



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ „ФАРМАЦИЯ“
КАТЕДРА „ФИЗИКА И БИОФИЗИКА“

Поли Диянова Радужева

**ПРОУЧВАНЕ НА ВРЪЗКАТА ОПТИЧНИ СВОЙСТВА –
АНТИОКСИДАНТЕН ЕФЕКТ НА ЕКСТРАКТИ И СОКОВЕ ОТ
ТРАДИЦИОННИ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ ЧРЕЗ МЕТОДИТЕ НА
ПРИЛОЖНАТА ФОТОНИКА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ в област на висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика, 4.1 Физични науки и научна специалност:

„Медицинска физика“

Научен ръководител: Проф. Кръстена Николова, д.ф.

Научен консултант: Доц. Д-р Дарина Христова, д.м.

Официални рецензенти: Проф. Цветанка Бабева, дф

Проф. Пламен Загорчев, дбн

Варна

2021 г.

Настоящият дисертационен труд е разработен в катедра „Физика и биофизика“ при Факултет по „Фармация“ към Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“- Варна.

Дисертационният труд съдържа 136 машинописни страници и е онагледен с 28 таблици и 45 фигури. Списъкът с цитираната литература включва 245 заглавия, от които 7 на кирилица и 238 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на катедра „Физика и биофизика“ към Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“- Варна, съгласно чл.26, ал.3 и чл.30 ал.3 от ППЗРАСРБ и чл.44, ал.2 от ПРАС на Медицински университет - Варна и Решение на ФС по протокол №11/18.01.2021 г. на Факултета по „Фармация“ във връзка с доклад с вх.№ 102-68/11.01.2021 г. от проф. Кръстена Николова д.ф., ръководител на катедра „Физика и биофизика“ към Медицински университет- Варна.

Публичната защита на дисертационният труд ще се проведе на
от ч. въз основа на Заповед № от
на проф. д-р. Валентин Игнатов, д.м., Ректор на Медицински
университет -Варна, пред научно жури:

Председател:

Проф. Кръстена Николова, дф.

Външни членове:

Проф. Пламен Загорчев, дб, дбн.

Проф. Цветанка Бабева, дф.

Доц. д-р Екатерина Писанова, дф.

Вътрешни членове:

Проф. Кръстена Николова, дф.

Доц. Стефан Кръстев, дбф.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ-Варна и са на разположение в катедра „Физика и биофизика“ към Медицински университет „Проф.д-р Параскев Стоянов“- Варна.

Съдържание

ВЪВЕДЕНИЕ	6
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД.....	7
Структура и обем на дисертационният труд.....	8
ПЪРВА ГЛАВА	10
ПРИЛОЖЕНИЕ НА ФОТОНИКАТА ЗА АНАЛИЗ НА ПРОДУКТИ ОТ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ И ТРАДИЦИОННИ РАСТИТЕЛНИ МАСЛА.....	10
ВТОРА ГЛАВА.....	12
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	12
ТРЕТА ГЛАВА	18
ПРИЛОЖЕНИЕ НА ФОТОНИКАТА ЗА АНАЛИЗ НА СОКОВЕ ОТ ДИВИ ГОРСКИ ПЛОДОВЕ ...	18
ЧЕТВЪРТА ГЛАВА	23
АНАЛИЗ НА МАСЛА ОТ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ ЧРЕЗ МЕТОДИТЕ НА ПРИЛОЖНАТА ФОТОНИКА	23
ПЕТА ГЛАВА	31
АНАЛИЗ НА ВОДНИ И ЕТАНОЛНИ ЕКСТРАКТИ ОТ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ С ПОМОЩТА НА ПРИЛОЖНАТА ФОТОНИКА	31
ИЗВОДИ	40
ПРИНОСИ.....	42
СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	44
БЛАГОДАРНОСТИ	45
ЛИТЕРАТУРА	46

*Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.

Използвани съкращения

LA – линолова киселина;

LNA – α -линоленова киселина;

EVOO – студено пресовано маслиново масло;

LDL – „лош“ холестерол;

HPLC – високоефективна течна хроматография;

LED – светодиода;

ИЧ – инфрачервено лъчение;

УВ – ултравиолетово лъчение;

ВЕМ – възбудно-емисионни матрици;

Na₂CO₃ – динатриев карбонат;

H₂SO₄ – сярна киселина;

CH₃OH – етанол;

HNO₃ – азотна киселина;

H₂O₂ – диводороден пероксид;

HCl – солна киселина;

HNO₃ – азотна киселина;

(NH₄)₂SO₄ – амониев сулфат;

FeCl₃ – железен трихлорид;

CH₃CN – ацетонитрил;

CH₃COOH – оцетна киселина;

L – светлост;

TLC – тънкослойна хроматография;

DSC – диференциална сканираща калориметрия;

АОА – антиоксидантна активност;

TPC – общо съдържание на феноли;

FTIR – инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация;

FRAP – желязо редуцираща способност на плазмата;

ABTS – 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid);

DPPH – 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate;

ICP-MS – мас спектросметрия с индуктивно свързана плазма;

ATR-IR – инфрачервена спектроскопия с пълно вътрешно отражение;

CO₂ – въглероден диоксид;

CCl₄ – тетрахлометан;

HORAC – капацитет за предотвратяване на образуването на хидроксилни радикали;

ORAC – абсорбционен капацитет на кислородния радикал;

GC – газова хроматография;

FAAS – пламъкова атомно - абсорционна спектросметрия;

NIR – близка инфрачервена област;

AAPH – 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride;

COF₂ - карбонил флуорид;

ВЪВЕДЕНИЕ

България е истинска съкровищница на ценни растителни видове, богати на полезни за човешкия организъм вещества в благоприятно съотношение. Днес интересът към биологично активните вещества в храните расте, а заедно с тях нарастват и изследванията, свързани с използване на екстракти и сокове от лечебни растения. Предвид огромното видово разнообразие на растенията може да се счита, че лечебният им потенциал не е напълно изследван, макар че действието им върху различни функции от човешкия организъм е известно отдавна и използвано в народната медицина на държави като Китай, Индия, Южна Америка и други.

Обикновено изследванията са насочени към познаването на антиоксидантните свойства на вещества, съдържащи се в техни екстракти, както и условията за получаване на сокове, тинктури или извлеци с по-високо съдържание на антиоксиданти.

Посочените продукти често се използват като основа за разработване на нови функционални храни, хранителни добавки във фармацията или козметични средства с регенериращо и възстановяващо действие върху кожата. Известни са много научни изследвания, свидетелстващи за участието на свободните радикали в патофизиологията на процесите на стареене, множество хронични дегенеративни заболявания като рак, сърдечно-съдови заболявания, болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон и др. Тези резултати определят важното място на антиоксидантите и все повече нараства интересът към използването на сокове, студено пресовани растителни масла, тинктури като продукти с висока антиоксидантна активност.

Интересът към антиоксидантите нараства постоянно не само от страна на учените, но и от страна на лекарите, диетолозите и технолозите. Затова все повече нашумява използването на олио с добавки от лечебни растения в него, сокове от диви горски плодове от географските ширини на България, както и получаване на маслени екстракти при различни условия от нетрадиционни за това лечебни растения.

Обект на настоящият дисертационен труд е чрез методите на приложната фотоника да се проучат възможностите за бързо установяване на корелации между оптични свойства и антиоксидантен ефект на спиртни, водни или маслени екстракти от лечебни растения.

Резултатите от тези изследвания биха могли в последствие да послужат като база за разработване на нови хранителни добавки с висока антиоксидантна активност, функционални напитки или козметични продукти с регенериращ ефект.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД

Целта на дисертационният труд е прилагане на методите на фотониката като качествени и полуколичествени средства за изследване на връзките между оптичните свойства и антиоксидантния ефект на екстракти и сокове от лечебни растения във връзка с използването им при производство на хранителни добавки, фармацевтични или козметични продукти.

За реализирането на така формулираната цел са поставени следните задачи:

I. Получаване и охарактеризиране на сокове от диви горски плодове червени боровинки (*Vaccinium vitis-idaea*), дренки (*Cornus mas*) и малини (*Rubus idaeus*)

1. Да се проучи влиянието на технологичните фактори върху цветовете характеристики и антиоксидантната активност на изследваните сокове;
2. Да се получат флуоресцентните спектри на пробите във видимия и УВ диапазони като се оцени дължината на светлинната вълна за най-ефективно възбуждане на образците и получаване на корелации между флуоресцентните максимуми и концентрацията на веществата с антиоксидантен ефект.

II. Екстрахиране на масла от нетрадиционни лечебни растения

1. Изследване на мастно-киселинния, стеролния и токоферолния състав на маслата;
2. Получаване на флуоресцентни и инфрачервени спектри и DSC профил на образците;
3. Изследване на зависимостта между съединения с антиоксидантен характер и параметри на приложната фотоника.

III. Получаване и охарактеризиране на водни и водно-алкохолни екстракти от рядко изследвани лечебни растения

Структура и обем на дисертационният труд

Дисертационният труд съдържа пет глави.

В първа глава приложение на фотониката за анализ на продукти от лечебни растения и традиционни растителни масла са представени основните приложения на фотониката при анализа на рафинирано растително масло, студено пресовано маслиново масло, нетрадиционни масла от лечебни растения, сокове, тинктури и екстракти, описани в научната литература. Представени са здравословните ефекти и съдържанието на билки и плодове, от които са изготвени екстракти, тинктури, сокове и масла.

Във втора глава материали и методи са представени материалите и техният произход, както и използваните методи за тяхното получаване. Също така са описани методите и уредите, използвани за определяне на оптични характеристики на образците, сред които флуоресцентна спектроскопия, спектроскопия във видимата и инфрачервена област, масспектрометрия, колориметрия. Описани са и използваните за потвърждение на резултатите референтни методи и апаратура: течна хроматография, газова хроматография и методи за определяне на антиоксидантната активност- DPPH, FRAP, ABTS, ORAC и HORAC.

В трета глава приложение на фотониката за анализ на сокове от диви горски плодове са описани резултатите от проведените изследвания върху сокове от червени боровинки (*Vaccinium vitis-idaea*), малини (*Rubus idaeus*) и дренки (*Cornus mas*), с добавени инулин и лактулоза. Чрез облъчването на пробите в УВ диапазона са получени флуоресцентните им спектри и пиковете в тези спектри са свързани с вещества с антиоксидантен ефект. Изследвани са и цветовите характеристики за соковете от диви горски плодове. Установени са данни за съдържанието им на антоцианини, общото им фенолно съдържание, както и за антиоксидантната им активност, определена по DPPH, FRAP и ABTS методи. Доказани са зависимости между химични параметри и оптични характеристики на изследваните сокове.

В четвърта глава анализ на масла от лечебни растения чрез методите на приложната фотоника са представени резултатите, получени за флуоресцентните и ИЧ спектри и DSC профили на масла, екстрахирани от семената на бъзак (*Sambucus ebulus*), кориандър (*Coriandrum sativum* L.), бял трън (*Silybum marianum* L.) и черен кимион (*Nigella sativa*), както и за високоолеиново слънчогледово масло с билкови примеси. Получени са и данни за съдържанието на мастни киселини, стероли, токофероли и са намерени

стойностите на пероксидно, окислително и осапунително число, както и за окислителната стабилност на маслата.

В пета глава анализ на водни и етанолни екстракти от лечебни растения с помощта на приложната фотоника е направено сравнение по отношение на съдържанието на флавоноиди и фенолни киселини на сладководни водорасли *Spirulina* и *Chlorella*, отглеждани в биореактор с добре познати морски водорасли *Ulva intestinalis*, *Rhodophyta* и *Phaeophyceae*. Пригответни са и водни инфузи от сладководните водорасли при различен хидромодул и време на екстракция и са получени флуоресцентните им спектри, цветовете параметри и антиоксидантната им активност. Изследван е и палмово-кленов сироп, като за целта са получени резултати за флуоресцентните максимуми в спектъра му, възбудно-излъчвателната му матрица, съдържанието на феноли, флавоноиди, разтворими въглехидрати и антиоксидантната му активност. Изготвени са водно-етанолни екстракти от покривен дебелец (*Sempervivum tectorum* L.) и са получени флуоресцентните и трансмисионните им спектри, възбудно-излъчвателните им матрици и цветовете им параметри. Представени са данни за основни, неесенциални и токсични елементи в сухи листа от *Sempervivum tectorum* L. Определено е бионаличното съдържание в свежи листа от покривен дебелец, третиран по процедурата за имитация на стомашен сок и в сок от пресни листа.

ПЪРВА ГЛАВА

ПРИЛОЖЕНИЕ НА ФОТОНИКАТА ЗА АНАЛИЗ НА ПРОДУКТИ ОТ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ И ТРАДИЦИОННИ РАСТИТЕЛНИ МАСЛА

В първа глава е направен обзор на приложението на спектроскопията за анализ на рафинирани и нетрадиционни растителни масла, студено пресован зехтин, сокове, екстракти и тинктури от лечебни растения. Използвани са за качествено определяне на съдържанието на антиоксиданти и промяната им в резултат на термична обработка, за оценка на наличието на продукти на окисление и добавянето на по-евтини продукти. Методите на приложната фотоника са определени като евтини, бързи и не изискващи предварителна обработка на пробите, служещи като алтернативи на химичните методи. Почти липсват данни за използването на флуоресцентните техники при тинктури и екстракти от лечебни растения. Тяхното приложение би било от изключителна важност в оценката на антиоксидантната активност.

