

אפיון שמנים אתריים בכתלה חריפה
(*Chiliadenus iphionoides*) בישראל

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה

ע"ש רוברט ה. סמית'

לשם קבלת תואר "מוסמך" במדעי החקלאות

מאת

הילה טמיר

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של

ד"ר נתיב דודאי

היחידה לתבלינים

מנהל המחקר החקלאי, נווה יער.

ופרופ' חיים קיגל

המכון למדעי הצמח

הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית.

תודות

ברצוני להודות לכל מי שסייע לי במהלך העבודה :

לדרי' נתיב דודאי על ההדרכה, התמיכה, הדרבון, העצות הרבות והעזרה לאורך כל הדרך.

לפרופי' חיים קיגל על ההדרכה, הסבלנות והיחס החם.

לפרופי' אבינעם דנין על הסיוע הרב באיתור ואיסוף צמחים ברחבי הארץ.

לרוית פישר על הלימוד, הייעוץ וההדרכה בעבודת המעבדה, על התמיכה, העידוד והחברות.

לדרי' עוזי רביד על העזרה המקצועית והעצות המועילות.

לאולגה לרקוב על העזרה ושיתוף הידע בתחום ה-GC-MS.

לדיא סעדי, דוד חיימוביץ' ודוד בחשיאן על כל הסיוע המסור באקלום הצמחים והחברות הרבה.

למיכאל מטמון ודרור קלדס שליוו אותי בנסיעות הארוכות וסייעו לי באיסוף הצמחים ברחבי הארץ.

למשפחתי וחבריי על העידוד והתמיכה הרבה לאורך כל הדרך.

תוכן עניינים

עמוד

א	 תקציר
1	 מבוא
3	 סקירת ספרות
12	 שיטות וחומרים
	תוצאות
	1. הרכב השמן האתרי של אוכלוסיות בר של כתלה חריפה.
15	1.1 סקר אוכלוסיות בר של כתלה חריפה בישראל
17	1.2 הרכב השמן האתרי באוכלוסיות נבחרות של כתלה חריפה בישראל
	2. הרכב השמן האתרי בשיטות הפקה שונות
	2.1 השוואה בתכולת מרכיבים עיקריים בשמן האתרי (%) המתקבל בשיטות זיקוק,
29	מיצוי ו- SPME
	2.2 השוואה בתכולת מרכיבים עיקריים בשמן האתרי (%) המתקבל בשיטות זיקוק
30	ומיצוי, בחמישה צמחים מטיפוסים שונים
32	2.3 תכולה והרכב השמן האתרי בתהליך הזיקוק באורכי זמן שונים
	3. השתנות תכולה והרכב השמן האתרי של כתלה חריפה מאוכלוסיית גן נר במהלך השנה
34	3.1 השתנות תכולת השמן האתרי בצמחי כתלה חריפה מאוכלוסיית גן נר
35	3.2 השתנות הרכב השמן האתרי של צמחי כתלה חריפה מאוכלוסיית גן נר
	4. התפלגות מרכיבי השמן האתרי בצמח
37	4.1 התפלגות מרכיבי השמן האתרי בין חלקי הצמח השונים
39	4.2 התפלגות תכולת השמן האתרי לאורך ענף
40	4.3 התפלגות תכולת מרכיבים עיקריים בשמן האתרי לאורך ענף
41	5. הפרדת מרכיבים לא ידועים בשיטת Flash Chromatography
46	 דיון ומסקנות
54	 רשימת ספרות
62	 נספחים
I	 תקציר באנגלית

תקציר

הכתלה החריפה, *Chiliadenus* (syn. *Varthemia*) *iphionoides* (Boiss. et Blanche) Brullo, נמנית על משפחת המורכבים. זהו מין כמעט אנדמי לארץ ישראל, השייך לתת-האלמנט הים-תיכוני המזרחי, והיא מופיעה ברוב חלקי הארץ, מהר מירון ועד הר הנגב. זהו צמח ארומטי אשר נמצאו לו שימושים מגוונים ברפואה העממית. שמנים אתריים הם חומרים פעילים בצמחי מרפא שונים והם המקנים את הארומה לצמחים הארומטיים.

