка                             | 2.39                                     | 0.026                                 | 13 277 545              |
| <i>Sambucus nigra</i> L.        | Черен бъз                           | 2.86                                     | 0.019                                 | 18 090 605              |
| <i>Achillea millefolium</i> L.  | Бял равнец                          | 3.90                                     | 0.042 ÷ 0.109                         | 3 129 520 ÷ 8 136 752   |
| <i>Tilia tomentosa</i> Moench   | Липа                                | 4.13                                     | 0.041 ÷ 0.081                         | 4 180 940 ÷ 8 242 424   |
| Максимално допустимо ниво       |                                     | 50 ng/g dw<br>(Регламент (ЕС) 2015/1933) | -                                     | > 10 000 (EFSA, 2005)   |

## ОБОБЩЕНИЕ

на резултатите от оценка на безопасност на лечебните растения

- Направена е оценка на потенциалната експозиция при консумация на билкови чайове като са изчислени Дневен прием (DI) и коефициент на опасност (HQ) като са използвани средните концентрации за нивата на PAHs във воден екстракт от билкови чайове.

- Изчисленият дневен прием (EDI) показва каква част от съдържащите се PAHs в лечебните растения могат да попаднат в организма на човека при консумация на билков чай и прием на хранителни добавки.

- Изчисленият дневен прием за флуорен и пирен във всички билкови чайове е много по-нисък от съответната Референтната доза. Изчислените коефициенти на опасност за флуорен и пирен са много по-ниски от единица, което предполага, че експозицията при прием на билкови чайове не представлява риск за здравето на хората.

- Разработен е теоретичен подход за оценка на безопасност и риск за здравето на хората при прием на хранителни добавки, съдържащи изсушени билки и/или екстракти от лечебни растения.

- Получените стойности на  $MOE_{4PAHs}$  в настоящото проучване са по-високи от 10 000, което показва, че приемът на добавки не представлява риск за здравето хората.

### **Заклучение:**

Оценката на безопасността на лечебните растения по отношение на съдържанието на PAHs показва, че приемът на билкови чайове и хранителни добавки, съдържащи билки не представлява опасност за здравето хората.

## III.2. Резултати за съдържание на токсични елементи

В настоящото изследване са определени елементите Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Al и Co в 39 проби от пет вида диворастящи билки, събрани в района на Варна от определени места за вземане на проби. Районите са: екологично чист район (местност Фичоза), райони с натоварен автомобилен трафик в гр. Варна (бул. Сливница, ул. Батак и ул. Първа) и промишлени райони в област Варна (ТЕЦ-Девня, Девня-цимент, Екарисаж, Асфалтова база).

### III.2.1. Съдържание на токсични елементи в лечебни растения, събрани в района на Варна

Изследваните видове лечебни растения са: лечебна лайка (*Matricaria chamomilla* L.), бял равнец (*Achillea millefolium* L.), сребролиста листа (*Tilia tomentosa* Moench), черен бяз (*Sambucus nigra* L.) и мащерка (*Thymus serpyllum* L.). Средните нива на токсичните елементи в анализирания билки показват сходен профил: Fe > Al > Mn > Zn > Cu > Ni > Cr > Pb > Cd > Co. Подобни резултати са били установени за същите елементи в проби от лечебни билки, широко използвани в Кайсери, Турция. Низходящият ред на нивата на металите в тези билки е бил както следва: Fe > Sr > Mn > Zn > Rb > Cu > Ni > Cr > Co > Pb (Tokalioglu et al., 2012).

### III.2.2. Сравнение на концентрации на токсични елементи по райони

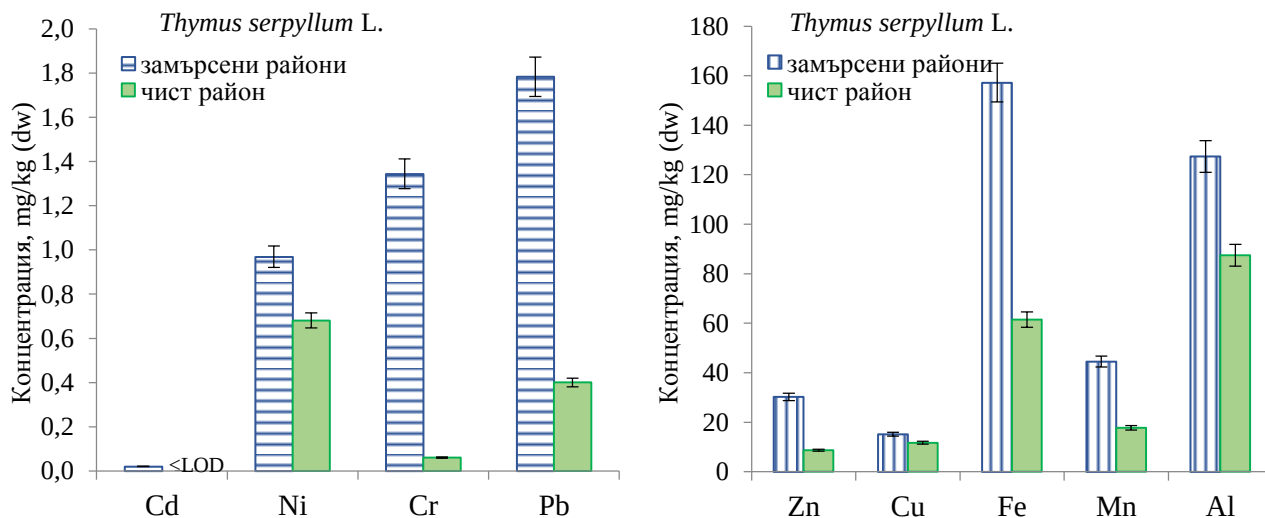
С цел по-ясно представяне на резултатите сме приели като екологично чист район – м. Фичоза, а като потенциално замърсени: райони близо до транспортни източници на замърсяване (ул. Батак, бул. Сливница, ул. Първа, близо до кв. Галата) и райони с потенциални промишлени източници на замърсяване (Екарисаж, Асфалтова база, Девня цимент, ТЕЦ - Девня).