Флуоресцентната спектроскопия е използвана за качествено определяне на окислителни продукти, хлорофил и витамин Е в растителни масла. Също така е успешно прилагана за експресно различаване на многократно термично обработена мазнина от прясна такава.

Луминесцентна спектроскопия е приложена за характеризиране и диференциране на соево, рапично, царевично, слънчогледово, ленено и маслиново масло. Определено е и наличието на окислителни продукти, токофероли и пигменти. При термична обработка на зехтин се променя съдържанието на каротеноиди и витамин Е. Техниките са прилагани успешно и за откриване на нерегламентирани примеси в студено пресовано маслиново масло.

Потърсена е връзката между химични свойства и физични показатели като е използвана флуоресцентна спектроскопия при масла от семена на бял трън, пъпешови семена и тиква. Установено е наличието на пигменти, витамини, токофероли, феноли и β -каротин в масло от чия. Проучено е влиянието върху полезните свойства на добавяне на ленено масло към слънчогледово масло. Техниката спомага и откриването на добавката на евтини масла в орехово масло. Направен е сравнителен анализ между растителни масла.

Чрез определяне на абсорбционните спектри в УВ областта е определена степента на окисляване на маслото.

Чрез измерването на абсорбционните пикове на разтвор на масло от конопено семе в хексан е установено наличието на хлорофил и каротеноиди.

Чрез анализ на триизмерни флуоресцентни спектри и контурни карти са открити съединения с антиоксидантна активност в различни масла и екстракти от водорасли.

Синхронната флуоресцентна спектроскопия е използвана за откриване на добавката на различни плодови сокове към ябълков и портокалов сок и са получени възбудно-излъчвателни матрици за скрининг на антиоксидантната им активност. Определено е съдържанието на допълнително добавени токсични елементи в сок от червени боровинки и елементния състав на инфузи от чайове и билки с помощта на флуоресцентна спектроскопия от рентгенови лъчи.

Чрез получаване на флуоресцентните спектри е измерено влиянието на добавянето на различни билки върху слънчогледово масло.

FTIR се използва за бърз качествен контрол на етерични масла.

Приложена е ултравиолетова спектроскопия за определяне на фенолни съединения в етанолни и водни екстракти, приготвени от кафяви водорасли (*Undaria pinnatifida*, *Arthrothamnus bifidus*, *Thalassiophyllum clathrus* и *Agarum turneri*).

ВТОРА ГЛАВА

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

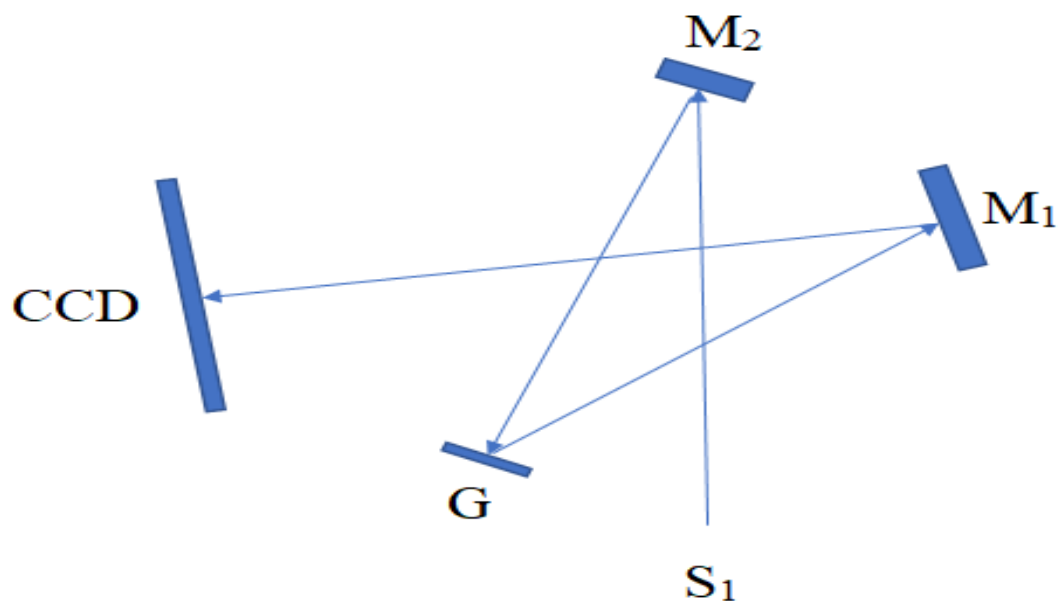
Във втора глава са описани използваните материали и методи в дисертацията за приготвяне и определяне на флуоресциращи антиоксидантни елементи, цветови характеристики, съдържание на антоцианини, общо фенолно съдържание и антиоксидантна активност в сокове от червени боровинки, малини и дренки с добавени инулин и лактулоза.

Обърнато е внимание и на технологията на екстракция на масла от семена на бъзак (*Sambucus ebulus*), кориандър (*Coriandrum sativum* L.), бял трън (*Silybum marianum* L.) и черен кимион (*Nigella sativa*). Обяснени са подробно методите за получаване на флуоресцентни и ИЧ спектри, DSC профили, мастно-киселинен състав, състав на стероли и токофероли в горепосочените масла, както и във високоолеинови слънчогледови масла с добавка на розмарин, босилек и орехово масло, предоставени от фирмата производител.

Разгледани са начините на изготвяне на водни инфузи и ацетонови екстракти от сладководни водорасли *Spirulina* и *Chlorella* и методите за получаване на флуоресцентните им спектри, цветови характеристики и антиоксидантната им активност, както и за определяне на съдържанието на флавоноиди и фенолни киселини в лиофилизирани морски и сладководни водорасли.

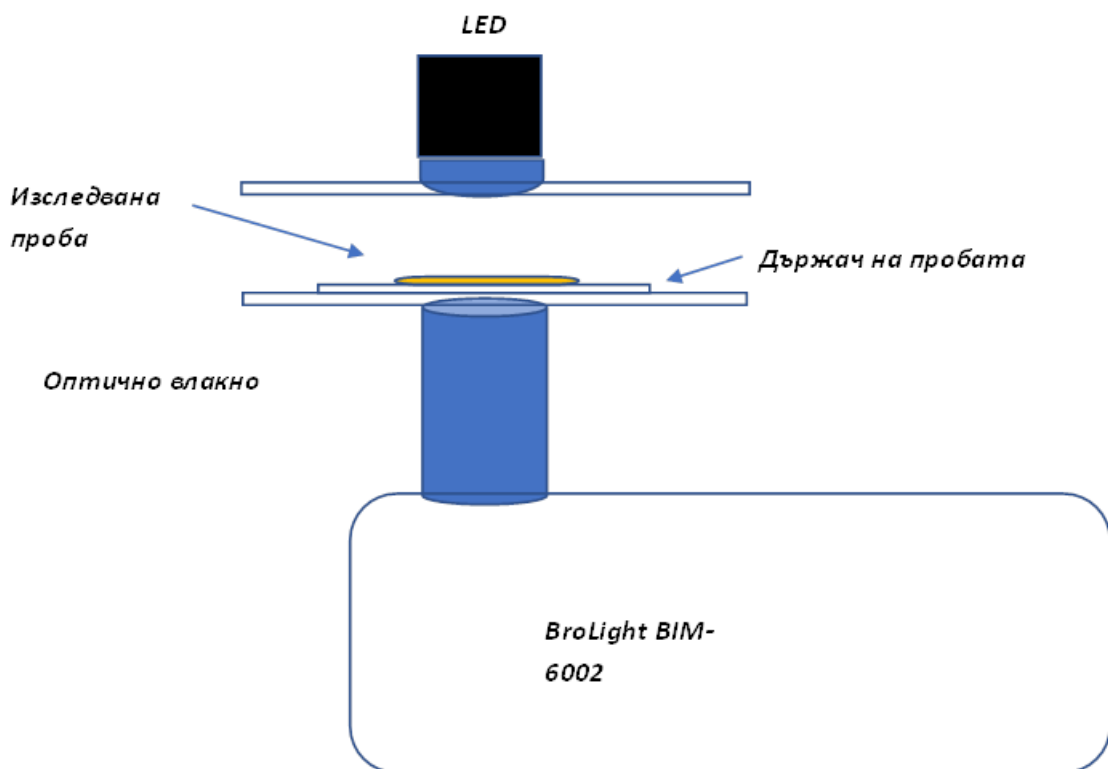
Обяснена е процедурата на имитация на стомашна среда, приложена при свежи листа от покривен дебелец, както и начина на получаване на сок от тях. Обърнато е внимание на методите, приложени за определяне на бионалично съдържание, основни, неесенциални и токсични елементи в *Sempervivum tectorum* L.

За измерване на спектралните характеристики на малинови сокове, сокове от червена боровинка с добавени лактулоза и инулин (глава 3), натурален дървесен сироп (глава 5), масла от семена на черен кимион и кориандър и високоолеинови слънчогледови масла с билкови добавки (глава 4) се използва спектрофотометър BroLight VIM-6002 с оптична резолюция в диапазона от 2 до 8 nm и спектрален отговор на детектора 200 nm-1100 nm. Принципът на работа на спектрометъра се основава на кръстосана оптична система на Czerny-Turner (Фигура 1).



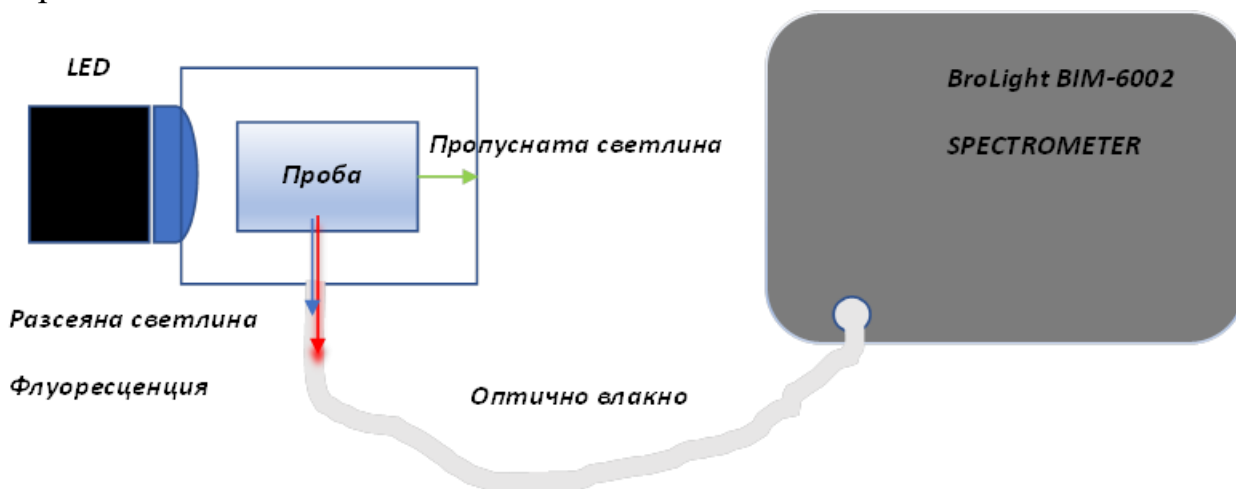
Фигура 1. Принцип на работа на спектрофотометър BroLight BIM-6002

За проверка на точността на получените резултати от спектрофотометър BroLight BIM-6002 са проведени паралелни измервания за изследваните сокове от трета глава с спектрофлуориметър FluoroLog 3 на HORIBA Jobin Yvon, Франция. Установената разлика е от порядъка на 1.9 %.



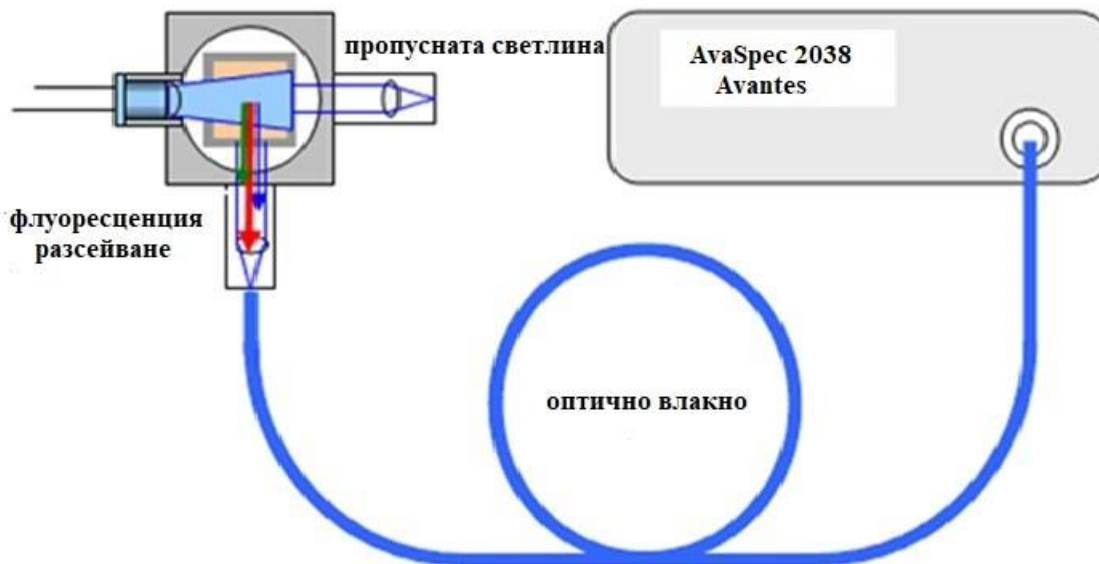
Фигура 2. Оптична схема за флуориметрични изследвания на нетрадиционни масла и сокове от диви горски плодове

Сокове и маслата са поставени между две кварцови пластини (Фигура 2). За водните и водно-алкохолните екстракти, както и дървесния сироп са разположени в кювета (Фигура 3). Образците са изследвани без предварително разреждане.