הפרסום היחיד של הרכב השמן האתרי של כתלה חריפה עד כה, הוא מאוכלוסיה אחת הגדלה בגדה המזרחית של עמק הירדן, בה נמצא כי המרכיב העיקרי בשמן האתרי הוא Borneol, ומרכיבים עיקריים נוספים הם 1,8-Cineole, α -Terpineol, Camphor, Borneyl formate, Terpinen-4-ol ו-Borneyl acetate. בעבודה הקדמית שלנו, בה נערכה אנאליזה לאוכלוסיות כתלה חריפה באזור יהודה ושומרון, נמצא הרכב שמן אתרי שונה לחלוטין מזה המדווח לגבי האוכלוסייה הירדנית. לכן, המטרה העיקרית של עבודה זו הייתה לאפיין את השונות בהרכב השמן האתרי ותכולתו באוכלוסיות מייצגות של כתלה חריפה באזור תפוצתה בישראל. לצורך כך בוצע סקר אוכלוסיות בר בו נדגמו מספר פרטים מ-32 אוכלוסיות. נמצאו בשמן האתרי שבעה מרכיבים עיקריים: 1,8-Cineole, Camphor, Borneol, Chrysanthemic acid, Unknown 29, t-Cadinol ו-Intermedeol. לבחינת השונות בהרכב השמן האתרי של הכתלה החריפה בארץ נבחרו 10 אוכלוסיות מייצגות על פי מיקומן, בהתאם לטופוגרפיה ולאקלים. בבדיקת השמן האתרי ממיצוי הצמחים, נמצאו כ-161 מרכיבים, כאשר 75 מתוכם, רובם מרכיבים מינוריים, אינם מזוהים ע"י ספריות ה-MS. התוצאות מצביעות על שונות רבה בהרכב השמן האתרי בקרב האוכלוסיות השונות, כך שניתן לסווגן לכימוטיפ שונה בהתאם למרכיב העיקרי. נמצאו שלושה כימוטיפים: 1. כימוטיפ "קמפורי", 2. כימוטיפ "אינטרמדאולי" ו-3. כימוטיפ "צפוני". המרכיב העיקרי בשמן האתרי באוכלוסיות הדרומיות הינו Camphor, לכן הן משתייכות לכימוטיפ ה"קמפורי". אוכלוסיות יהודה, שומרון וצפון הנגב בלבד מכילות Intermedeol, לכן הן משתייכות לכימוטיפ ה"אינטרמדאולי", ואילו שאר החומרים מהווים מרכיבים עיקריים באוכלוסיות הצפוניות, ולכן הן משתייכות לכימוטיפ ה"צפוני". מעניין שבתוך האוכלוסיה באזור ירושלים נמצאה שונות רבה יותר מן האוכלוסיות האחרות, כנראה בשל העובדה שזהו אזור מפגש בין אזורי התפוצה של הטיפוסים הכימיים השונים.

על מנת לעקוב אחר שינויים בשמן האתרי במהלך השנה, נבחרה אוכלוסיה אחת, שבה נבדקו הרכב ותכולת השמן האתרי במהלך חודשי השנה, והתפלגות הרכב השמן האתרי ותכולתו בחלקי הצמח השונים ולאורך הענף. נמצא כי תכולת השמן האתרי בצמח מצויה בשיאה בחודשי הקיץ, והיא הולכת ופוחתת עד לרמה נמוכה מאד בחורף. תהליך זה תואם את המצב הפנולוגי של הצמח. כאשר הצמח מצוי בשיא בלבו, לפני יצירת הפרחים, תכולת השמן בו היא הגבוהה ביותר. לאחר הפריחה הצמח

מתייבש ופוחתת תכולת השמן האתרי. התכולה עולה שוב כשהצמח מתחיל להתחדש. בצמחים הגדלים בחממה, המגמה היא זהה, אך תכולת השמן גבוהה יותר.

בבחינת התפלגות השמן האתרי בצמח נמצא כי האיבר העשיר ביותר בשמן אתרי בכתלה חריפה הוא העלה, לאחר מכן נמצאים הניצנים והפרחים, והאיבר עם תכולת השמן הנמוכה ביותר הוא הגבעול. בבחינת הרכב השמן האתרי בחלקי הצמח השונים, נמצא כי העלים והניצנים מייצגים את התפלגות המרכיבים העיקריים בשמן האתרי בצמח השלם, אך הגבעולים והפרחים מראים תמונה שונה. לכן, לצורך קביעת כימוטיפ הצמח צריך להפיק שמן אתרי מענף שלם, עלים או ניצנים.

בבחינת התפלגות תכולת השמן האתרי בעלים השונים לאורך ענף נמצא כי תכולת השמן האתרי בעלים הולכת ויורדת מלמעלה למטה, כך שלכאורה, ככל שגיל העלה עולה, יורדת תכולת השמן האתרי בו.

כדי לבחון האם קיימת השפעה של צורת הפקת השמן האתרי על הרכבו, נערכה אנליזה לשמן האתרי אשר הופק בשלוש שיטות שונות: 1. זיקוק במערכת קליוונג'ר, 2. מיצוי ב-MTBE ו-3. SPME. נמצאו הבדלים משמעותיים בתכולת השמן האתרי המתקבלת בכל שיטה.

בהפקת שמן אתרי בשיטת הזיקוק נמצאו שני מרכיבים עיקריים אשר אינם מזהים על ידי ספריות ה-MS. הם הופרדו מהשמן האתרי באמצעות Flash Chromatography, ונלקחו לזיהוי באמצעות NMR. נמצא כי המרכיבים הם איזומרים, ומהווים דימר של המרכיב 5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene.

לסיכום, מעבודה זו ניתן לקבוע כי קיימים שלושה טיפוסים כימיים של כתלה חריפה בישראל, הנבדלים ביניהם בהרכב השמן האתרי. לצורך הפקת שמן אתרי בקנה מידה תעשייתי, יש לקצור את הכתלה בחודשי הקיץ, לפני מועד הפריחה, ולהפיקו באמצעות זיקוק של הצמח השלם או של עליו.

מבוא

הכתלה החריפה, *Chiliadenus* (syn. *Varthemia*) *iphionoides* (Boiss. et Blanche) Brullo, נמנית על משפחת המורכבים. זהו מין כמעט אנדמי לארץ ישראל, השייך לתת-האלמנט הים-תיכוני המזרחי, והיא מופיעה ברוב חלקי הארץ, מהר מירון ועד הר הנגב. הצמח מאכלס סלעי קירטון קשה וסלעי נארי המכסים סלעי קירטון. באזורים שחונים הוא גדל בכיסי קרקע שבתוך משטחים של סלע גיר קשה, וכן בתשתית של חצצית של ערוצי נחלים גדולים ובצידי דרכים חדשות בהרי הנגב (דנין, 1983).