Според редица автори съдържанието на тежки метали при един и същ вид лечебно растение се различава в зависимост от мястото на събиране на проби (Slaveska et al., 1998; Kosalec et al., 2009). Мястото на пробовземане от своя страна се характеризира с определен състав на почвата, климатичните фактори и разстояние до източници на замърсяване с токсични елементи. Преминаването на елементите от околната среда в растенията се дължи на геохимични характеристики на почвата (pH, съдържание на органични вещества - хумус), бионаличност на изследваните елементи в почвата (Pavlova, Karadjova, 2013; Tripathy et al., 2015). Промислените дейности, автомобилния транспорт, атмосферните отлагания могат да замърсят лечебните растения (Maiga et al., 2005; Tokalioglu, 2012; Radanovic et al., 2001). Когато източникът на замърсяване с токсични елементи е автомобилният трафик, съдържанието им в растенията се влияе от разстоянието от транспортните пътища и интензивността на натоварване на движението (Kolodziej et al., 2012).

Редица автори са установили, че нивата на токсични елементи са по-ниски в жилищни райони без интензивно движение на превозни средства, в сравнение с райони с интензивен автомобилен трафик (Kosalec et al., 2009). Това според някои автори показва, че почвата не е единствения източник на токсични елементи. От друга страна растенията могат да акумулират определени елементи в зависимост от склонността на даден вид, растителна част и други геоложки фактори. Замърсяването на билките с различни елементи като олово, кадмий, хром, никел и други варират между растителните видове дори и когато вегетационният им период е протекъл при едни и същи условия (Barthwal et al., 2008; Kosalec et al., 2009).



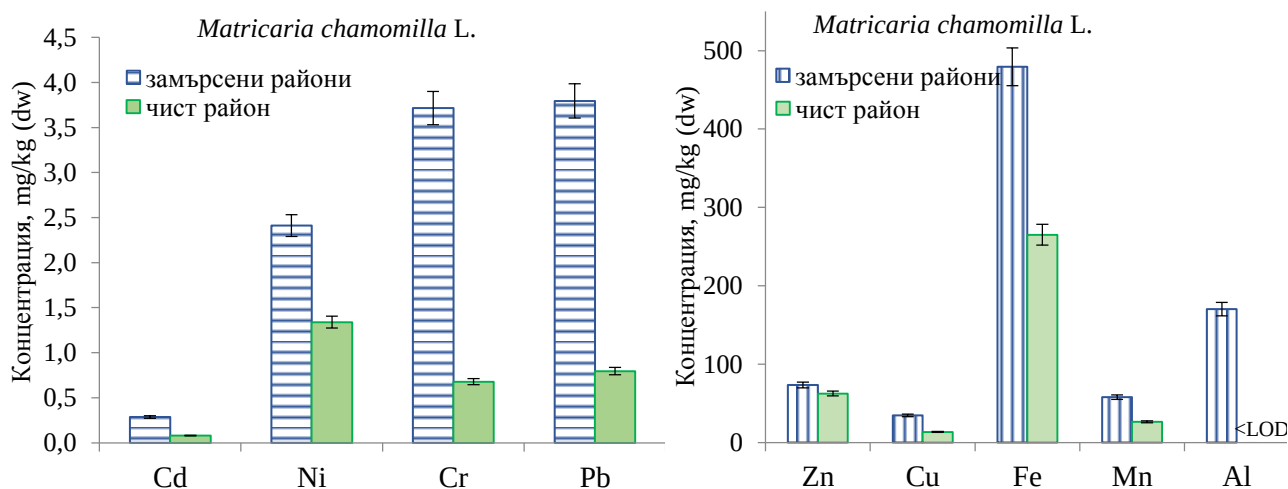
Направено е сравнение на концентрациите на изследваните елементи от замърсени райони (като средни стойности) с нивата им в лечебни растения от приетия за екологично чист район – м. Фичоза. На Фигура 30 е представено сравнение на средни концентрации на изследваните елементи в мащерка (*Thymus serpyllum* L.), събрана през 2018 г. по райони.