Фигура 3. Експериментална постановка

Използваните диоди (LED) за изследване на малиновите сокове са с дължина на вълната 265 nm и 295 nm, за дървесен сироп са 295 nm, 395 nm, 405 nm, 410 nm и 415 nm, за маслата от семена на кориандър (*Coriandrum sativum*) и черен кимион (*Nigella sativa*) - с дължина на вълната 370 nm, 380 nm, 390 nm, 400 nm, 410 nm, 420 nm и 435 nm, а при слънчогледовото олио с билкови примеси е използвана възбуждаща светлина с дължина на вълната 390 nm.



Фигура 4. Експериментална постановка

За измерване на флуоресцентните спектри на масло, извлечено от семена на бъзак, кориандър и бял трън (глава 4) и етанолни екстракти от *Sempervivum tectorum* L. (глава 5) е използван влакнесто-оптичен спектрометър AvaSpec-

2038, Avantes (Фигура 4.), със спектрална чувствителност в диапазона 200-1100 nm.

Източниците, използвани за измерване на спектрите на флуоресценция са светодиоди (LED), излъчващи светлина с дължина на вълната 245 nm, 265 nm, 275 nm и 295 nm при водно-алкохолните екстракти от *Sempervivum tectorum* L., 245 nm, 295 nm, 375 nm, 395 nm, 405 nm, 410 nm, 415 nm и 435 nm при маслото, извлечено от семена на бъзак (*Sambucus ebulus*), кориандър (*Coriandrum sativum* L.) и бял трън (*Silybum marianum* L.) и 290 nm за инфузите от водорасли.

За получаване на ИЧ спектри в глава 4 е използван ATR-FTIR Thermo Fischer Nicolet iS50 FT-IR Spectrometer, модул с диамантен кристал. Анализиранияте проби се поставят между два NaCl диска и се записва спектъра в режим на трансмисия.

ICP-MS спектрометър „X СЕРИЯ 2“ - Thermo Scientific с 3-канална перисталтична помпа; концентричен пулверизатор; Пелтие камера за охлаждане (10⁰C); интерфейс Xt; Ni конуси и плазмена мощност от 1400 W се използва при определяне на елементи при масла (глава 4) и листа от покривен дебелец (глава 5) след предварителното им разлагане в микровълново оборудване - Milestone ETHOS labstation.

Пламъков атомно-абсорбционен спектрометър с деутериева корекция на фона - Thermo SOLAAR M5 и ICP-OES спектрометър JY ULTIMA 2 с радиално наблюдение спомагат определянето на бионалично съдържание при сок от свежи листа и листа, подложени на процедура за имитация на стомашен сок (глава 5) след подлагането им на предварителна обработка.

При анализа на високоолеинови масла с билкови примеси и маслените билкови екстракти (глава 5) е използван спектрофотометър Lovibond PFX 880 с кювета с дебелина 10 mm. Използвани са спектрите на пропускане във видимата област за изчисляване на β -каротина и цветовете параметри чрез софтуерна програма, специално разработена за използвания спектрофотометър.

Определени са цветовете параметри на соковете от диви горски плодове (глава 3) в колориметрична система CIELab чрез използване на софтуерен пакет VISIONlite ColorCalc за спектрофотометър Helios Omega и кювета с дебелина 10 mm.

В маслата от семена на бъзак (*Sambucus ebulus*), кориандър (*Coriandrum Sativum* L.), бял трън (*Silybum marianum* L.) и черен кимион (*Nigella sativa*) (глава 4) са определени токофероли чрез течен хроматограф Merck-Hitachi, Дармщат, Германия, оборудван с 250 mm x 4 mm Nucleosil Si 50-5 колона (Merck, Darmstadt, Германия) и флуоресцентен детектор „Merck- Hitachi "F 1000. Те са идентифицирани чрез сравняване на времената на задържане с тези на стандартни субстанции на съответните токофероли.

Количественото определяне на стероли в маслата от семена на бязак (*Sambucus ebulus*), кориандър (*Coriandrum sativum* L.), бял трън (*Silybum marianum* L.) и черен кимион (*Nigella sativa*) (глава 4) се провежда спектрофотометрично (при 597 nm) след изолирането им чрез тънкослойна хроматография върху силикагел 60 G в мобилна фаза диетилов етер:хексан (1: 1 обем/обем).

Масно-киселинният състав на маслото от семена на бял трън, бязак и кориандър (глава 4) се определя чрез газов хроматограф HP 5890 series II (Hewlett Packard GesmbH, Виена, Австрия), оборудван с капилярна колона 75 m x 0,18 mm x 25 µm Supelco FP - 2560 и детектор за пламъкова йонизация след трансметирирането им. Метиловите естери на масните киселини са пречистени с тънкослойна хроматография върху 20x20 cm плочи, покрити със слой от 0,2 mm силикагел 60 G (Merck, Darmstadt, Германия) с подвижна фаза n-хексан: диетилов етер (97: 3, обем/обем).

За определяне на общото фенолно съдържание се използва Folin-Ciocalteu реагент (1 mL), разреден пет пъти и се смесва с 0,2 ml от пробата и 0,8 ml 7,5% Na₂CO₃ (натриев карбонат/калцирана сода). Реакцията се провежда в продължение на 20 минути при стайна температура на тъмно. След това абсорбцията се измерва при 765 nm.

За определяне на полифенолните киселини и флавоноиди се използва високоефективна течна хроматографска система Agilent 1020, снабдена с UV-VIS детектор и колона Zorbax C18. Анализът се извършва при λ=280nm на стайна температура, скорост на потока – 0,8 ml/min и градиентно елуиране при първоначално съотношение на компонентите на мобилна фаза ацетонитрил : 0,5% оцетна киселина (14:86 v/v).

Съдържанието на антоцианини и фенолни компоненти в пробите се измерва спектрофотометрично (Lee Jungmin et al., 2005), като първоначално 0,5 - 1 ml червена боровинка и дренка се стрива с кварцов пясък и 2-5 ml 70% метанол и количествено се прехвърля в колба с хладник. Екстрахира се трикратно. Концентрацията се определя изразена като еквивалент цианидин-3-глюкоза.

За определяне на антиоксидантната активност на различните образци в дисертацията се използват DPPH, ABTS, FRAP, ORAC и HORAC методи.

При FRAP метода се измерва абсорбцията на формираното цветно вещество при дължина на вълната 593 nm Реагентът се приготвя от смесването на предварително приготвени 0,3 M ацетатен буфер с рН 3,6, 10 mM 2,4,6-трипиридил-s-триазин (TPTZ) и 20 mM FeCl₃·6H₂O в съотношение 10:1:1. 0,1 ml от изследваният екстракт се добавя към 3 ml FRAP реагент. Реакционната смес се инкубира на водна баня за 4 min при 37 °C (Benzie & Strain, 1996).

При DPPH метода се отчита спектрофотометрично при 517nm редуцията на абсорбцията. От изследвания екстракт- 0,15 ml се смесват с 2,85 ml прясно

приготвен разтвор на DPPH. Реакционната смес се инкубира на водна баня за време 15 min. при 37°C (Kivrak et al., 2009).

За измерване на антиоксидантната активност по ABTS метода се определя оптичната плътност при 734 nm след едночасова инкубация на тъмно при стайна температура. ABTS радикалът се получава, след 16 часа инкубация на тъмно от смесването на ABTS и калиев персулфат. Работният разтвор се приготвя така, че оптичната плътност на контрола при 734 nm да е 0.700 ± 0.005 . Към 2 ml от така получения разтвор се добавят изследваните образци и се измерва при същата дължина на вълната (Re et al., 1999).

За оценка на антиоксидантната активност на изследваните сокове е изчислена стойността на V-50. Това е обемът, който трябва да се добави към радикала, така че оптичната плътност на пробата да бъде половината от тази на контролата, т.е. елиминирани са половината радикали. Колкото този обем е по-малък, толкова антиоксидантната активност (АОА) на изследвания образец е по-голяма.

ABTS и DPPH методите са използвани за анализа на соковете от малина. Поради високата плътност на соковете, пробите се разреждат, така че първоначалните разтвори за експериментите са в концентрация от 20 mg концентриран сок/ml. Всички експерименти за малиновите сокове са проведени в интервал от 0 до 2 mg/ml крайна концентрация. Всяка зависимост е резултат от 5 концентрации измерени паралелно трикратно.

FRAP методът е използван за определяне количеството на антиоксидантите в сокове от червена боровинка, дренка и дървесен сироп. Резултатите са изразени в mM Trolox® еквиваленти (TE).

Диференциално сканираща калориметрия е приложена за изследване на характеристики на маслените проби, като за маслата от семена на кориандър и черен кимион са получени в температурния диапазон от - 60 °C до 60 °C , а при пробата, получена от смесването на семена от бъзак, кориандър и бял трън от - 80 °C до 40 °C чрез диференциално сканиращ калориметър DSC 204 F1 Phoenix (NETZSCH, Германия), оборудван с вътреохлаждащо устройство. DSC апаратурата е калибрирана с индиев стандарт.

Окислителната стабилност на маслата от кориандър и черен кимион се анализира чрез използване на Rancimat 743 (Швейцария) съгласно официални методи за определяне на времето на индукция. Температурата е настроена на 110 °C и 20 L/h въздушен поток. Маслената проба е 3 g и стабилността се изразява като време на индукция на окисляване. За високоолеиновите слънчогледови масла оксидантната стабилност се определя чрез кондуктометрично откриване на летливи киселини с апарат Rancimat Methrom 679 (Methrom, Herisau, Switzerland) при 100 °C и скорост на въздуха 20 L/h.

ТРЕТА ГЛАВА

ПРИЛОЖЕНИЕ НА ФОТОНИКАТА ЗА АНАЛИЗ НА СОКОВЕ ОТ ДИВИ ГОРСКИ ПЛОДОВЕ

В трета глава за първи път са изследвани сокове от диви горски плодове с добавени инулин и лактулоза.

Целта на изследванията в трета глава е да демонстрира възможността на приложната фотоника за качествено откриване на биологично активни вещества с антиоксидантен ефект в плодови сокове от червени боровинки (*Vaccinium vitis-idaea*), малини (*Rubus idaeus*) и плодове на дрян (*Cornus mas*) с добавка на инулин (1 g, 2 g и 3g) и лактулоза (0.5 ml, 1 ml и 1.5 ml).

За изпълнение на така поставената цел се поставят за решаване следните задачи:

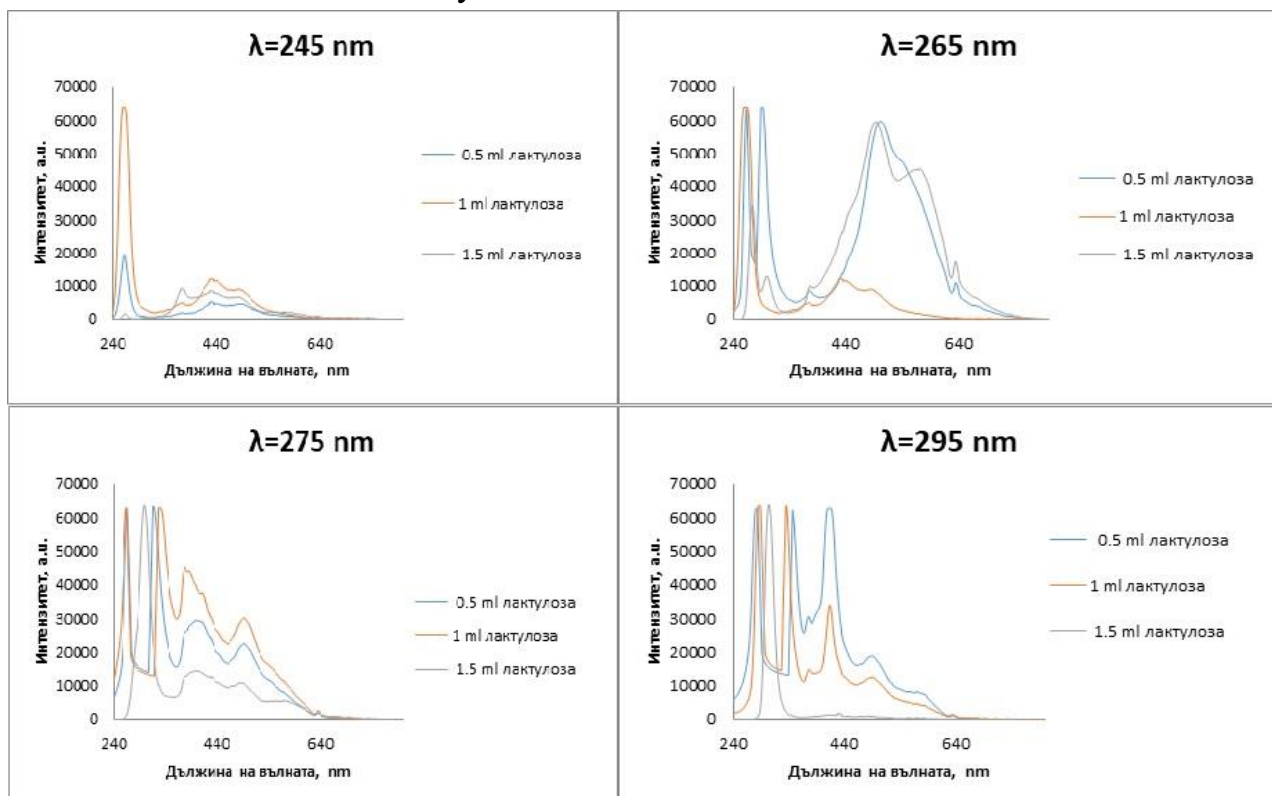
1. Да се получат чрез подходяща технологична схема сокове от червени боровинки (*Vaccinium vitis-idaea*), малини (*Rubus idaeus*) и плодове на дрян (*Cornus mas*) с добавка на инулин (1 g, 2 g и 3g) и лактулоза (0.5 ml, 1 ml и 1.5 ml) и да се снимат флуоресцентните им спектри със средствата на приложната фотоника;
2. Да се определят основни оптични характеристики като цветови параметри в CIE Lab колориметрична система;
3. Да се изследва по няколко метода антиоксидантната активност на образците;
4. Да се създадат корелационни модели между химичния състав и параметрите на приложната фотоника, с цел качествена оценка на антиоксидантния ефект на изследваните сокове.