הכתלה החריפה היא צמח ארומטי שיש לו שימושים ברפואה העממית: חיזוק הלב, המח והמחשבה, הפגת מלנכוליה ועצבנות ולטיפול בשיעול ונזלת. כמו כן להורדת חום גבוה, לריפוי שפעת ושלשול, לשיכוך כאבי בטן, ואף להרחקת חרקים (קריספיל, 1985, פלביץ' ויינב, 1991). לאחרונה נמצא כי לכתלה חריפה יש פעילות של דילול טסיות דם, ויסות רמות הסוכר בדם, פעילות אנטי בקטריאלית ואנטיאוקסידנטית (Afifi and Aburjai, 2004, Afifi et.al. 1997,) (Al-Dabbas et.al., 2005, Al-Mustafa and Al-Thunibat, 2008).

לשמנים אתריים, המקנים את הארומה לצמחים הארומטיים, יש פעילות ביולוגית והם נחשבים חומרים פעילים בצמחי מרפא שונים. הפרסום היחיד של הרכב השמן האתרי של כתלה חריפה עד כה, הוא מאוכלוסיה אחת הגדלה בגדה המזרחית של עמק הירדן, בה נמצא כי המרכיב העיקרי בשמן האתרי הוא Borneol, ומרכיבים עיקריים נוספים הם α -Terpineol, 1,8-Cineole, Borneyl formate, Camphor, Terpinen-4-ol ו-Borneyl acetate (Avato et. al., 2004). בעבודה הקדמית שלנו, בה נערכה אנאליזה לאוכלוסיות כתלה חריפה באזור יהודה ושומרון, נמצא הרכב שמן אתרי שונה לחלוטין מזה המדווח לגבי האוכלוסייה הירדנית. לכן, בעבודה הנוכחית נבדק לראשונה הרכב השמן האתרי של צמחי כתלה חריפה שנדגמו באוכלוסיות מייצגות באזור התפוצה בישראל. לצורך כך, בוצע תחילה סקר כימי של 32 אוכלוסיות ברחבי הארץ, מהן נבחרו 10 אוכלוסיות מייצגות. נבדקה השוונות בהרכב השמן האתרי בין האוכלוסיות ובתוכן, עם דגש על התפלגות המרכיבים העיקריים ביניהן. בבדיקות המקדימות נמצא שקיימת השפעה משמעותית של צורת הפקת השמן האתרי על הרכבו, בעיקר זיקוק לעומת מיצוי. לפיכך, ראינו לנכון לבצע את כל הבדיקות שמטרתן לבחון את תכולת מרכיבי השמן בצמח על ידי מיצוי קר של הדוגמא, כדי להימנע מהשפעת תהליך הזיקוק. בנוסף, נערכה בדיקה של ההבדל המתקבל בין שני התהליכים -זיקוק או מיצוי, בכל הטיפוסים הכימיים העיקריים שנמצאו. כמו כן, נבחרה אוכלוסיה אחת, שבה נבדקו השינויים בהרכב ותכולת השמן האתרי במהלך חודשי השנה, והתפלגות הרכב השמן האתרי ותכולתו בחלקי הצמח השונים ולאורך הענף. בנוסף לידע המדעי הבסיסי עשוי המחקר להוות בסיס לתירבות ופיתוח המין הזה כגידול חקלאי חדש להפקת שמן אתרי למטרות שונות.

מטרות המחקר

1. אפיון השונות בהרכב השמן האתרי ותכולתו באוכלוסיות מייצגות של צמחי המין *כתלה חריפה* באזור תפוצתו בישראל.
2. בדיקת השפעת שיטת הפקת השמן האתרי על הרכבו.
3. בחינת שינויים בהרכב השמן האתרי בצמח לאורך השנה באוכלוסיה נבחרת.
4. אפיון התפלגות הרכב ותכולת השמן האתרי בין חלקי הצמח השונים.

סקירת ספרות

1. כתלה חריפה (*Chiliadenus* (syn. *Varthemia*) *iphionoides* (Boiss. et Blanche) Brullo

הכתלה החריפה נמנית על משפחת המורכבים, בת-משפחת הצינוריים. היא מין כמעט אנדמי לארץ ישראל, השייך לתת-האלמנט הים-תיכוני המזרחי (בן עזרה, 1961). שמו העברי של הצמח נגזר מן השרש כותל, אך השם מטעה, שכן הצמח גדל בסלעים ומצוקים אך לא בקירות בנויים. השם המדעי הקודם של הסוג, *Varthemia*, נקבע בשנת 1865 על ידי Boissier לזכרו של ארתמיוס, בוטנאי שסייר במזרח הקרוב בסוף המאה ה-18 ובתחילת המאה ה-19. בשנת 1979 שונה השם ל-*Chiliadenus* על ידי חוקר סיציליאני בשם Brullo (דנין, 1983).