**Фигура 30.** Сравнение на средни концентрации на изследваните елементи в мащерка (*Thymus serpyllum* L.), събрана през 2018 г. по райони (<LOD – под границата на откриване на метода)

Най-висока е средната стойност на олово (1.78 mg/kg dw) в мащерка, събрана от райони с потенциално замърсяване - близо до ул. Първа и Екарисаж. Средната стойност на хром в мащерка, събрана от замърсени райони е 1.34 mg/kg dw и е значително по – висока от нивата на хром в билката от м. Фичоза, вероятно поради влиянието на автомобилния трафик в района. Прави впечатление, че установените нива на никел в пробите мащерка от чист и замърсени райони не се различават значително. Разликата между нивата на алуминий в проби мащерка, събрани от двата типа райони също не е много голяма, вероятно поради сходно съдържание в почвите. По-високите нива на Al в сравнение с останалите елементи може да се обясни с почвения състав -някои автори посочват, че съдържанието на алуминий в някои видове почви е сравнително високо (например глинести) (Finch et al., 2014).

На Фигура 31 е представено сравнение на средни концентрации на изследваните елементи в лечебна лайка (*Matricaria chamomilla* L.), събрана през 2018 г.

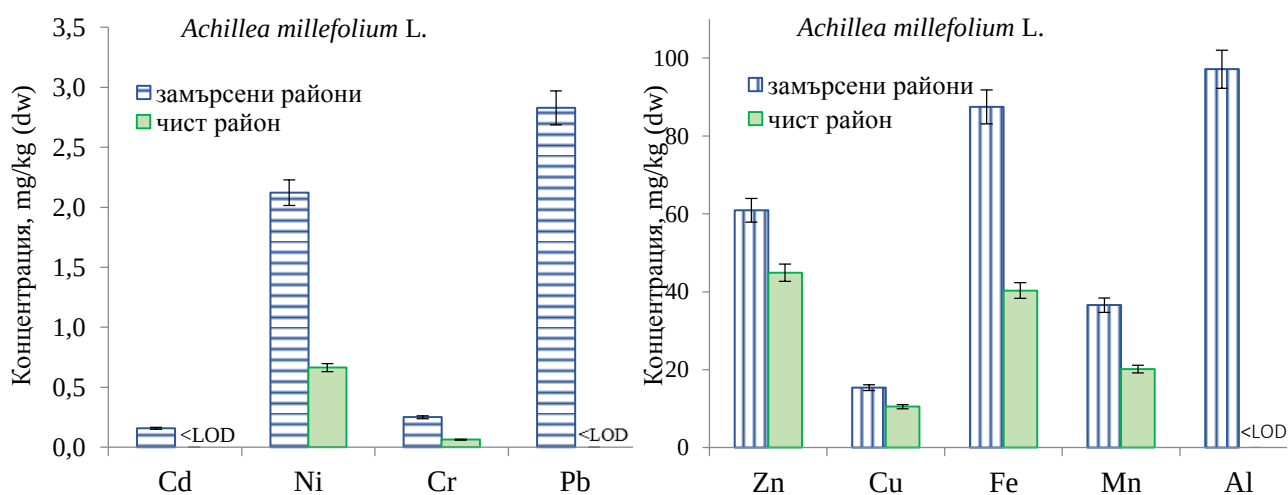


**Фигура 31.** Сравнение на средни концентрации на изследваните елементи в лайка (*Matricaria chamomilla* L.), събрана през 2018 г. по райони (<LOD – под границата на откриване на метода)

Средните концентрации на Cd, и Pb в лайка и от приетия за екологично чист район и от районите с потенциално замърсяване са под максимално допустими граници 0.3 и 10 mg/kg dw, съответно (WHO, 1998). Докато за Cr в лайка от замърсен район средната концентрация е 3.72 mg/kg dw е почти два пъти над максимално допустима концентрация от 2 mg/kg dw (WHO, 2007). Датски учени посочват, че автомобилният транспорт е основен източник на Cu, Zn, Pb и Cr (Winther et al., 2010). Концентрации на Cd, Cr и Pb в лайка, събрана през 2018 от индустриален район –Девня Цимент са съответно – 0.140 mg/kg, 0.799 mg/kg и 1.060 mg/kg и са под максимално допустимата концентрация, определена от СЗО. Причината за това вероятно е, че при получаването на клинкер по мокър или сух метод в Девня Цимент се използват ефективни пречиствателни съоръжения за изходящите газове. Това се потвърждава от доклад за емисии на токсични елементи от пещите в Девня Цимент през периода на събиране на лечебните растения (Годишен доклад по околна среда за изпълнение на дейностите през 2018г.(а)).

Най–висока е средната концентрация на желязо в лайка, събрана от замърсени райони - 479.4 mg/kg dw. Желязото и алуминият присъстват във високи концентрации в почвата и вероятно, затова е висока концентрация им и в лечебните растения. Съдържанието на алуминий и желязо в глинести почви е високо, като могат да формират колоидни частици, образувани главно от силициев диоксид, алуминиев оксид, желязо и вода (Finch et al., 2014).