Получени са флуоресцентните спектри на сокове от червени боровинки с източници на възбуждаща светлина с дължина на вълната съответно 245 nm, 265 nm, 275 nm и 295 nm (Фигура 5). Отношенията между интензитетите на възбуждане/излъчване във флуоресцентните спектри са свързвани в литературата със следните фенолни компоненти и флавоноиди:

- Хлорогенова киселина: (245-250 nm)/ (430-440 nm). Подобни резултати са получени за ябълков сок (Mazina et al., 2015);
- Кафеена киселина – (230-350 nm)/ (405-470 nm) (Alexieva I et al., 2012);
- Ванилова киселина – (295-300 nm)/ (305 -355 nm);
- Танини – (230- 315 nm)/ (345-405 nm). Този максимум се наблюдава, при всички сокове с лактулоза;
- Катехин и епикатехин – (275-280 nm)/ (320 – 335 nm) (Airado-Rodríguez et

al., 2009).

С цел откриване на корелации между параметрите на приложната фотоника и веществата, допринасящи за антиоксидантната активност са получени резултати за общото съдържание на антоцианини, полифенолни съединения и антиоксидантната активност на сокове с добавка на различни концентрации на инулин и лактулоза. Добавката на лактулоза води до по-високо фенолно съдържание, в сравнение с тези с добавен инулин. При нарастването на концентрацията на лактулоза в соковете антиоксидантната им активност намалява. Соковете с инулин имат по-слаба антиоксидантна активност.



Фигура 5. Флуоресцентни спектри за сокове от червени боровинки (*Vaccinium vitis-idaea*) с добавена лактулоза

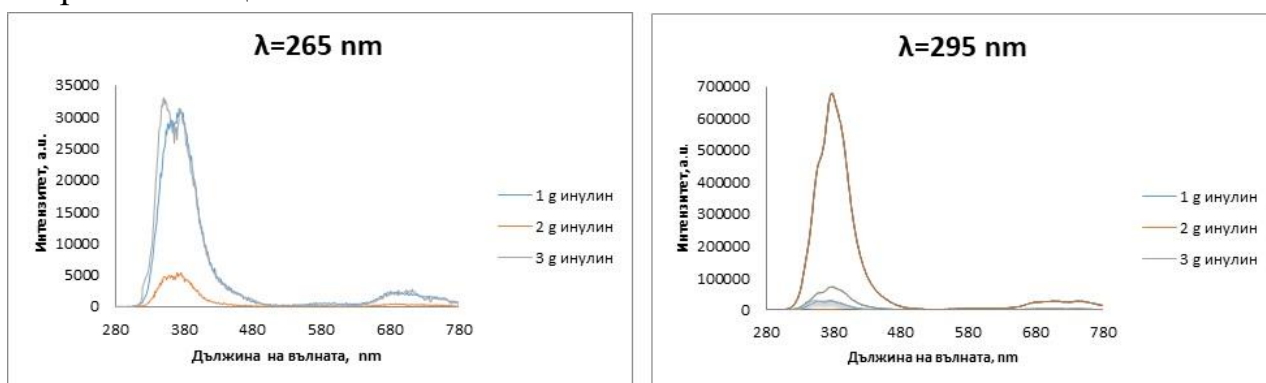
Добавянето на лактулоза води до намаляването на съдържанието на антоцианини, а добавянето на инулин предизвиква слаба промяна. Измерени са цветовете характеристики в CIELab колориметрична система и е проследена кинетиката на цветовете параметри за соковете съответно на първия, петия и десетия ден от приготвянето им. Добавянето на лактулоза променя слабо светлостта на соковете. Светлостта L и стойността на параметъра а нарастват при добавяне на 1 g или 2 g инулин, подобни промени не се наблюдават при соковете с лактулоза. При всички сокове, изготвени от червени боровинки с добавен инулин и лактулоза, независимо от концентрацията се наблюдава нарастване на числените стойности на параметрите светлост и цветност с увеличаване на времето на съхранение и

нарастване на параметъра *a* и редукция на *b* параметъра. Предполага се, че това се дължи на промяна в количеството на антоцианините, защото вероятността от протичането на химична реакция води до нарастване на съдържанието им по време на съхранението.

Като доказателство, че флуоресцентната спектроскопия е усъвършенствана техника за бърз скрининг на сокове от диви горски плодове с лактулоза и инулин са установените линейни зависимости.

При соковете от червени боровинки съществуват зависимости между съотношението на интензитета на флуоресценция и интензитета на възбуждане за дължина на вълната 275 nm и общото фенолно съдържание. Получена е корелация между съдържанието на феноли и антиоксидантната активност.

При възбуждане на соковете от малини (*Rubus idaeus*) с инулин с дължини на вълните на възбуждане 265 nm и 295 nm се наблюдават максимуми на емисия в областите (355-365) nm, (365-375) nm и (680-700) nm (Фигура 6). Пиковите в първите две области се свързват в литературата с наличието на фенолни киселини, като хлорогенова и кафеена киселина, а в последната посочена област се дължи на наличието на хлорофил (Włodarska et al., 2017). Интензивният пик при дължина на вълната на възбуждане 295 nm може да се свърже с антоцианини.



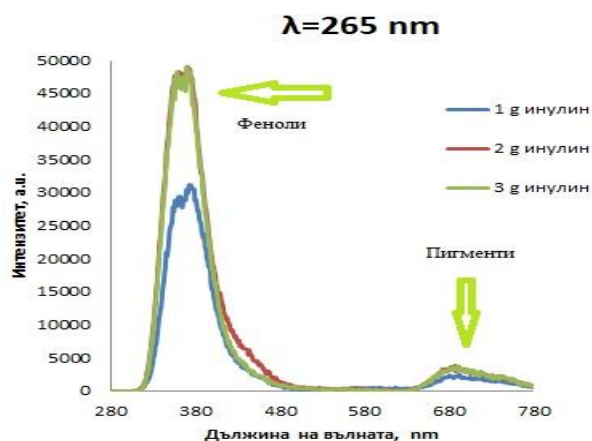
Фигура 6. Флуоресцентни спектри на сокове от малини (*Rubus idaeus*) с добавен инулин

Добавката на лактулоза към малинови сокове почти не променя фенолното им съдържание, но предизвиква намаляването на съдържанието на антоцианини, β -каротин и светлостта. Добавката на инулин води до увеличаване на общото фенолно съдържание, светлостта и β -каротин, като това може да доведе до увеличаване на антиоксидантната активност. Повисоката концентрация на инулин не променя съдържанието на антоцианини. АОА нараства с увеличаване на количеството на инулин и лактулоза в малинови сокове и тази зависимост има много добра линейност за изследваните сокове ($R^2 = 0.98$ за малинови сокове с инулин и $R^2 = 0.99$ за

сокове с лактулоза). При всички 6 проби малинови сокове антиоксидантната активност в система, съдържаща ABTS радикали е по-висока от система с DPPH, като с нарастване на концентрацията на лактулоза в сока антиоксидантната му активност намалява. Не се наблюдава зависимост между концентрацията на инулин и антиоксидантната активност. И в двете системи пробите съдържащи 1 g и 3 g инулин имат подобни антиоксидантни капацитети и съответно V-50 стойности. Най-висока антиоксидантна активност демонстрира пробата с добавени 2 g инулин.

Съществуват линейни зависимости между общото фенолно съдържание и отношението между интензитета на излъчване и интензитета на възбуждане за дължина на вълната на възбуждане 265 nm, между антоцианините и отношението между интензитета на излъчване и интензитета на възбуждане за дължина на вълната на възбуждане 295 nm. Връзки се наблюдават между светлостта и антоцианините, β -каротина и цветови параметри.

Спектрите на флуоресценция на сокове от дренки (*Cornus mas*) са получени за възбуждаща светлина с дължини на вълните 265 nm и 295 nm. Очевидно е, че има три основни флуоресцентни пика от фигура 7. Пиковите в интервалите (355-365) nm и (365-380) nm са свързани с фенолно съдържание, пикът при около (680-700) nm съответства на различни пигменти (Włodarska et al., 2017).



Фигура 7. Флуоресцентен спектър на дрянков сок с инулин при $\lambda=265 \text{ nm}$

Най-високо фенолно съдържание е установено за сока с добавка на 1 g инулин (286.4 mg GAE/100ml), последван от сока с добавка на 1 ml лактулоза, а по отношение на съдържанието на антоцианини най-високата му стойност е измерена за сока с добавка на 1 ml лактулоза. Добавката на инулин в соковете не води до значително намаляване на светлостта L и цветовите характеристики a и b, докато добавката на лактулоза предизвиква намаляването на светлостта и увеличаване на цветовите характеристики a и b.

Антиоксидантната активност е измерена по DPPH и FRAP методи. При увеличаване на концентрацията на лактулоза в соковете, антиоксидантната активност измерена по DPPH метода нараства, а тази по FRAP метода има приблизително еднаква стойност. С увеличаване на добавката на инулин антиоксидантната активност, определена по DPPH метода намалява.

Намерени са линейни зависимости между общото фенолно съдържание и отношението между интензитета на излъчване и интензитета на възбуждане, между светлостта и общото съдържание на антоцианини и между съдържанието на β -каротин и цветовия параметър а. Има добра корелация между общото съдържание на антоцианини и антиоксидантната активност, определена чрез DPPH метод.

От направените изследвания можем да заключим, че флуоресцентната спектроскопия дава възможност за качествено откриване на фенолни компоненти в сокове от горски плодове с добавка на естествени полизахариди. Методът представлява усъвършенствана техника за бърз скрининг на сокове от лечебни растения, даваща добра корелация между антиоксидантната активност, пълно фенолно съдържание, антоцианини и отношението на интензитета на флуоресценция и интензитета на възбуждане за дължина на вълната 275 nm и 295 nm.

ЧЕТВЪРТА ГЛАВА

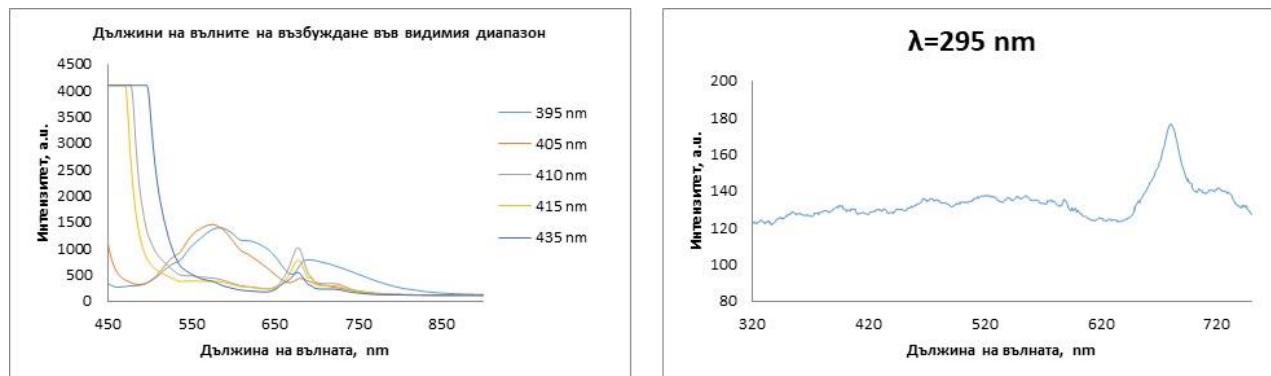
АНАЛИЗ НА МАСЛА ОТ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ ЧРЕЗ МЕТОДИТЕ НА ПРИЛОЖНАТА ФОТОНИКА

Цел на изследванията в четвърта глава е разработването на качествена методика, даваща връзка между параметрите на приложната фотоника (оптични свойства) и съдържанието на съединения с антиоксидантен ефект в растителни масла от лечебни растения.