הכתלה החריפה מופיעה ברוב חלקי הארץ, מהר מירון ועד הר הנגב (פינברון-דותן ודנין 1991). הצמח מאכלס סלעי קירטון קשה וסלעי נארי המכסים סלעי קירטון. בסלעי הנארי נובט הצמח בסדקים ובגומחות שבתוך שכבת הסלע הקשה, שורשיו חודרים לשכבת הסלע הרכה שמתחתיה, ומפתח את עיקר מערכת השורשים שלו בתוך הסלע הרך. באזורים שחונים הוא גדל בכיסי קרקע שבתוך משטחים של סלע גיר קשה, וכן בתשתית של חצצית של ערוצי נחלים גדולים ובצידי דרכים חדשות בהרי הנגב (דנין, 1983). ייתכן שהופעת הצמח אינה תלויה בתנאי אקלים מסוימים, אך היא תלויה תמיד בהימצאות משטחי סלע עם כיסי קרקע מתאימים (קריספיל, 1985).

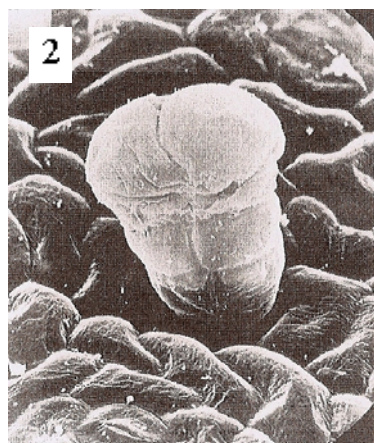
הצמח הוא בן-שיח המגיע עד לגובה של 80 ס"מ. ענפיו מתחדשים מבסיס מעוצה המצוי בתוך הסלע או מתנשא עד כדי 5 ס"מ מעל לפני הסלע או הקרקע. בתחילת עונת החורף מצמיח הצמח ענפים ההולכים ומתארכים עד לעונת הקיץ ומגיעים אז לאורכם המרבי. הענפים מכוסים בעלים תמימים, יושבים, שעירים וריחניים, שאורכם הולך וקטן מבסיס הצמח כלפי מעלה. אורך העלים התחתונים כ-15 מ"מ, ואורך העליונים, המלווים את התפרחות, 2-3 מ"מ בלבד. התפרחות נישאות על עוקצים קצרים ויוצאות בראשי הענפים. עלי המעטפת זקופים. הפרחים צינוריים, צהובים, ואורכם אינו עולה בהרבה על אורך עלי המעטפת (8-10 מ"מ). הפריחה בחודשים אוגוסט-אוקטובר וההאבקה מתבצעת על ידי חרקים (דנין, 1983).

נמצא כי לכתלה שימושים רבים ברפואה העממית: יהודי תימן משתמשים בעלי כתלה בתערובת עם דבש לחיזוק הלב, המח והמחשבה. עלים מבושלים במים משמשים להפגת מלנכוליה ועצבנות ולטיפול בשיעול ונזלת. ערביי הארץ משתמשים בכתלה כתרופה לחום גבוה, והבדואים בסיני משתמשים בכתלה לריפוי שפעת ושלשול, ולשיכוך כאבי בטן. אצל יהודי מרוקו שהתיישבו בכפרי הגליל, עוטפים פצעים מוגלתיים בחלקי צמח טריים. בנוסף על כך, קיימים שימושים אחרים לצמח זה: הערבים פורשים עלי כתלה חריפה מתחת לענבים ולתאנים המונחים לייבוש, והניחוח נקלט בפרי המתייבש. כמו כן, נוהגים להוסיף עלים לשקי קמח כדי להרחיק חיפושיות (קריספיל, 1985, פלביץ' ויניב, 1991).

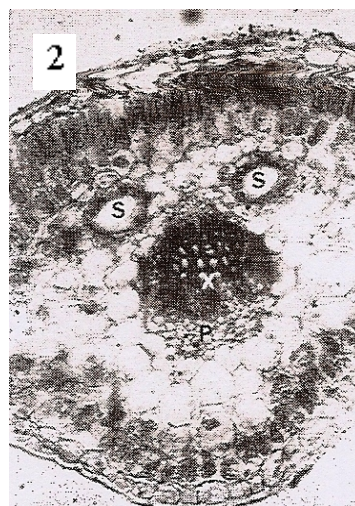
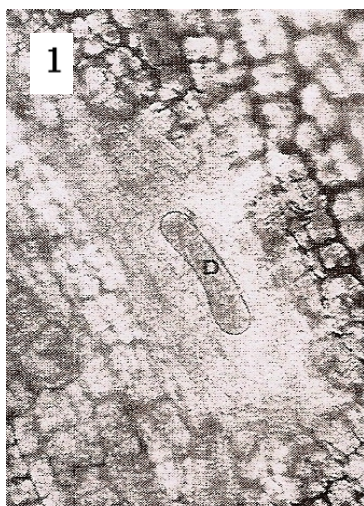
במחקרים שנערכו בשנים האחרונות נמצא כי למיצוי מימי של כתלה חריפה יש פעילות של דילול טסיות דם (Afifi and Aburjai, 2004) ופעילות של ויסות רמות הסוכר בדם (Afifi et.al. 1997). למיצוי ב-ethyl acetate יש פעילות אנטי בקטריאלית (Al-Dabbas et.al. 2005), ולמיצוי ב-methanol יש פעילות אנטיאוקסידנטית (Al-Mustafa and Al-Thunibat, 2008).