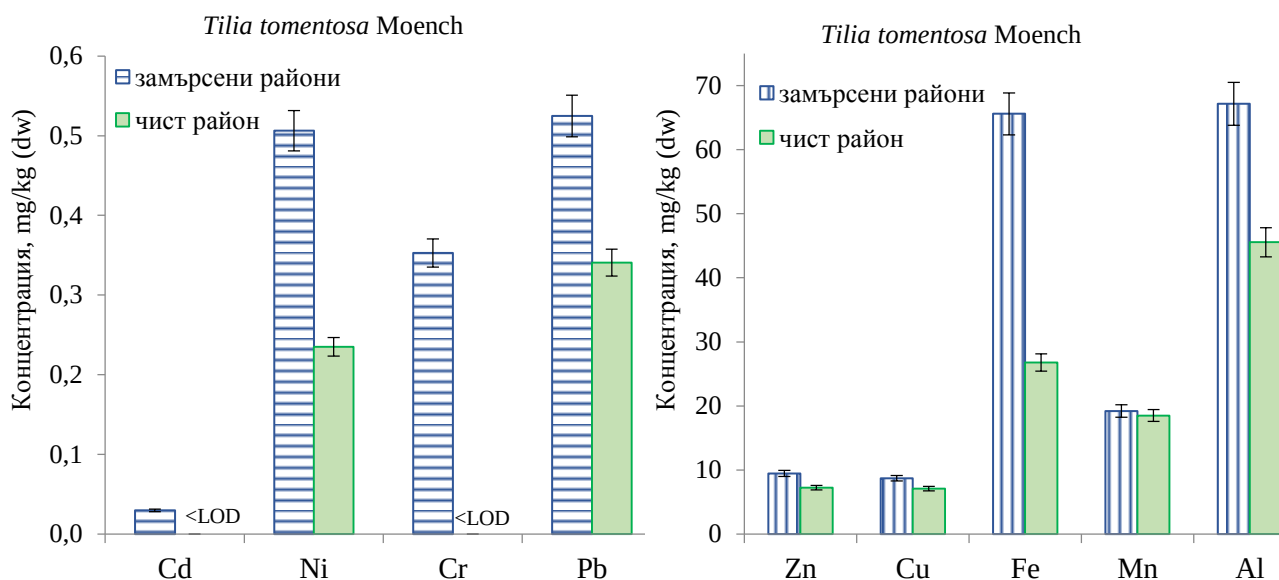
Средните концентрации на елементите Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn и Al в *Matricaria chamomilla* L., събрана от замърсени райони и от чист район през 2018 са по-високи, в сравнение с концентрациите на тези елементи в другите изследвани лечебни растения. Редица автори установяват, че някои билки като *Matricaria chamomilla* L. вероятно имат способността да акумулират елементи като Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe и Mn. Следователно лайката може да бъде подходящ индикатор за замърсяване с токсични елементи от автомобилния транспорт (Bozdogan Sert et al; 2019, Radanovic et al., 2001). Направено е сравнение на средни концентрации на анализирания елементи в бял равнец (*Achillea millefolium* L.) от чист и замърсени райони и е представено на Фигура 32. Най-висока е средната стойност на олово (2.83 mg/kg dw) в засегнатите от антропогенната дейност райони – близо до ул. Батак, бул. Сливница и ТЕЦ-Девня – Фигура 32. Концентрациите на Cd, Cr и Pb са най-високи при бял равнец, събран близо до бул. Сливница през 2018 г., вероятно под влияние на емисии от автомобилния трафик.



**Фигура 32.** Сравнение на средни концентрации на изследваните елементи в *Achillea millefolium* L., събрана през 2018 г. по райони (<LOD – под границата на откриване на метода)

Сравнението между средните концентрации на изследваните елементи в проби бял равнец, събрани от чист и потенциално замърсен район показва близки стойности при цинк и мед. Концентрацията на цинк в бял равнец, събран в м. Фичоза е по-висока от съдържанието на този елемент в останалите билки от същия район, но е по-ниска от тази в лайка. Много автори определят *Achillea millefolium* L. като растение, което има способност да акумулира цинк и други елементи, подобно на лайката (Bozdogan Sert et al., 2019; Radanovic et al., 2001).

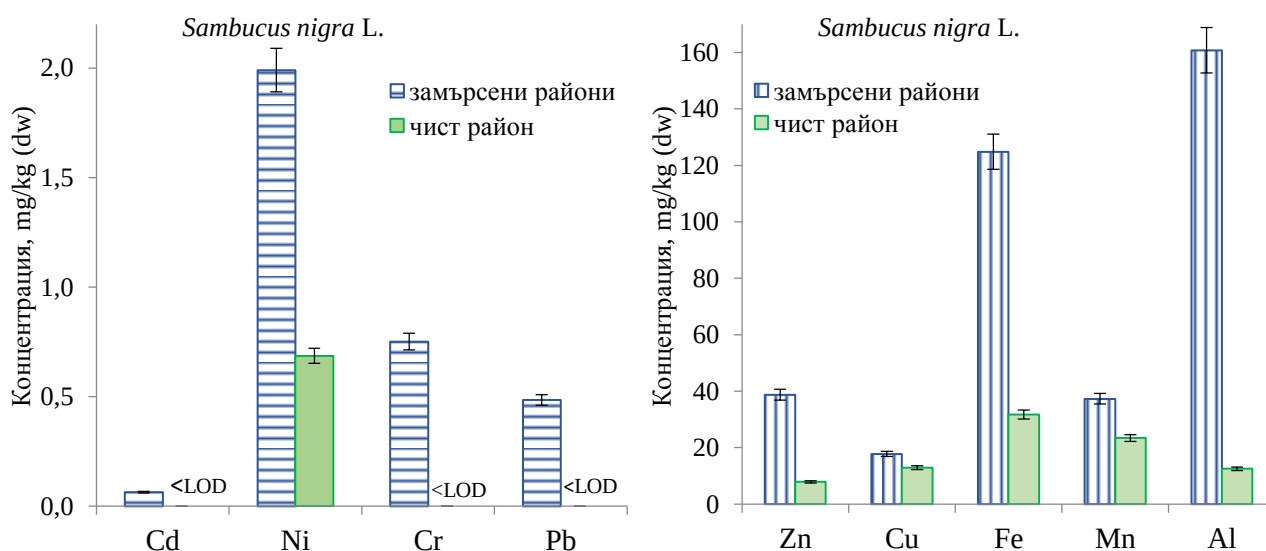
На Фигура 33 са сравнени на средни концентрации на изследваните елементи в липа (*Tilia tomentosa* Moench), събрана през 2018 г. от замърсени и екологично чист район.