Така формулираната цел поставя за решаване следните задачи:

1. Получаване на флуоресцентни спектри на масла от лечебни растения във видимия и ултравиолетовия диапазон;
2. Изследвания на мастно-киселинен и токоферолен състав чрез газхроматография и HPLC;
3. Оценка на елементния състав чрез ICP-MS спектрометрия.

Изследвано е масло, смес от семената на три билки- *Sambucus ebulus*, *Coriandrum sativum* L. и *Silybum marianum* L. Флуоресцентните спектри са получени във видимия и ултравиолетов диапазон при дължини на вълните на възбуждащата светлина съответно 295 nm, 395 nm, 405 nm, 415 nm и 435 nm и са представени на фигура 8. Те дават възможност за разработка на методи за качествено определяне на антиоксидантния капацитет на образците чрез откриване на корелации между интензитета на флуоресцентния пик и съдържанието на съединения с антиоксидантни свойства. Възбуждането на образца в УВ-диапазона при $\lambda_{ex}=295$ nm води до флуоресцентен пик при 380 nm, свързан с общото съдържание на токофероли, отговорни за антиоксидантната активност на маслото (Фигура 8). Най-ефективно е възбуждането на пробата при дължина на светлинната вълна 395 nm.



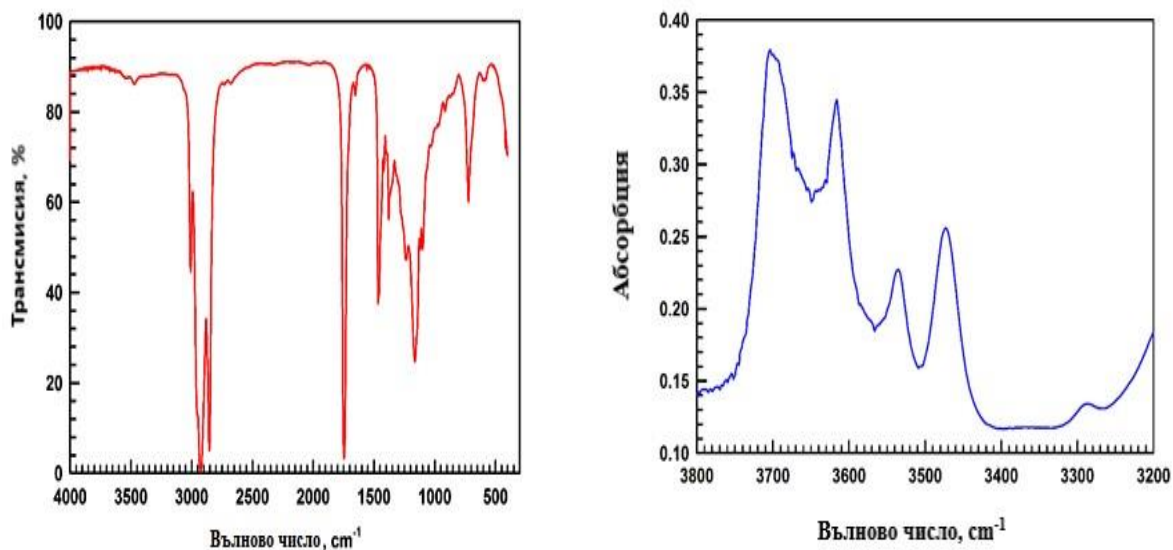
Фигура 8. Флуоресцентни спектри в ултравиолетовия и видимия диапазон за масло от *Sambucus ebulus*, *Coriandrum sativum* L. и *Silybum marianum* L.

Наблюдават се два флуоресцентни максимума:

- В областта (500 -650) nm, свързан с продуктите при окисление;
- При 680 nm, свързан с хлорофилно съдържание.

Оптичните свойства на полученото масло от *Sambucus ebulus*, *Coriandrum sativum* L. и *Silybum marianum* L. са сравнени с тези на масло от бъзак (*Sambucus ebulus*) и от кориандър (*Coriandrum sativum* L.). При възбуждане с дължина на вълната 295 nm всички образци показват пик в интервала (670-680) nm, дължащ се на хлорофила. Само образецът от кориандър (*Coriandrum sativum* L.) притежава максимум около 345 nm, свързан с наличието на α -токофероли. Направеният химичен анализ показва, че съдържа α -токофероли 75.7 %, докато пробата смес от три масла съдържа 55.9 %. При възбуждане на пробите във видимия диапазон се наблюдава максимум на емисия около 590 nm, дължащ се на окислителни продукти. С най-интензивен максимум на излъчване при дължина на светлинната вълна на възбуждане 395 nm се характеризира маслото от кориандър (*Coriandrum sativum* L.), а с най-слаб за пробата смес от три масла. Химичният анализ показва, че маслото от кориандър (*Coriandrum sativum* L.) притежава сравнително ниска окислителна стабилност около 8.18 h, докато маслото от бъзак (*Sambucus ebulus*) притежава висока оксидантна стабилност около 12.7 h.

Инфрачервеният спектър на изследваното масло е представен на фигура 9. Характерните пикове от този спектър се свързват с C=O трептения на карбонилната група в състава на карбоксилната група на мастните киселини и продукти на окисление, които присъстват в малки количества. Чрез изследване на FTIR спектъра на разрежена (1% CCl₄) маслена проба в кварцова кювета се получава информация за киселинното число на маслената проба. Разреждането на маслото позволява наблюдението на трептенето на O-H връзката в карбоксилната група, обертон на разтягане на CO, разтягаща вибрация на OH групата и ивица на O-H връзката в свободните киселини.



Фигура 9. ИЧ спектри в режим на трансмисия и абсорбция на изследваната маслена проба

За пълното охарактеризиране на физичните параметри на изследването за първи път при трите изследвани масла е проведена диференциална сканираща калориметрия. На термограмата за маслото смес от *Sambucus ebulus*, *Coriandrum sativum* L. и *Silybum marianum* L. се наблюдават три ендотермични пика, които могат да се отдадат на топенето. Най-ниско температурният пик има температура $-26.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ и може да бъде свързана с голямото количество полиненаситени триглицериди, получени от линолова киселина. Вероятно се дължи на линалола, алкохол с температура на топене под $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Маслото от кориандър съдържа 60-80% линалол. Два други прехода на топене са разпознати - при $9,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ и при $24,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Енталпиите на тези пикове обаче са по-малко от 30% от общата енталпия на маслото. Това масло може да се съхранява в хладилник, понеже не се очаква да кристализира частично. Два нискотемпературни пика за масло от кориандър (*Coriandrum sativum* L.) могат да бъдат свързани с голямото количество полиненаситени триацилглицероли, получени от линолова киселина. Вероятно се дължи на линалола.

Масно-киселинният състав на маслата е основен индикатор за тяхната окислителна стабилност при съхранение и преработка в организма. Той е параметър, чието познаване е един от основните фактори, показващи наличието или отсъствието на фалшификати в продукта. Преобладаващо съдържание при маслото от семена на *Sambucus ebulus*, *Coriandrum sativum* L. и *Silybum marianum* L. има олеиновата киселина, следвана от линолова и палмитинова киселини.

Маслото има киселинно число по-високо от това на масло от *Silybum marianum* L.-1.2 (mg KOH/g oil), но два пъти по-ниско от това на маслото от *Coriandrum*

sativum L.-8.16 (mg KOH/g oil). То има добра окислителна стабилност 12.7 h, която е по-висока от тази на слънчогледово масло.

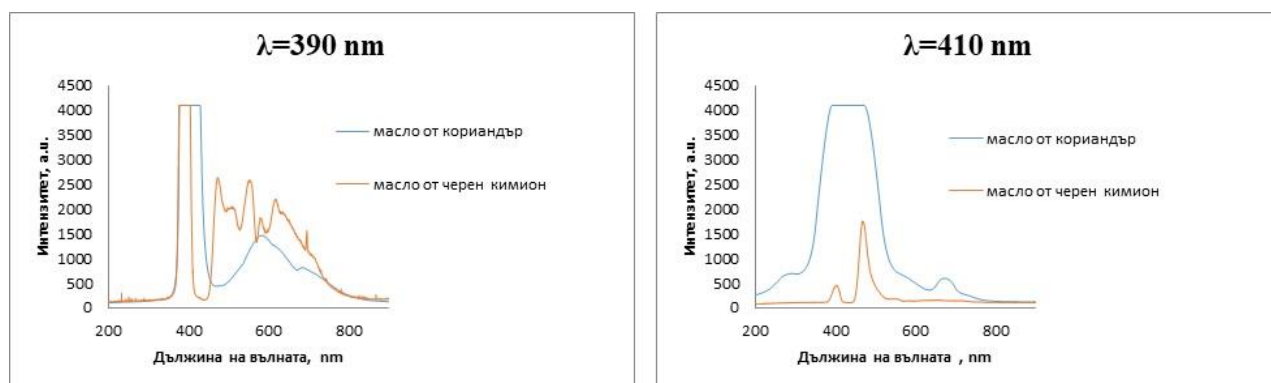
Установено е, че общото съдържание на стероли в маслото е 0,46 %. Преобладава β -Ситостеролът (58,4 %). Съдържанието е по-малко, в сравнение с маслото от чия от Аржентина или Перу (Uzunova et al., 2016).

В образеца преобладава α -токоферолът- 55,9 %, последван от γ -токоферолът.

Определено е съдържанието на някои токсични и основни елементи и е доказано, че съдържанието на Cd, As, Se, Zn, Co и Mo е по-малко от $0,005 \mu\text{g g}^{-1}$, елементите Mg ($8,07 \mu\text{g g}^{-1}$) и K ($5,90 \mu\text{g g}^{-1}$) са с най-високо съдържание. Cr = $0,45 \mu\text{g g}^{-1}$, Mn = $0,23 \mu\text{g g}^{-1}$. Открити са следи от Pb = $0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ и Ni = $0,03 \mu\text{g g}^{-1}$. Маслото е подходящо за приложение в козметиката и фармацията, тъй като не съдържа токсични елементи.

Екстрахирани са масла от семена на черен кимион (*Nigella sativa*) и кориандър (*Coriandrum sativum* L.) и са сравнени техните свойства.

Флуоресцентните спектри на двете изследвани масла са получени за две дължини на вълните от видимия диапазон на възбуждащата светлина 390 nm и 410 nm и емисионните ивици между 400 и 490 nm се свързват с токофероли, токохроманоли, диени, триени, продукти на окисляване и хидролиза на мастни киселини, а емисионните максимуми с висок интензитет около 600 и 720 nm се свързват с пигментите от групата на хлорофила.



Фигура 10. Флуоресцентни спектри за масла, извлечени от семена на (*Nigella sativa*) и (*Coriandrum sativum* L.) във видимия диапазон

Сигналите в ИЧ спектри на изследваните масла се свързват с: вибрация на връзката C–H от метиленова група, карбонилна функционална група, вибрации на алифатните групи CH₂ и CH₃, трептения на C–O връзката и абсорбцията на нитрилната група в кимиона нитрил.

Диференциалният сканиращ калориметричен профил на маслото от черен кимион (*Nigella sativa*) е близък до маслото, приготвено от тунизийски сортове.

Наличието на два различни пика може да се дължи на по-стабилна полиморфна форма или на присъствието на високо топящи се триацилглицероли.

И при двете изследвани масла от черен кимион (*Nigella sativa*) и кориандър (*Coriandrum sativum* L.) най-голямо е съдържанието на линолова и олеинова киселини от групата на ненаситените мастни киселини, а от наситените мастни киселини е палмитиновата.

В таблица 1 са представени резултатите за физичните и химичните свойства на изследваните масла.

Таблица 1. Физични и химични свойства на маслата от семена на черен кимион (*Nigella sativa*) и кориандър (*Coriandrum sativum* L.)

Физични и химични свойства	Масло от черен кимион (<i>Nigella sativa</i>)	Масло от кориандър (<i>Coriandrum sativum</i> L.)
Пероксидно число (meqO ₂ /kg oil)	28	27.5
Киселинно число (mg KOH/g oil)	4.6	4.57
Показател на пречупване	1.4716	1.4673
Окислителна стабилност (h)	12	8.18

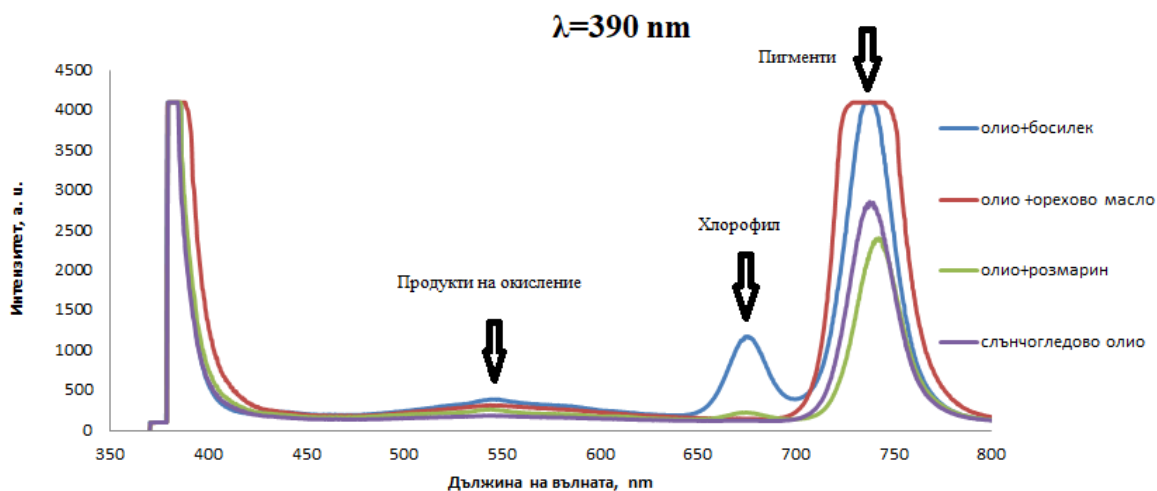
За маслото, извлечено от черен кимион с разтворител преобладаващо е присъствието на β -ситостерол, стигмастерол и кампестерол. В маслото от кориандър най-високи стойности са отчетени за β -ситостерол и Δ^5 -аванастерол. За маслото от кориандър съдържанието на α -токофероли е най-високо, последвано от това на γ -токофероли. В маслото от черен кимион съдържанието на γ - и β -токоферол е приблизително еднакво.