2. השמן האתרי

שמנים אתריים הם כלל המרכיבים האורגניים הנדיפים המיוצרים ברקמות צמחי תבלין ובושם, בעלי מסיסות נמוכה במים, המקנים להם את הארומה המיוחדת (רביד וורקר, 1994). הם משמשים את האדם כמקור טבעי לחומרי טעם וריח בתעשיות המזון, התמרוקים והקוסמטיקה וכחומרי מוצא לסינתזות חומרים בתעשיות כימיות. החומרים המרכיבים את השמנים האתריים הם מטבוליטים משניים והנפוצים שבהם הם ממשפחת הטרפנואידים (Sangwan et. al. 2001). היחסים הכמותיים ביניהם נקבעים בעיקר ע"י גורמים גנטיים (דודאי וחוברין, 1994) ומושפעים מגורמי הסביבה וגורמים התפתחותיים בצמח (Dudai, 2005). מאחר ורבים מחומרים אלו רעילים, הם נאגרים בצמח בבלוטות אפידרמליות אשר מגינות מפני "הרעלה עצמית" (Werker et al. 1985). בלוטות הן שערות מפרישות מיוחדות המצויות על האפידרמיס של חלקיו השונים של הצמח, בהן מסונתז ומאוחסן השמן האתרי (Dudai et al. 1988). קיימות בלוטות מטיפוסים שונים ובצמח בודד ניתן להבחין בסוגים שונים של בלוטות (Werker et al. 1985). בצמחים ממשפחת השפתניים, הידועה כעשירה במינים ארומטיים, נמצא כי ישנם לפחות שני טיפוסים של שערות בלוטיות הנבדלות זו מזו במבנה, באופן ההפרשה ובהרכב השמן האתרי: בלוטות קטנות דמויות ראש סיכה (capitate glands), ובלוטות גדולות דמויות מגן (peltate glands). במשפחת המורכבים, בלוטות השמן האתרי נמצאות על גבי העלים במבנה של 10 תאים (תמונה מס' 1), המורכב משני תאי גבעול, אשר על כל אחד מהם תא בזאלי, על גביו מצויים שלושה תאים מפרישים (ten-celled biseriate glandular trichome) (Duke and Paul, 1993; Monteiro et. al. 2001). במגוון מינים ממשפחת המורכבים, בנוסף לשמן האתרי האגור בבלוטות על גבי העלים, נמצא גם שמן אתרי בתוך הצמח, אגור בחללים אליפטיים או בביבי הפרשה צינוריים, בסמיכות לצינורות ההובלה בצמח. יתר על כן, ישנם מקרים בהם הרכב השמן האתרי בשערות הבלוטיות שונה מהרכב השמן האתרי המצוי המאגרים הפנימיים בצמח (Werker et. al 1994).



תמונה מס' 1: מבנה בלוטת שמן אתרי בצמחים ממשפחת המורכבים. (1) חתך לאורך הבלוטה בסטיביה (Monteiro et. al. 2001), (2) מראה חיצוני של הבלוטה בטרגון (Werker et. al 1994).



תמונה מס' 2: מאגרים פנימיים של שמן אתרי בצמח. (1) חלל הפרשה אליפטי (D) בחתך עלה של טרגון, (2) שני ביבי הפרשה (S) בסמיכות לעצה (X) ולשיפה (P) בטרגון (Werker et. al 1994).

לשמן האתרי מיוחס מגוון של תפקידים אקולוגיים, כגון סיוע בהגנת הצמח על ידי דחיית הרביוורים וטפילים פטרייתיים, משיכת אויבים טבעיים של חרקים הניזונים מן הצמח ומשיכת מאביקים (Langenheim, 1994).

כל השמנים האתריים מכילים תערובות שונות ומורכבות של תרכובות כימיות, כאשר בד"כ רק חלק קטן מהן (עד כתריסר חומרים) מהווים כ- 90% מכלל השמן. יתר החומרים מהווים "מיקרו רכיבים" (רביד וורקר 1994). מרכיבי השמן הם לרוב נגזרות טרפניות נדיפות (מונו או ססקוי - טרפנים) הנוצרות במסלול ביוסינתטי שמקורו בחומצה המבאלונית (Gershenzon 1994).

הקבוצות הפונקציונליות המאפיינות את מרכיבי השמנים האתריים הן רבות, עמן נמנים פחמימנים, כוהלים, קטונים, אלדהידים, אתרים, אסטרים ועוד (Walradt 1982).