**Фигура 33.** Сравнение на средни концентрации на изследваните елементи в липа (*Tilia tomentosa* Moench), събрана през 2018 г. по райони (<LOD – под границата на откриване на метода)

Средната стойност на олово е най-висока в изследваните проби липа (*Tilia tomentosa* Moench), събрани близо до ул. Батак и бул. Сливница (0.525 mg/kg dw) и е доста по-ниска от граничната стойност 10 mg/kg dw (WHO 1998). Средната стойност на никел в липа, събрана от замърсени райони е 0.506 mg/kg dw, и е почти два пъти по-висока от концентрацията на този елемент в билката от м. Фичоза. Концентрациите на кадмий и хром в липа от чист район са под границата на откриване на метода. Средните стойности на елементите Zn, Cu и Mn са съизмерими в пробите *Tilia tomentosa* Moench, събрани от чист и потенциално замърсен район. Съдържанието на желязо и алуминий в липа от замърсен район са близки като стойност, подобно на нивата на тези два елемента в бял равнец.

Сравнение на средни концентрации на токсични елементи в черен бяз (*Sambucus nigra* L.) по райони на вземане на проби е представено на Фигура 34. Концентрациите на кадмий, хром и олово в черен бяз (*Sambucus nigra* L.) от приетия за чист район м. Фичоза са под границата на откриване на аналитичния метод. В този вид билка са установени сравнително високи нива на никел в пробите от замърсени райони, подобно на лайка и бял равнец. Наблюдава се многократно по-висока стойност на Al в пробите от замърсени райони, в сравнение с концентрацията на този елемент в черен бяз от чист регион. Тази висока стойност вероятно се дължи на високата концентрация в пробите, събрани от района на Девня цимент (270 mg/kg dw).



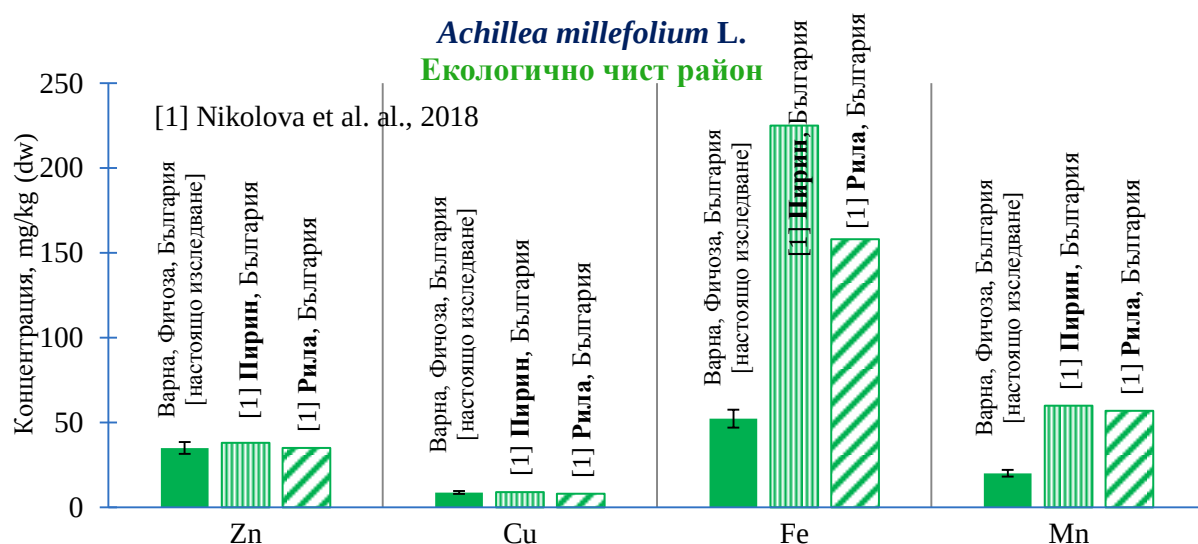
**Фигура 34.** Сравнение на средни концентрации на изследваните елементи в черен бяз (*Sambucus nigra* L.), събрана от различни райони през 2018 г. (<LOD – под границата на откриване на метода)

Средните концентрации на Cd, Cr и Pb в пробите черен бяз от замърсени райони са по-ниски от съответните максимално допустими концентрации. Желязото и алуминият присъстват във високи концентрации в почвата и вероятно, затова е висока концентрация им и в лечебните растения. Направеният анализ на първичните резултати за съдържанието на изследваните елементи в петте вида билки от различни райони през целия период на изследване установява, че данните за нивата на елементите през 2018 г. показват сходни тенденции при сравнение по райони на изследване с данните за 2019 г. При сравнението по райони не са използвани средни стойности на резултатите от 2018 и 2019 г. поради факта, че количественият анализ на химичните елементи в пробите е извършен на два различни аналитични апарата за инструментален анализ.