Двете изследвани масла показват много ниски концентрации на токсични елементи - Pb-0.04 mg kg⁻¹, As и Cd <0.005 mg kg⁻¹. Относно повечето изследвани елементи двете масла имат сравнима концентрация. Само относно K и Mg маслото от кориандър е около 4 и 7 пъти по-богато от това на черен кимион. Безопасни са за консумация като хранителни добавки, а и като съставки на различни козметични продукти.

Изследвано е студено пресовано високоолеиново слънчогледово олио "Sunfluro", както и пресовано високоолеиново слънчогледово олио "Sunfluro" с

добавка на розмарин (*Rosmarinus officinalis*), босилек (*Ocimum basilicum*) и орехово масло, предоставени от “Pliska oil”. Маслата са в срок на годност към датата на провеждане на изследванията.

Получени са флуоресцентни спектри ($\lambda_{ex} = 390 \text{ nm}$) и са представени на фигура 11.

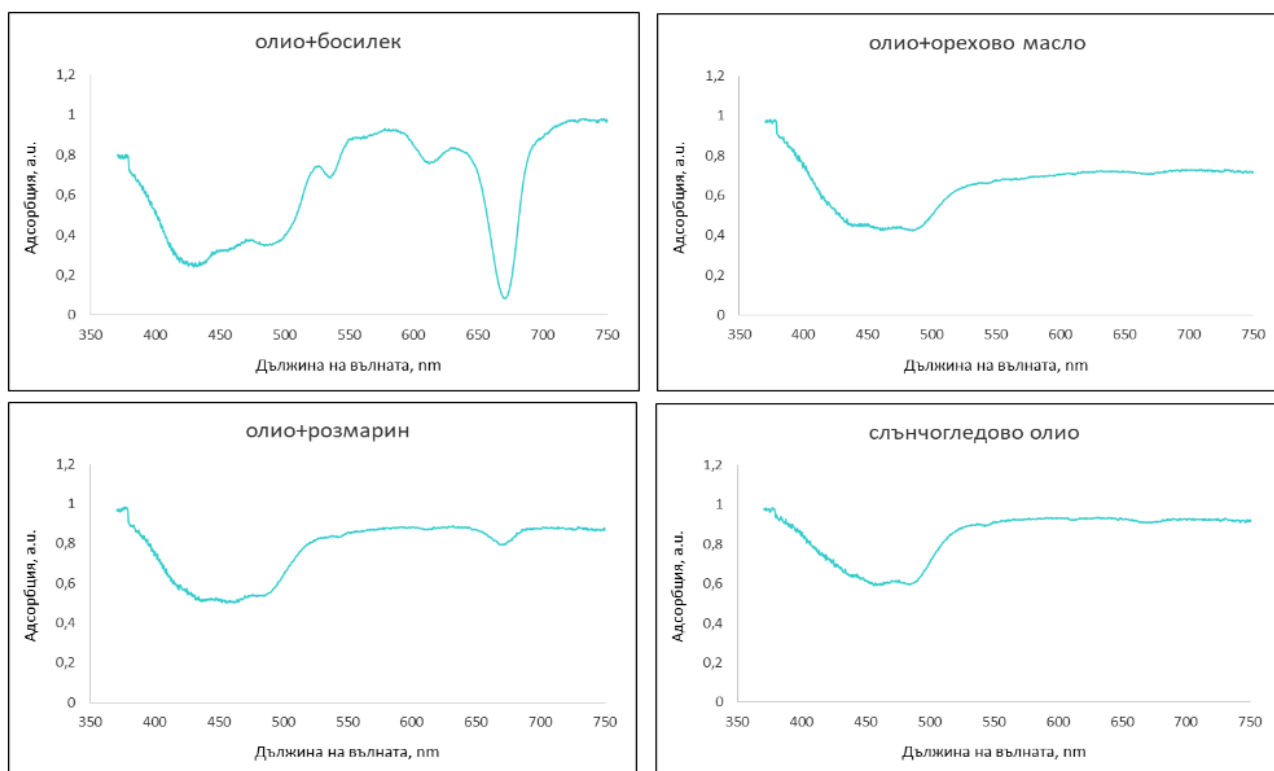


Фигура 11. Флуоресцентни спектри за възбуждаща дължина на вълната

390 nm за слънчогледово олио с добавка на билки или орехово масло

Добавянето на розмарин (*Rosmarinus officinalis*) или босилек (*Ocimum basilicum*) води до увеличаване на съдържанието на хлорофил и до наблюдаване на флуоресцентен максимум около 683 nm. Последният е ясно изразен и интензивен за пробата с босилек (*Ocimum basilicum*), а доста по-слаб е за образеца с розмарин (*Rosmarinus officinalis*). Всички образци показват флуоресцентен максимум около 741 nm и 746 nm, който се дължи на пигменти, различни от хлорофила. Маслата с високо съдържание на β -каротин проявяват пик на флуоресценция около 555 nm, дължащ се на нарастването на първичните и вторични продукти на окислението.

Добавянето на орехово масло към студено пресованото слънчогледово олио променя слабо коефициента му на адсорбция, но запазва положението и формата на пика на поглъщане – в областта от 400 nm до 500 nm. Образците с босилек (*Ocimum basilicum*) или розмарин (*Rosmarinus officinalis*) имат ясно изразен пик на поглъщане около 670 nm. Той е силно интензивен в пробата с босилек (*Ocimum basilicum*) и доста по-слаб в образеца с розмарин (*Rosmarinus officinalis*). Олиото с босилек (*Ocimum basilicum*) притежава и други две ивици на поглъщане с център около 534 nm и 614 nm, вероятно дължащи се на високото количество на β -каротин в пробата и наличието на други пигменти, различни от хлорофил.



Фигура 12. Адсорбционни спектри на студено пресовано слънчогледово олио с добавка на билки или орехово масло

Изследван е съставът на мастни киселини и е установено, че добавянето на босилек (*Ocimum basilicum*) или розмарин (*Rosmarinus officinalis*) към слънчогледовото масло намалява процентното съдържание на наситените и мононенаситените мастни киселини и увеличава съдържанието на полиненаситените мастни киселини. За разлика от билковите добавки при добавяне на орехово масло се увеличават наситените мастни киселини и полиненаситените киселини, а намалява съдържанието на мононенаситените такива.

Анализът на физико-химичните показатели е представен на таблица 2. Добавката на розмарин (*Rosmarinus officinalis*) и босилек (*Ocimum basilicum*) увеличава съществено хлорофилното съдържание и това на β -каротин. По относителна плътност и йодно число контролата и пробите с добавки не се различават съществено. Получените резултати за пероксидно число и оксидантна стабилност позволяват да се направи предположение, че съществуват реални предпоставки за протичане на по-активни окислителни процеси в слънчогледовото масло с примеси от розмарин (*Rosmarinus officinalis*) и орехово масло. Стойностите на окислителната стабилност на изследваните масла, обуславят необходимостта да се използват стабилизатори при включването на растителни масла в дресинги, сосове и други.

**Таблица 2. Физико-химични показатели на слънчогледово олио с
добавки на билки или орехово масло**

Показател \ Масло	Олио+ босилек (<i>Ocimum basilicum</i>)	Олио+ орехово масло	Олио+ розмарин (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Олио - контрола
Осапунително число, mg KOH/g	164,13	161,72	167,5	157,02
Пероксидно число, meq O ₂ /kg	7,95	4,17	3,68	5,05
Йодно число, gJ/100g	103,61	108.8	102,3	101,1
Отн. плътност, при 20 °C	0,9142	0,9101	0,91	0.9134
Оксидантна стабилност, h	20	16,1	17,9	22
β-каротин, ppm	1210, 69	110.09	136.55	90,67
Хлорофил, ppm	394.45	0.741	10.83	0,235

От направените изследвания се вижда, че приложната фотоника може да бъде използвана като бърз и качествен метод за оценка на токоферолно съдържание, количество на хлорофил и β-каротин, оксидантна стабилност на студено пресовани масла с възможност за включването им в състава на различни хранителни добавки. Доказана е и приложимостта ѝ за оценка промяната на характеристиките на високоолеиново слънчогледово масло при добавка на лечебни растения като розмарин и босилек като за целта са извършени редица химически анализи като референтни количествени методи.

ПЕТА ГЛАВА

АНАЛИЗ НА ВОДНИ И ЕТАНОЛНИ ЕКСТРАКТИ ОТ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ С ПОМОЩТА НА ПРИЛОЖНАТА ФОТОНИКА

В настоящата глава са представени основните приложения на флуоресценцията за определяне на състава на морски (*Rhodophyta*, *Ulva intestinalis* и *Phaeophyceae*) и сладководни водорасли (*Spirulina* и *Chlorella*), покривен дебелец *Sempervivum tectorum* L. и дървесен сироп.

Целта на пета глава е да се установят връзки между химичен състав и параметри на приложната фотоника за водни или водно-алкохолни екстракти от *Sempervivum tectorum* L., от сладководни (*Spirulina* и *Chlorella*) водорасли и за натурален дървесен сироп.

За изпълнение на целта са поставени следните задачи:

1. Получаване на флуоресцентните спектри на инфузи от сладководни (*Spirulina* и *Chlorella*) водорасли, водно-алкохолни екстракти от покривен дебелец *Sempervivum tectorum* L. и натурален дървесен сироп;
2. Да се определят антиоксидантната активност и други химични параметри на проби от водорасли (*Rhodophyta*, *Ulva intestinalis*, *Phaeophyceae*, *Spirulina* и *Chlorella*) и дървесен сироп;
3. Оценка на елементния състав на проби от *Sempervivum tectorum* L.;
4. Определяне на цветовете характеристики на водно-алкохолни екстракти от покривен дебелец *Sempervivum tectorum* L. и инфузи от *Spirulina* и *Chlorella*;
5. Да се оцени съдържанието на въглехидрати в състава на дървесния сироп;
6. Да се търсят корелации между цветовете характеристики, интензитет на флуоресцентните емисионни максимуми при водно-алкохолните екстракти от *Sempervivum tectorum* L.

В пета глава са определени общото полифенолно съдържание, както и антиоксидантната активност на лиофилизирани морски и сладководни водорасли с цел съпоставка на антиоксидантния им капацитет. Сравнението се налага от факта, че обект на изследване в дисертацията са сладководни водорасли, отглеждани в биореактор, за чиито оптични свойства и химичен състав в литературата съществуват оскъдни данни. Общото съдържание на полифеноли, както и антиоксидантната активност на изследваните типове водорасли са представени в таблица 3. С най-висока антиоксидантна активност и общо полифенолно съдържание са кафявите водорасли *Phaeophyceae*.

Таблица 3. Полифенолно съдържание и антиоксидантна активност на различни типове водорасли

Вид	Общо фенолно съдържание, mg/100g±SD	ORAC, $\mu\text{mol TE/g}\pm\text{SD}$	HORAC, $\mu\text{mol GAE/g}\pm\text{SD}$
<i>Spirulina 1</i>	419.7±12.2	86.0±5.1	15.4±0.4
<i>Ulva intestinalis</i>	512.8±23.5	101.0±5.3	17.5±0.5
<i>Rhodophyta</i>	403.9±16.4	129.6±8.6	30.6±2.3
<i>Phaeophyceae</i>	2662.4±54.2	463.3±25.6	113.4±2.7
<i>Spirulina 2</i>	410.7±16.5	87.2±4.3	14.2±1.2
<i>Chlorella</i>	267.7±8.3	51.2±4.1	10.9±1.1

За всички водорасли антиоксидантната активност, определена по метода ORAC е от 4 до 5 пъти по-висока от тази, определена по HORAC.

Няма съществени различия в антиоксидантната активност, определена по методите ORAC и HORAC, за *Spirulina 1*, изсушена по класически начин чрез принудително подаване на въздух при 45⁰С и *Spirulina 2* чрез лиофилизация. С най-ниско полифенолно съдържание и антиоксидантна активност се оказва *Chlorella*. Антиоксидантната активност по метода ORAC на *Spirulina*, сушена и по двата метода, е по-висока ($87.2 \pm 4.3 \mu\text{mol TE} / \text{g}$ екстракт или $86.0 \pm 5.1 \mu\text{mol TE} / \text{g}$ екстракт) от *Chlorella* ($51.2 \pm 4.1 \mu\text{mol TE} / \text{g}$ екстракт).