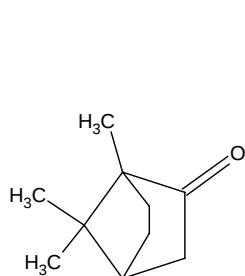
ניתן לאפיין את הרכב השמן האתרי בשתי צורות: הרכב איכותי והרכב כמותי. ההרכב האיכותי עונה על השאלה: מהם הרכיבים הנדיפים המרכיבים את השמן האתרי, ובהרכב הכמותי מבוטאת התכולה היחסית של כל מרכיב בשמן האתרי (דודאי וחובריו, 1994). השמן האתרי מופק באמצעות זיקוק או מיצוי בממס אורגני. הזיקוק הוא השיטה המסחרית לקבלת כמויות גדולות של שמן אתרי, ואילו במיצוי בממס אורגני ניתן להשתמש בכמויות חומר צמחי קטנה, כגון עלה או פרח בודד. לצורך אנליזה של השמן האתרי מומלץ להפיקו באמצעות מיצוי בממס אורגני, כך מופחת הסיכוי לקבלת ממצאי שווא שמקורם בשינויים הכימיים החלים בחום בתהליך הזיקוק. כמו כן, בשיטת המיצוי ניתן לקבל תוצאות איכותיות וכמותיות של מרכיבי השמן האתרי, באמצעות שימוש בסטנדרט פנימי. יתרון נוסף לשיטה זו הוא היכולת לבצע מיצויים רבים בו זמנית (Dudai and Belanger, 2008). אנליזה של השמן האתרי לקביעת הרכבו נעשית על ידי הפרדה וזיהוי באמצעות גז כרומטוגרף - ספקטרומטר המסות (GC-MS) (Adams, 2001). שיטה זו מחייבת ספרייה ממוחשבת של ספקטרת המסות של המרכיבים, מידע על זמן היציאה שלהם בתנאים הנבדקים, ו/או חומרים נקיים כסטנדרט להשוואה. במידה ומרכיב מסוים אינו נמצא בספרייה, יש לבדוד אותו לצורך זיהוי בשיטות אחרות, בעיקר NMR (Ferreira et. al., 2001).

3. השמן האתרי בכתלה חריפה

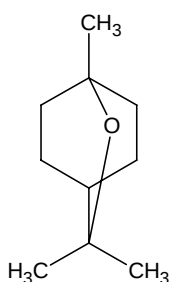
כתלה חריפה שייכת למשפחת המורכבים. לכן נצפה שהשמן האתרי המופק ממנה יהיה מורכב בעיקר ממונוטרפנים (Ibrahim et. al., 2001, Sayyah et. al., 2004). טרפנים בנויים מתת יחידות של מולקולה חמש פחמנית הקשורה לשני אטומי פוספט, הנקראת isopentenyl pyrophosphat (IPP) והאיזומר שלה dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). ללא אטומי הפוספט נקראת המולקולה isoprene. ביצירת מולקולות הטרפנים, יחידות האיזופרן מתחברות ביניהן על פי רב בצורה של ראש-זנב (Adam et. al., 1998). ליצירת מולקולות מונוטרפן (C_{10}) דרושות שתי מולקולות של איזופרן, המתחברות ביניהן באמצעות אנוזימים מקבוצת monoterpene synthases. קבוצת המונוטרפנים מכילה סוגים שונים של מולקולות: אלדהידים (Citral), קטונים (Pulegone), אלכוהולים (Linalool), אתרים (1,8-Cineole), ופחמימנים בלתי רוויים (α -Pinene) (Walradt, 1982). קבוצת הססקוטרפנים (C_{15}) מורכבת משלוש תת יחידות של איזופרן, ומולקולת המוצא לקבוצה זו נקראת farnesyl diphosphate (FDP) (Cane, 1990).

הפרסום היחיד של הרכב השמן האתרי של כתלה חריפה הוא מאוכלוסיה הגדלה בגדה המזרחית של עמק הירדן, ליד מאגר המים על שם המלך טלאל (Avato et. al., 2004). במחקר זה, הצליחו לזהות כ- 90% מתכולת השמן האתרי. המרכיב העיקרי היה המונוטרפן Borneol, אשר תכולתו

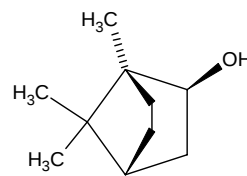
בשמן האתרי הייתה כ- 50%. מרכיבים עיקריים נוספים היו 1,8-Cineole (8.4%), α -Terpineol (3.8%), Camphor (3.7%), Bornyl formate (3.6%), Terpinen-4-ol (3.0%) ו- Bornyl acetate (2.9%) (איור מס' 1). כצפוי, המרכיבים העיקריים בשמן האתרי היו מונוטרפנים. יתר על כן, סך כל תכולת המונוטרפנים בשמן האתרי עולה על 90%. נמצאו מעט מאוד ססקוטרפנים, ביניהם Caryophyllene oxide (0.6%), β -Oplophenone (0.9%), δ -Cadinol (0.3%) ו- τ -Cadinol (1.2%).



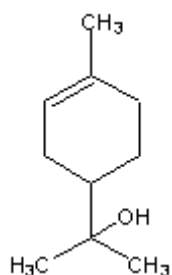
Camphor



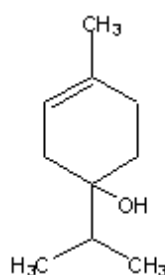
1,8-Cineole



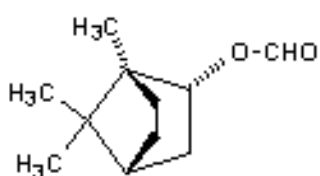
Borneol



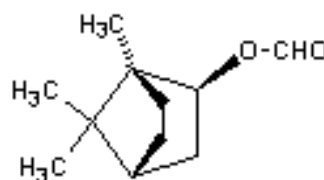
α -Terpineol



Terpinen-4-ol



Bornyl formate



Bornyl acetate

איור מס' 1: מרכיבים עיקריים בשמן האתרי של כתלה חריפה מאוכלוסיה הגדלה בגדה המזרחית של עמק הירדן (Avato et. al., 2004).