**В заключение:** Сравнението на резултатите по райони за вземане на проби показва категорично, че нивата на токсични елементи във всички видове лечебни растения от замърсени райони са по-високи отколкото в пробите от приетия за екологично чист район. По-високите нива на Cd, Cr и Pb вероятно се дължат основно на влиянието на автомобилния трафик. Средните концентрации на Cd, Cr и Pb в билките от замърсени райони са под пределно допустимите граници определени от СЗО – 0.3, 2 и 10 mg/kg dw, съответно (WHO, 1998; WHO, 2007).

#### ***Сравнение на съдържанието на токсични елементи в лечебни растения с данни от други проучвания***

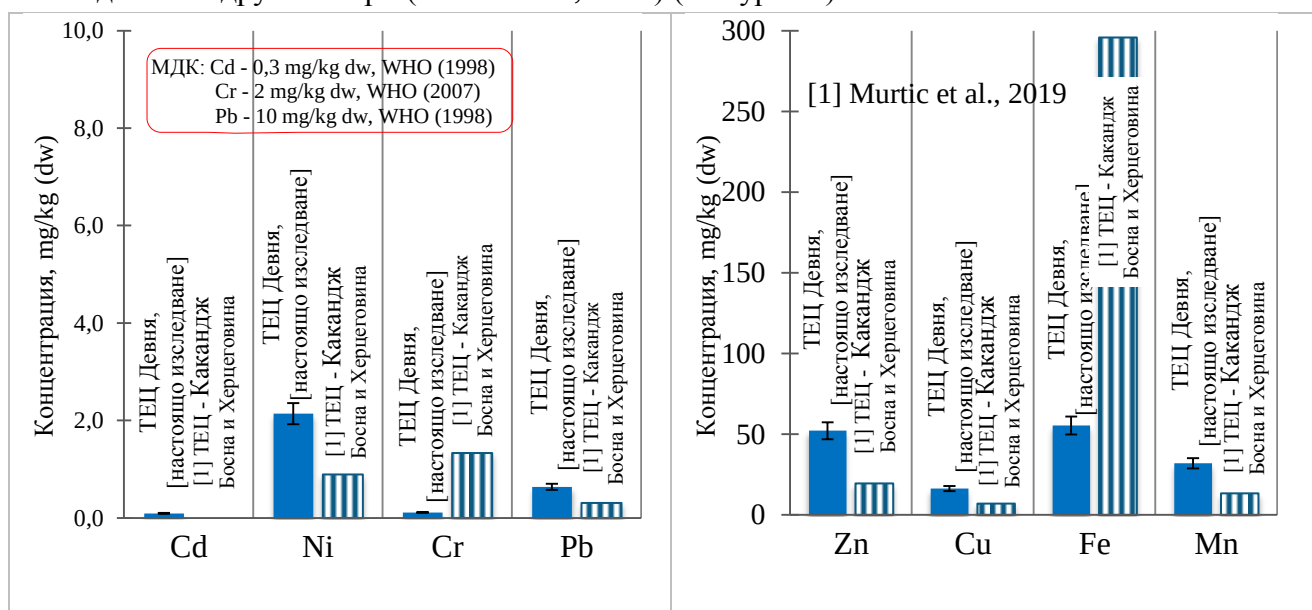
Получените резултати от анализ на токсични елементи в билки бяха сравнени с данни от подобни проучвания в България и други европейски страни. Направено е сравнение на концентрациите на елементите Zn, Cu, Fe и Mn, установени в проби бял равнец (*Achillea millefolium* L.), събрани от района на м. Фичоза и в същата билка, събрана от района на Пирин и Рила в изследване на други български автори (Nikolova et al., 2018) - Фигура 35. Резултатите показват че нивата на Zn и Cu в бял равнец в настоящото проучване и на Николова са близки и за трите района на пробовземане (Nikolova et al., 2018). Концентрациите на Fe и Mn в проби бял равнец, събрани от екологично чист район - м. Фичоза са с по-ниски стойности от нивата на тези елементи в бял равнец, събрана от Рила и Пирин, установени от Николова и съавтори.



**Фигура 35.** Сравнение на концентрации на Zn, Cu, Fe и Mn в бял равнец в настоящото изследване и от други проучвания от екологично чисти райони.

Авторите обясняват високите стойности на Fe и Mn със склонността на растението да натрупва елементи от почвите, от които зависят и нивата в изследваните проби билки.

Сравнени са концентрациите на елементите, установени в проби *Achillea millefolium* L., събрани от района на промишлен район и в същата билка, събрана от промишлен район в изследване на други автори (Murtic et al., 2019) (Фигура 36).