Резултатите от анализа на HORAC също показват подобна тенденция като анализа ORAC ($14.2 \pm 1.2 \mu\text{mol GAE} / \text{g}$ екстракт от *Spirulina*, срещу $10.9 \pm 1.1 \mu\text{mol GAE} / \text{g}$ екстракт от *Chlorella*).

При направено изследване се установи, че водораслите са богати на полифенолни съединения, антиоксиданти и флавоноиди. Най-богати на кверцетин, флавоноиди, катехин и епикатехин са кафявите водорасли *Phaeophyceae*. Те не съдържат мирицетин и нарингин. В *Chlorella* има по-голямо съдържание на нарингинин и камферол в сравнение с *Ulva intestinalis* и *Rhodophyta*. *Spirulina*, сушена чрез лиофилизация притежава повече флавоноиди в сравнение със *Spirulina*, изсушена по класическия начин.

Количеството на хлорогеновата киселина е най- високо в *Spirulina*, изсушена чрез лиофилизация – 31.13 mg/100g и най-ниско в *Rhodophyta* 4.94 mg/100g.

Ваниловата киселина е с най-високи стойности в *Phaeophyceae* – 14.73 mg/100g, като в останалите образци на водорасли е два пъти по-малко. От направеният анализ на данните става ясно, че водораслите съдържат големи количества полифенолни киселини и с това може да се обясни високата им антиоксидантна активност.

Флуоресцентните спектри, получени чрез възбуждане с ултравиолетова светлина са представени на фигура 13. Установено бе, че хидромодулът не влияе на дължината на вълната на емисия и максимумът на интензитета на излъчване. Различни интензитети на емисия се наблюдават единствено при различните типове водорасли *Spirulina* и *Chlorella* със съдържание на бг в инфуза. Този факт може да бъде обяснен с малката разлика в съдържанието на флаваноли и фенолни киселини в екстрактите директно от водораслите с органичен разтворител. Във вода съдържанието им би било още по-малко.

Приложната фотоника дава връзка между оптичните и химичните свойства на пробата, което е възможност за нейното качествено изследване. Бяха направени редица опити за възбуждане на инфузите, докато се установи, че най-добро съотношение между интензитета на емисия и интензитета на възбуждане се наблюдава при дължина на вълната на възбуждащата светлина 290 nm.

От фигура 13 се различават няколко ясно изразени пика при инфузи на водорасли, отглеждани в български биореактор:

- ✓ $\lambda_{em}=330$ nm, свързан с наличието на ванилова киселина (Mazina et al., 2015);
- ✓ $\lambda_{em}=425$ nm, наблюдаван поради съдържание на р-кумаринова киселина (Mazina et al., 2015);
- ✓ $\lambda_{em}=490$ nm, отразява присъствието на хлорогенова киселина в пробата (Mazina et al., 2015);
- ✓ $\lambda_{em}=(650-670)$ nm – има връзка с наличието на пигменти от типа на хлорофила (Sikorska et al., 2005).

Флуоресцентните пикове на излъчване могат да се използват за експресно качествено определяне на наличието на дадена компонента в изследваната проба. От фигура 13 се вижда, че само инфуза от *Spirulina* притежава емисионен пик около 490 nm. При сравнение на резултатите, получени за фенолните киселини се вижда, че *Chlorella* не съдържа хлорогенова киселина. Почти равните относителни интензитети на пиковете около 425 nm могат да бъдат обяснени с почти равното съдържание в двата типа водорасли на р-кумаринова киселина.



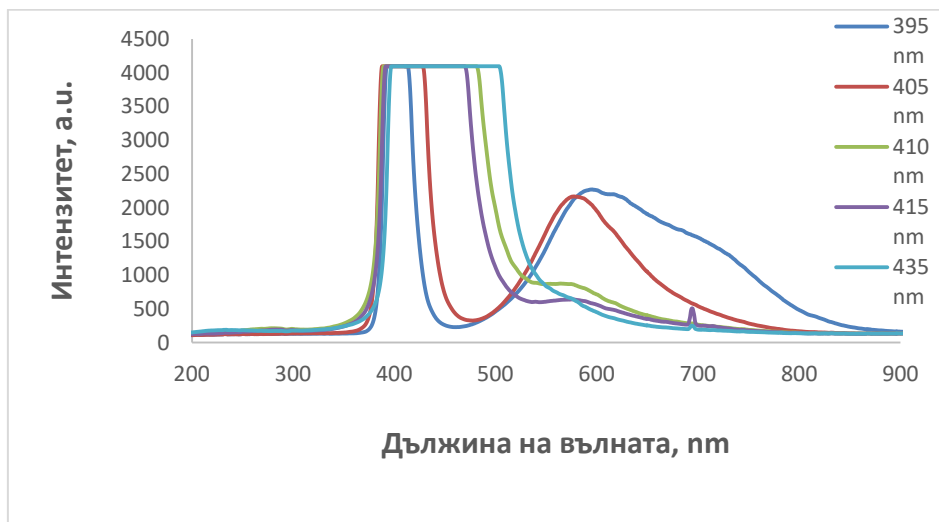
Фигура 13. Флуоресцентни спектри на инфузи от *Spirulina* и *Chlorella* при възбуждаща светлина с дължина на вълната 290 nm

Приготвени са водни инфузи без варене от *Spirulina* и *Chlorella* със съдържание на сухата маса съответно 3 g и 6 g, получени чрез лиофилизация и са снети колориметричните им характеристики. Във всички образци преобладават зелената и синята компонента- цветовете параметри a и b са отрицателни. При образците от *Spirulina* цветовата координата b е почти константа в рамките на грешката. Докато при пробите от *Chlorella* с увеличаване на концентрацията на сухата маса се засилва наличието на зелената компонента a и намалява синята компонента b по абсолютна стойност. В инфузите преобладава съдържанието на хлорофил b. С увеличаване на масата на водораслото в инфуза светлостта нараства при *Chlorella* и намалява незначително при *Spirulina*. Водните екстракти без варене от *Spirulina* са с двойно по-голяма светлост от тези на *Chlorella*. Те са изключително полезни, тъй като са богати на хлорофил. Последният е мощен биостимулатор с пречистващ и регенериращ ефект. За инфузите от *Spirulina* и *Chlorella* съответно с 3 и 6 грама сухо вещество в 100 мл вода е получена АОА по методите АВТС и DPPH. Най-висока АОА притежават инфузите от *Chlorella* при време на екстракция 20 минути и хидромодул 3 g на 100 ml по АВТС метода.

В пета глава за първи път е изследван палмово-кленов сироп. В литературата има проведени изследвания за определяне на цветови характеристики на

палмов сироп, но не са известни публикации, в които качествено да са определени биологично активни вещества с помощта на флуоресцентна спектроскопия.

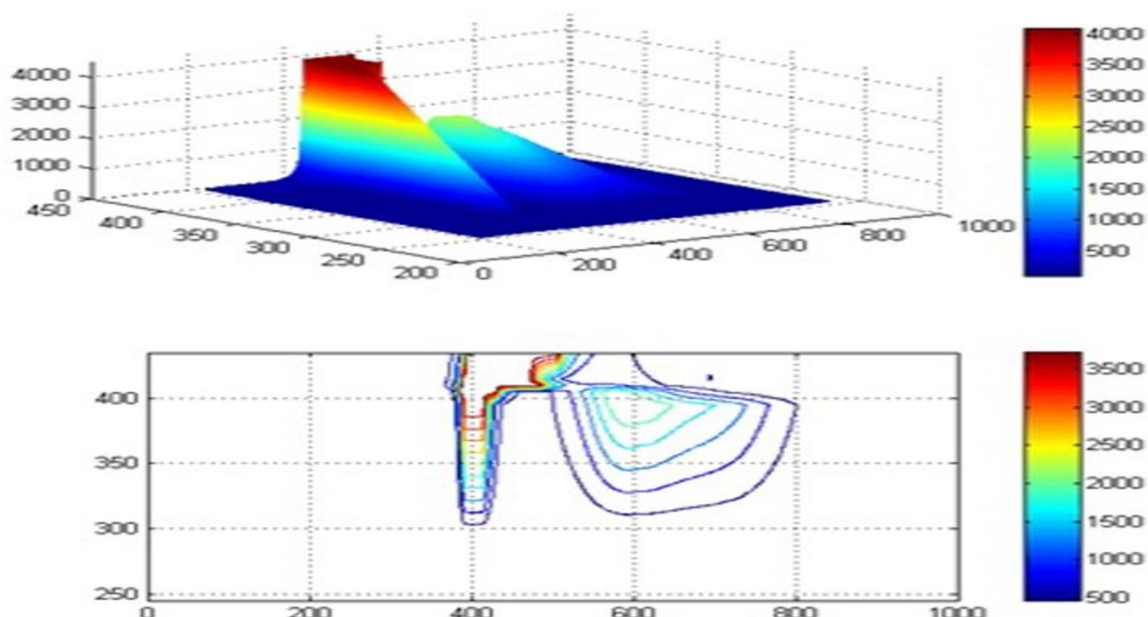
Определени са флуоресцентните спектри чрез облъчване на пробата с УВ и видима светлина. При възбуждането ѝ с УВ лъчение се наблюдава слаб пик на излъчване при 280 nm. Един от възможните източници на този флуоресцентен сигнал са фенолни съединения. Във видимата област са получени два флуоресцентни пика.



Фигура 14. Флуоресцентни спектри във видимият диапазон на дървесен сироп

Първият пик на излъчване се наблюдава около 550 nm-580 nm когато пробата се облъчва с възбуждаща светлина с дължини на вълната в диапазона от 340 до 410 nm. Този пик може да се свърже с наличието на рибофлавин. Вторият флуоресцентен максимум е около 690 nm и се свързва с пигменти, подобни на хлорофила. Наблюдава се само при дължина на вълната на възбуждане 415 nm.

От получените спектри може да се заключи, че дървесният сироп съдържа рибофлавин, малко количество пигменти и фенолни съединения. Получените спектри в УВ област не са представени поради наличието на шумове. Но те са използвани за определяне на пръстови отпечатьци на сироп (фиг. 15.).



Фигура 15. Възбудно-излъчвателни матрици и контурна карта за натурален дървесен сироп

В таблица 4 е представено съдържанието на биологично активни вещества и антиоксидантната активност.

Таблица 4. Общи феноли, флавоноиди и антиоксидантна активност на дървесен сироп

Общо фенолно съдържание, mg GAE/ml	Общи флавоноиди, mg QE/ml	Антиоксидантна активност, mM TE/ml	
		DPPH	FRAP
1,97±0,23	0,27±0,08	19,61±0,24	24,99±0,85

Измерено е високо съдържанието на полифеноли и ниско съдържание на флавоноиди в сиропа. Стойностите на антиоксидантната активност, измерени чрез FRAP анализа са по-високи, в сравнение с DPPH анализа. Това свидетелства, че антиоксидантната активност се дължи главно на фенолни съединения, които активират механизъм на единично електронно преместване.

Изследваният сироп съдържа значително количество разтворими въглехидрати. Пробата е богата на моно- и дизахариди. Анализ с високоефективна течна хроматография с детектор на показателя на пречупване разкрива наличието само на захароза, глюкоза и фруктоза като отделни захари в тази проба. Освен това стойностите на захарозата (38,57 g/100 ml) значително доминират над монозахарида. Фруктозата е с по-ниски стойности в сравнение с други захари.

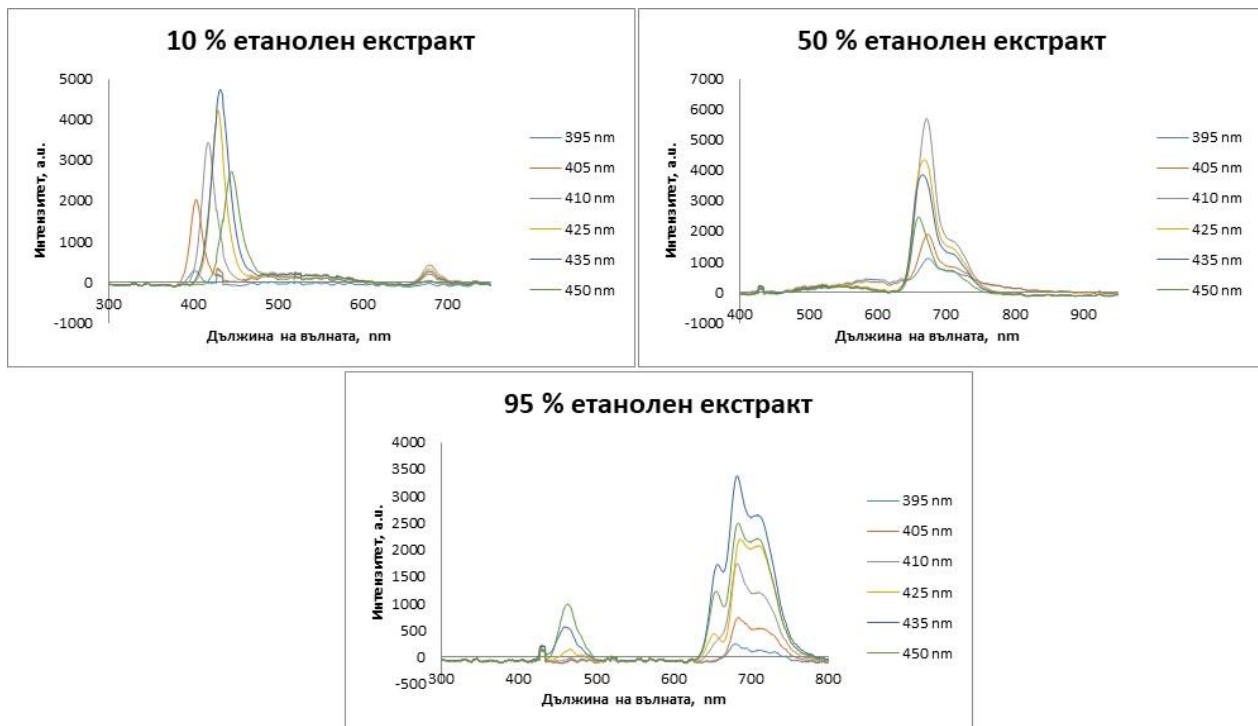
Следователно натуралният дървесен сироп е оценен като естествен източник на енергия, поради високото съдържание на захароза в него.