4. שונות בהרכב השמן האתרי בין אוכלוסיות ובתוכן

שונות בהרכב השמן האתרי בין צמחים המשתייכים למין אחד תועדה במספר משפחות, והיא עשויה להתקיים בין אוכלוסיות טבעיות של מין רחב תפוצה וגם בתוכן. קיום השונות נחקר בדרך כלל בהקשר לדפוס התפוצה הגיאוגרפי, תוך ניסיון לקשר בין הבדלים בתנאי בתי הגידול לבין הרכב שמן אתרי. השונות יכולה להיות בנוכחות או בחוסר של מרכיב מסוים בשמן האתרי, ואז מקורה גנטי, או בכמות היחסית של מרכיב מסוים ואז היא נובעת מהשפעות גורמים סביבתיים (Hey and Waterman, 1993). כאשר בתוך מין מסוים מתקבלות אוכלוסיות יציבות בעלות פרופיל שמן אתרי שונה בין אוכלוסיה אחת לשנייה, ניתן לקבוע שכל אוכלוסיה כזאת מהווה "כימוטיפ" (chemotype) (Hallahan, 2000). לצורך הקביעה של כימוטיפ, יש להעריך את מידת השפעתו של המרכיב התורשתי על הרכב השמן האתרי. לשם כך יש לבצע השוואה בין הרכב השמן האתרי של פרטים הגדלים באוכלוסיות טבעיות לבין צאצאיהם אשר מגודלים בתנאים אחידים, במטרה לבדוק האם ההרכב הוא יציב (דודאי וחוברין, 1994). דוגמאות לשונות בכמה מינים נמצאו באוכלוסיות נענת הכדורים (*Mentha pulegium*) ביוון, אשר הכילו ארבעה הרכבים כימיים שונים (Kokkini et al., 2002). בצמחי זוטה לבנה (*Micromeria fruticosa*) מאוכלוסיות בר בישראל נמצאו שני הרכבים כימיים, המכילים Pulegone או נגזרות של Piperitenone כמרכיבים עיקריים (אלמוג, 2001). במין צתרה ורודה בישראל נמצאה שונות בין אוכלוסיות טבעיות, בהן המרכיב העיקרי הוא Carvacrol, ואוכלוסיות אחרות בהן הרכבו בשמן האתרי היה נמוך (לינדר, 2001). באוכלוסיות קורנית (*Thymus capitatus*) בפורטוגל נמצאה שונות בין-אוכלוסית בהרכב השמן, שהוסברה על ידי ההבדלים בתנאי האקלים ובטיב הקרקע בין שני איזורים גיאוגרפיים (Salgueiro et. al., 1997a). באוכלוסיות של מרווה מרושתת (*Salvia sclarea*) ממקור רוסי, המרכיבים העיקריים בשמן האתרי הם Linalool ו-Linalyl acetate, לעומת Citral, Geraniol ו-Geranyl acetate בצמחים שמקורם בישראל (Dudai, 2005). כמו כן, נמצאו הבדלים בין צמחי טרגון (*Artemisia dracunculus*) ממקורות שונים. טרגון צרפתי הוא ארומטי מאוד, ומרכיבו העיקרי הוא Methyl chavicol. לעומתו, טרגון רוסי הוא פחות ארומטי ומכיל פחות Methyl chavicol. מרכיבו העיקריים בשמן האתרי הם Sabinene ו-Elemicin (Werker et. al., 1994). שני טיפוסים כימיים של שומר פשוט (*Foeniculum vulgare*) נמצאו בישראל (Barazani et. al., 2002). הסיבה שהוצעה לקיום שוני זה הינה בידוד גנטי כתוצאה משוני אקלימי. בסקירת אוכלוסיות טבעיות של לענת יהודה (*Artemisia judaica*) בישראל ובמצרים, אופיינו שני טיפוסים כימיים שקיומם קשור לתפוצה גיאוגרפית (Putievsky et. al., 1992). בדומה לכך, גם בסקירת אוכלוסיות של לענה חד-שנתית (*Artemisia annua*) מהונגריה, סין ויוגוסלביה נמצאו טיפוסים כימיים שונים (Holm et.al., 1997). קיום שונות בהרכב השמן האתרי בתוך אוכלוסיות הינה תופעה נפוצה פחות מאשר שונות בין אוכלוסיות. באוכלוסיית בר של *Thymus albicans* בפורטוגל, נמצאו שני טיפוסים כימיים המכילים שני מרכיבים עיקריים נפרדים (1,8-Cineole ו-Linalool), וטיפוס כימי שלישי, המכיל

כמויות גבוהות של שני המרכיבים (Salgueiro et al., 1997b). באוכלוסיות של מין של אזובית (*Origanum microphyllum*) מהאי כרתים נמצאה שונות גבוהה בהרכב השמן האתרי בתוך האוכלוסיות, אף יותר מאשר השונות בין האוכלוסיות (Gotsiou et. al., 2002). בסקירה של שש אוכלוסיות נענה משובלת (*Mentha longifolia*) ביוון נמצאו שני טיפוסים כימיים (Kokkini and Papageorgiou, 1988). בשתי אוכלוסיות נמצאו צמחים משני הטיפוסים גדלים זה לצד זה. הסבר אפשרי למצב זה הינו חדירתם של מינים פליטי תרבות לאוכלוסיות הבר והתרחשות הכלאות, באופן שהביא לקיום אוכלוסיות מעורבות.