**Фигура 36.** Сравнение на концентрации на изследвани елементи в бял равнец *Achillea millefolium* L с други проучване

Сравнението показва, че концентрацията на никел (Ni), цинк (Zn) и манган (Mn) в бял равнец от ТЕЦ Девня са по-високи от нивата в същата билка, събрана от промишлен район в Босна и Херцеговина (Murtic et al., 2019). Нивата на желязо (Fe) и хром (Cr) в пробите билки от проучването на босненските учени са по-високи от резултатите в настоящото проучване. Според тези автори нивата на Cd, Pb и Zn в почвата корелират с тези в растенията, но подобна зависимост не е установена за Cu, Fe и Mn. Натрупването на токсични елементи зависи и от други фактори като: индивидуални особености на растителните видове, влияние на атмосферния въздух, състав на почвата, подпочвени води, наличие на други източници на замърсяване в близост до района и др. (Murtic et al., 2019).

## ОБОБЩЕНИЕ

### на резултатите за токсични елементи в лечебни растения

- Определени са концентрациите на 10 елемента Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Al и Co в проби от пет вида диворастящи билки, събрани в района на Варна и резултатите са систематизирани по елементи, по райони и видове билки.
- Сравнението на резултатите по райони за вземане на проби показва категорично, че нивата на токсични елементи във всички видове лечебни растения от замърсени райони са по-високи отколкото в пробите от приетия за екологично чист район. По-високите нива на Cd, Cr и Pb вероятно се дължат основно на влиянието на автомобилния трафик.
- Средните концентрации на Cd, Cr и Pb в билките от замърсени райони са под пределно допустимите граници определени от СЗО – 0.3, 2 и 10 mg/kg dw, съответно (WHO, 1998; WHO, 2007).
- Резултатите за токсични елементи показват по-високи стойности при проби лечебни растения, събрани от райони с потенциални източници на замърсяване:
  - Концентрациите на кадмий, хром и олово са най-високи в проби лайка от район с транспортен източник на замърсяване (0.620, 9.56 и 9.39 mg/kg dw, съответно). Тези стойности надвишават граничните стойности определени от WHO (0.3, 2.0 и 10.0 mg/kg dw, съответно).
  - В проби лайка от екологично чист район концентрациите на Cd, Cr и Pb са съответно 0.080, 0.679 и 0.796 mg/kg dw и са много по-ниски от МДК.
- Сравнението на резултатите за съдържание на Fe и Al са значително по-високи в сравнение с останалите елементи при всички проби, което вероятно се дължи на по-високото им ниво в почвите в района на побовземане.
- Средните концентрации на елементите Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn и Al в пробите лайка са по-високи, в сравнение с концентрациите на тези елементи в другите изследвани лечебни растения.

## ИЗВОДИ

1. Получените резултати показват, доминиращ замърсител от групата на ПАХs е фенантрен, който се среща във всички изследвани проби лечебни растения.
2. Определените от EFSA като приоритетни ПАХs: бензо[a]пирен и бензо[b]флуорантен не се откриват в изследваните проби лечебни растения.
3. Получените резултати за сумата от четирите приоритетни 4ПАХs са под допустимата стойност от 50 µg/kg dw за сухи билки, определена в Регламент (Регламент (ЕС) 2015/1933).
4. Сравнението на нивата на 4ПАХs в пробите билки от различни райони показва статистически значими разлики като средната стойност на сума 4ПАХs от район с транспортен източник е по-висока от средното ниво в билките събрани от район с промишлено замърсяване при лайка, бял равнец, мащерка и черен бъз.
5. Сравнението между видовете лечебни растения събрани от екологично чист район показва сравнително по-високи нива на 13ПАХs в мащерка 184.39 µg/kg dw, което вероятно се дължи на по-голяма склонност на този вид да биоаккумулира тези замърсители.
6. Бензо[a]пиренът, който има най-висока токсичност от изследваните ПАХs не се открива в изсушените билкови чайове, както и в техните водни и етанолови екстракти.
7. Степента на преминаване на сума от 13ПАХs е по-висока в етаноловите екстракти в сравнение с нивата във воден екстракт на съответната билка.
8. Установените нива на ПАХs в лечебни растения от района на Варна са сравними или по-ниски от нивата в подобни проучвания, проведени в европейски и азиатски страни.
9. Направената оценка на безопасност чрез изчислен дневен прием на ПАХs, коефициент на риск и граници на експозиция и сравнението с регулаторните норми на ЕС показва, че лечебните растения, които се използват за приготвяне на чайове не представляват риск за човешкото здраве.
10. Резултатите за токсични елементи показват по-високи стойности при проби лечебни растения, събрани от райони с потенциални източници на замърсяване. Средните концентрации на Cd, Cr и Pb в билките от замърсени райони са под пределно

допустимите граници определени от СЗО – 0.3, 2 и 10 mg/kg dw, съответно (WHO, 1998; WHO, 2007).

11. Сравнението на резултатите показва по-високо съдържание на Fe и Al в сравнение с останалите елементи при всички лечебни растения, което вероятно се дължи на по-високото им ниво в почвите в района на побовземане.
12. Средните концентрации на елементите Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn и Al в пробите лайка (*Matricaria chamomilla* L.) са по-високи, в сравнение с концентрациите на тези елементи в другите изследвани лечебни растения.
13. Сравнението на резултатите за нивата на токсични елементи в лечебни растения от района на Варна с данни от подобни проучвания, проведени в европейски и азиатски страни, показва по-ниски стойности за Cd, Pb и Cr.