Съществуват зависимости между параметрите на приложната фотоника и общото фенолно съдържание, също така между общото фенолно съдържание и антиоксидантната активност. Оптичните свойства като абсорбция и флуоресценция може да се използват за качествено определяне на пигменти и някои витамини в сиропа.

Sempervivum tectorum L. е билка с многобройни приложения в народната медицина, но поради липсата на системни изследвания остава слабо позната за науката по отношение на химичният ѝ състав и оптичните ѝ свойства.

Получени са флуоресцентните спектри на етанолни екстракти от *Sempervivum tectorum* L. с възбуждаща светлина с дължини на вълните 395 nm, 405 nm, 410 nm, 425, nm, 435 nm и 450 nm. Резултатите са предствани на фигура 16.

Флуоресцентните спектри на 50% и 95% етанолни екстракти от покривен дебелец *Sempervivum tectorum* L. са подобни. Те имат два флуоресцентни максимума – първият в областта 430-580 nm, вторият в областта 675-690 nm. Първият пик се дължи на присъствието на различни групи антиоксиданти, вторият е свързан с наличието на хлорофил. Този, свързан с хлорофила, е ясно изразен за 50% етанолен екстракт и е много интензивен. Докато пикът, свързан със съединения с антиоксидантен ефект е слабо изразен при 50% етанолен екстракт и много добре изразен при 95% екстракт. Има два допълнителни максимума във флуоресцентния спектър на 95% етанолен екстракт при дължина на вълната на възбуждане 425 nm и 450 nm. Те се свързват с присъствието на пигменти, различни от хлорофила. Има един пик около 860 nm при 10% екстракт, дължащ се на хлорофил. Основните съединения, свързани с антиоксидантния ефект на екстрактите от покривен дебелец *Sempervivum tectorum* L. могат да корелират и със спектрите на поглъщане или пропускане на образците. Ивицата на поглъщане между 630 nm и 690 nm не се наблюдава при 10% етанолен екстракт от покривен дебелец, тъй като той не съдържа хлорофил. Тези екстракти показват най-силно пропускане във видимия диапазон от около 60%-70%. Интензивна ивица на поглъщане във видимия диапазон се наблюдават при 50% и 95% водно-алкохолни екстракти. По-ясно изразена е тя при по-високото съдържание на етанол.



Фигура 16. Двумерни флуоресцентни спектри във видимата област за етанолни екстракти от *Sempervivum tectorum* L.

С нарастване на етанолното съдържание количеството на β -каротин нараства. Хлорофил съществува в 50% и 95% етанолни екстракти, но липсва в 10% екстракт. Следователно за лечение на рани са подходящи екстракти с етанолно съдържание около 50% с цел максимално извличане на пигменти, витамини от В групата и хлорофил. Екстракцията на пигменти отсъства или е много слаба при ниските концентрации на етанол.

Получени са и възбудно-емисионните матрици на етанолните екстракти за по-добра визуализация на флуоресценцията.

Получени са цветовете характеристики в CIE Lab колориметрична система. Нарастването на параметъра b доказва, че във всички образци доминира жълтата компонента, като стойността му расте с увеличаване на етанолното съдържание. При 95% етанолен извлек доминира зелената компонента-параметърът $a < 0$. Светлостта L намалява, цветността се увеличава, когато концентрацията на етанол е висока. Стойностите за ъгъла на цветовия тон на 10% и 50% водно-алкохолни екстракти са между 88-90 градуса, но стойностите са отрицателни -75 градуса за 95% концентрация на етанол. Получени са линейните зависимости между цветност, светлост и β -каротин.

За първи път в настоящата дисертация се изследва химичният състав на *Sempervivum tectorum* L., както и този на водно-алкохолните му екстракти. Установява се, че сухите листа от покривен дебелец имат изключително високо съдържание на калций. Значително по-високи концентрации на Mn е

определена в листата, отглеждани в наторени почви. Измерените концентрации на токсични елементи отговарят на изискванията на СЗО, което прави билката безопасна за използване.

Измерени са високи концентрации на Са в свежи листа от *Sempervivum tectorum* L., обработени по процедурата за имитация на стомашен сок, което оправдава използването му като народно средство за лечение на стомашни язви, предполага се поради благоприятния ефект на калциране. Високите концентрации на Mg в пресния сок от свежи листа на билката обяснява използването му като народно лекарство срещу болки в ушите.

ИЗВОДИ

- Адаптирана и приложена е методика за регистриране на флуоресцентни спектри за качествено и полуколичествено определяне на съединения с антиоксидантен ефект в екстракти от лечебни растения.
- С цел откриване на корелации между параметрите на приложната фотоника и веществата, допринасящи за антиоксидантната активност са получени резултати за общото съдържание на антоцианини, полифенолни съединения и антиоксидантната активност.
- Доказани са зависимости между общото фенолно съдържание и отношението между интензитета на излъчване и интензитета на възбуждане за дължина на вълната на възбуждане 265 nm, между антоцианините и отношението между интензитета на излъчване и интензитета на възбуждане за дължина на вълната на възбуждане 295 nm. Корелации се наблюдават също между светлостта и антоцианините, β -каротина и цветови параметри.
- Доказано е, че интензитетът на флуоресцентните емисионни максимуми на соковете от плодове на червена боровинка, дренка и малина корелира с тяхната антиоксидантна активност, определена по различни методи.
- За първи път са изследвани оптичните свойства на натурален дървесен сироп, богат на фенолни компоненти. Флуоресцентните спектри могат да се използват за качествено определяне на пигменти и някои витамини, а концентрацията на фенолните съединения корелира добре с цвета на сиропа.
- Доказано е, че 50% етанолен екстракт има най-висок интензитет на флуоресцентните максимуми поради високото съдържание на полифеноли и спиртно и водно-разтворими вещества с антиоксидантна активност.
- Изследваните параметри на приложната фотоника за масло от бъзак, бял трън и кориандър в съотношение 0.5:1:1, за масло от черен кимион и за масло от кориандър са свързани с пигменти и окислителни продукти, някои от които корелират с мастно-киселинния състав на маслата.
- Флуоресцентният анализ за изследваните масла е свързан с няколко естествени флуорофора. Емисионните ивици между 400 и 490 nm се свързват с токофероли, токохроманоли, диени, триени, продукти на окисляване и хидролиза на мастни киселини. Емисионните максимуми с висок интензитет около 600 и 720 nm се свързват с пигментите от групата на хлорофила.

Приложната фотоника може да бъде използвана за качествено определяне на мастно киселинния състав, пигменти, съдържание на хлорофил и първичните и вторични продукти на окислението в хода на съхранение и обработка на маслата.

ПРИНОСИ

За постигане целите на дисертационния труд са реализирани следните образователни и научни приноси:

- Усвоена и адаптирана е методика за флуоресцентен анализ на екстракти и сокове във видимия и ултравиолетовия диапазон, използвани в козметиката и фармацевтиката;
- Доказана е приложимостта на фотониката за експресна качествена и полуколичествена оценка на плодови сокове чрез установяване на корелации между флуоресцентните характеристики, антиоксидантните свойства, общото фенолно съдържание и цветовете параметри;
- За първи път е установена корелация между оптични параметри и антиоксидантната активност на екстрактите от листа *Sempervivum tectorum* L. и усвояването на бионалични елементи от *Sempervivum tectorum* L. в среда със свойства сходни до тези на стомашен сок;
- За първи път е изследвана антиоксидантната активност и е получена възбудно-излъчвателна матрица за кленов сироп.

Научно-приложни приноси с потвърдителен характер

Установени са регресионни зависимости между:

- Отношението на интензитета на флуоресценция и интензитета на възбуждане за дължина на вълната 275 nm и общото фенолно съдържание за сок от боровинки (*Vaccinium vitis-idaea*) с лактулоза;
- Интензитета на излъчване $I_{(350-365)}$ за възбуждаща светлинна вълна с дължина 295 nm и съдържанието на антоцианини, антиоксидантна активност, определена по ABTS и DPPH методи за сок от малини (*Rubus idaeus*) и дренки (*Cornus mas*) с коефициенти на корелация над 0.9;
- Светлостта и общото съдържание на антоцианини и между общото съдържание на антоцианини и антиоксидантната активност, определена чрез DPPH метод за сок от плод на дрян (*Cornus mas*);
- Коефициента на пропускане при 655 nm и съдържанието на хлорофил за водно-етанолните екстракти от покривен дебелец (*Sempervivum tectorum* L.) с коефициент на корелация 0,96;
- Интензитета на флуоресценция при 429 nm за всички дължини на вълните на възбуждане и съдържанието на β -каротин за водно-

етанолните екстракти от покривен дебелец (*Sempervivum tectorum* L.) с коефициент на корелация по-висок от 0.95.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

A₁ **Radusheva P.**, Milkova-Tomova I., Nikolova K., Buhalova D., Aleksieva J., Eftimov T., Krustev S., Investigation of health effect of fruit juice from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*). Journal of IMAB., 23(4):1731-1736, 2017. (SJR=0.103)

A₂ **Radusheva P.**, Milkova-Tomova Il., Nikolova Kr., Minchev I., Buhalova D., Aleksieva I., Hristova-Avakumova N., Hadjimitova V., Najdenova D., Optical properties and antioxidant effect for juices of raspberry (*Rubus idaeus*). AIP Conference Proceedings., 2019:2075: 1600191-1600195, (SJR=0.19).

A₃ **Radusheva P.**, Pashev A., Uzunova G., Nikolova Kr., Gentscheva G., Perifanova M., Marudova M., Physicochemical characteristics of seed oil of *Sambucus ebulus*, *Coriandrum sativum* L. and *Silybum marianum* L. Bulgarian Chemical Communications, 51(A):144-149, 2019, (SJR=0.330).

A₄ **Radusheva P.**, Nikolova Kr., Petkova N., Gabrova R., Naydenova D., Optical properties and chemical characterization of woody syrup by using methods of applies photonics. Journal of IMAB, 24(4):2250-2253, 2018, (SJR=0.104).

A₅ Милкова-Томова Ил., Минчев И., **Радусева П.**, Николова Кр., Денев П., Бухалова Д., Бодуров И., Йовчева Т., Физико-химични свойства на инфузи от морски и сладководни водорасли. Сборник статии, Национална научна конференция 15 години фармация в Медицински университет – Пловдив, 2018, Девин, 221-226.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам благодарностите си към проф. Кръстена Николова, д.ф. за гласуваното доверие, оказаната помощ и подкрепа.

Благодаря и на моето семейство за подкрепата.

ЛИТЕРАТУРА

- Airado-Rodriguez, D., Galeano-Díaz, T., Durán-Merás, I., & Wold, J. P. (2009). Usefulness of fluorescence excitation-emission matrices in combination with parafac, as fingerprints of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf8033623>
- Alexieva I, Terzieva V, Buhalova Dr, Milev M, Sapundjieva T, & Milkova I. (2012). *Food sensory characteristics of traditional Bulgarian fermented beverages based on wild fruits*. 99.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Kivrak, I., Duru, M. E., Öztürk, M., Mercan, N., Harmandar, M., & Topçu, G. (2009). Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chemistry*, 116(2), 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.069>
- Lee Jungmin, Durst Robert, & Wrolstad Ronald. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study . *JAOAC Int.*, 88(5), 1269–1278. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16385975/>
- Mazina, J., Vaher, M., Kuhtinskaja, M., Poryvkina, L., & Kaljurand, M. (2015). Fluorescence, electrophoretic and chromatographic fingerprints of herbal medicines and their comparative chemometric analysis. *Talanta*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.050>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Ou, Boxin, Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. K., Prior, R. L., & Huang, D. (2002). Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf011480w>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay - electron-transfer reactions with organic compounds in solutions containing nitrite or nitrate. *Free Radical Biology and Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Sikorska, E., Górecki, T., Khmelinskii, I. V., Sikorski, M., & Kozioł, J. (2005).

Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.028>

Uzunova, G., Nikolova, K., Perifanova, M., Gentscheva, G., Marudova, M., & Antova, G. (2016). Physicochemical characterization of chia (*Salvia hispanica*) seed oil from Argentina. *Bulgarian Chemical Communications*.

Włodarska, K., Pawlak-Lemańska, K., Khmelinskii, I., & Sikorska, E. (2017). Screening of Antioxidant Properties of the Apple Juice Using the Front-Face Synchronous Fluorescence and Chemometrics. *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0711-3>