## **V. ПРИНОСИ**

### **Приноси от оригинален характер**

1. В България досега не е правено систематизирано изследване на нивата на РАНs в пет вида лечебни растения, изсушени билкови чайове и техни водни и етанолови екстракти.
2. Направената оценка на безопасност на лечебните растения по отношение на изследваните химични замърсители при прием на билков чай се прави за първи път в България, което е от съществено значение за общественото здраве.

### **Приноси с научно приложен характер**

3. Разработен е високоефективен и екологичен аналитичен метод за определяне на 13 полициклични ароматни въглеводороди в лечебни растения, който може да бъде приложен при анализ на тези замърсители в други растителни проби като подправки, водорасли и др.
4. Данните от проучването допринасят за повишаване информираността на научната общност относно съдържанието на РАНs и токсични елементи в лечебни растения, които най-често се използват от населението в България.

### Списък на публикации:

- Stanislava K. Georgieva, Angelika Georgieva, Zlatina Peteva, Dilyana Dimova (2021). Trace elements in commonly used medicinal plants from Varna region, Bulgaria, *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 59277-59283, **IF 3.056, Q2**, <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10463-2>
- Angelika Georgieva, Stanislava K. Georgieva, Zlatina V. Peteva, Djeni P. Cherneva (2021). Polycyclic aromatic hydrocarbons in traditionally used medicinal plants from Varna region, Bulgaria, *Ecologia Balkanica*, Special Edition 4 pp. 125-134 **Q4**, SJR = 0.14
- Angelika Georgieva, Stanislava K. Georgieva, Zlatina V. Peteva, Djeni P. Cherneva, Temenuga P. Trifonova, Dilyana R. Dimova (2021). Theoretical approach for estimation of potential exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by intake of food supplements with herbal ingredients, *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, 8(2):7-16

### Списък на участия в научни форуми:

- Станислава К. Георгиева, Ангелика Георгиева, Златина Петева, Диляна Димова, Trace elements in commonly used medicinal plants from Varna region, Bulgaria“, 17<sup>-та</sup> Международна конференция по химия и околна среда, проведена в Центъра за разпространение на научни изследвания към Университета Аристотел в гр. Солун, Гърция през периода 16.06. – 20.06.2019г., постер
- Ангелика Георгиева, Станислава К. Георгиева, Златина Петева, Диляна Димова, Toxic and mineral elements in selected herbs from Varna region, Bulgaria, Шестия фармацевтичен бизнес форум и Научно-практическа конференция „Фармацевтичното образование - знания за практиката“ през периода 25.10. - 27.10.2019г., постер
- Ангелика Георгиева, Станислава К. Георгиева, Златина В. Петева, Джени П. Чернева, Polycyclic aromatic hydrocarbons in traditionally used medicinal plants from Varna region, Bulgaria, 5-та Балканска научна конференция по биология 2021 в Пловдив през периода 15.04. - 16.04.2021г., постер
- Ангелика Георгиева, Станислава К. Георгиева, Златина В. Петева, Джени П. Чернева, Теменуга П. Трифонова, Диляна Р. Димова, Theoretical approach for estimation of potential exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by intake of food supplements with herbal ingredients, Седми фармацевтичен бизнес форум и Научно-практическа конференция „Фармацевтичното образование – знания за практиката“, през периода 22.10. - 23.10.2021г., постер
- Ангелика Георгиева, Станислава К. Георгиева, Златина В. Петева, Джени П. Чернева, Теменуга П. Трифонова, Диляна Р. Димова, Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in herbs from Varna, Bulgaria: sources and dietary intake, XI-ти Конгрес по хранене с международно участие, през периода 26.05. - 29.05.2022г., постер
- Ангелика Георгиева, Станислава К. Георгиева, Златина В. Петева, Теменуга П. Трифонова, Polycyclic aromatic hydrocarbons contamination levels of dried herbal teas and their infusions, 11th Central European Congress on Food and Nutrition, в Словения, през периода 27.09. - 30.09.2022г., постер
- Ангелика Георгиева, Станислава Георгиева, Златина Петева, Джени Чернева, Теменуга Трифонова, Диляна Димова, Полициклични ароматни въглеводороди и токсични елементи в лечебна лайка (*Matricaria chamomilla* L.) от района на Варна, България, Шеста научна конференция за студенти, докторанти и млади учени "Предизвикателства в Химията" - Пловдив, през периода 07.10. – 08.10.2022г., устен доклад
- Angelika Georgieva, Assessment the levels of Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in herbal teas, Осми фармацевтичен бизнес форум и Научно-практическа конференция „Фармацевти и лекари - обединени в подкрепа на пациента“ през периода 28.10. – 29.10.2022г., постер
- Georgieva A, Georgieva S, Trifonova T, Essential and toxic elements in medicinal plants as ingredients in food supplements: risk-benefit assessment, 12 Chemistry conference, 13-14 october 2023, Plovdiv, постер

Благодаря на моя научен ръководител  
доц. Станислава Георгиева  
за подкрепата, помощта и усилията  
и на колегите, които ми оказаха съдействие.