5. גורמים המשפיעים על הרכב ותכולת השמן האתרי

הרכב השמן האתרי של צמח מושפע על ידי מגוון גורמים. לחלקם השפעה ישירה על תהליכי הביוסינתזה של מרכיבי השמן ברקמות ההפרשה, ולחלקם השפעה עקיפה המתבטאת בשינוי היבט כלשהו של התפתחות הצמח, באופן העשוי להשפיע על תכונות השמן. תכולת השמן האתרי נקבעת בעיקר בדרך גנטית (דודאי וחוברי, 1994). לדוגמא, שלוש אוכלוסיות של מרווה משולשת (*Salvia fruticosa*) מהאי כרתים שמרו על פרופיל השמן האתרי בגידול בתנאים אחידים, כך שהרכב השמן האתרי נקבע באופן תורשתי (Skoula et.al., 2000). כמו כן, צאצאים של צמחי לענת יהודה (*Artemisia judaica*) אשר הונבטו מזרעים של אוכלוסיות בר בישראל ומצרים וגודלו בתנאים אחידים, שמרו על הרכב איכותי דומה לזה של הוריהם. אולם, כמויותיהם היחסיות של המרכיבים העיקריים בשמן האתרי השתנו (Putievsky et. al., 1992).

לעיתים קרובות ישנו קשר בין הביטוי הגנטי של הצמח לבין הסביבה. לדוגמא, בצמחי בת-קורנית (*Thymus pulegiodes*) מלטביה, נמצאו אוכלוסיות טבעיות ששמרו על הרכבם הכימי כאשר הועברו לגידול בתנאים אחידים, ואוכלוסיות בהן השתנה הרכב השמן האתרי עם שינוי תנאי הסביבה (Loziene and Venskutonis, 2005). בדומה לכך, בצמחי שומר משבע אוכלוסיות טבעיות אשר גודלו בתנאים אחידים, נמצאה מגמה מעורבת ביחס לשימור ההרכב (Barazani et. al., 2002). בצאצאי שלוש אוכלוסיות התקיימו הרכבים דומים לאלו של אוכלוסיות המקור, ואילו בצאצאי ארבע האוכלוסיות הנותרות נמצאה שונות גבוהה בין ההרכבים. כלומר, ההרכב הכימי של הצמח עובר במקרים מסוימים בתורשה לצאצאיו.

את הגורמים שאינם גנטיים המשפיעים על הרכב ותכולת השמן האתרי ניתן לחלק לגורמים סביבתיים אביוטיים (כגון טמפרטורה, הרכב קרקע, תנאי עקה) וגורמים ביולוגיים התפתחותיים (כגון סוג וגיל רקמות, מורפולוגיה, פנולוגיה). את ההבדלים בתנאי הסביבה ניתן לבחון במספר הקשרים. בהיבט הכרונולוגי, עם חילופי עונות השנה משתנים אורך היום, הטמפרטורה והמשקעים. בהיבט הגיאוגרפי, בבתי גידול שונים שוררים תנאים אקלימיים מגוונים, כתלות במיקום, ברום ובמערכות אקלימיות מקומיות. ברמה המיקרו-אקלימית, בבית הגידול עשויים להתקיים אזורים בהם משאבים שונים (מים, עצמת אור) זמינים ברמות שונות.

התפתחותו של הצמח, הבאה לידי ביטוי בשינויים מורפולוגיים ופנולוגיים, כגון צמיחתם והתבגרותם של עלים וקיום פריחה, עשויה אף היא להביא לשינוי הרכב השמן האתרי. מכיוון

שהתזמון והאופי של תהליכים התפתחותיים מושפעים אף הם על ידי גורמי הסביבה, מתקיימות השפעות גומלין על הרכב השמן בעיתויים שונים. לכן, בכדי לאפיין את הרכב השמן האתרי של טיפוס כימי מסוים, יש לבדוק את השתנותו לאורך זמן. בבדיקת הקשר בין שלבים פנולוגיים לשמן האתרי, נמצא כי בצמחי נענה חריפה הפריחה נמצאת במתאם לתכולת השיא של השמן האתרי בצמח לאורך מחזור גידולו. קיום של ביומאסה גדולה יותר מביא להגדלת תכולת השמן (דודאי וחובריו, 1994).

דוגמאות לשינוי בפרופיל השמן האתרי בין עונות השנה, ניתן למצוא במינים שפתיניים ים-תיכוניים בעלי פנולוגיה עונתית משתנה, כמו האזוב המצוי (*Origanum syriacum*). תכולת השמן האתרי של צמח זה בחודשי החורף היא כחמישית מאשר תכולת השמן האתרי בחודשי הקיץ. כמו כן, משתנה גם הרכב השמן האתרי. בחורף, המרכיב העיקרי הוא para-Cymene, ובקיץ המרכיב העיקרי הוא Thymol (Dudai et. al., 1992). דוגמא נוספת היא מרווה רפואית (*Salvia officinalis*), בה נמצאת תכולת השמן האתרי הגבוהה ביותר בחודשי הקיץ, לעומת תכולה גבוהה של המרכיב העיקרי Thujone, בחודשי הסתיו (Sangwan et. al., 2001). דוגמא להשפעת אורך היום על תכולה והרכב השמן האתרי נמצא בנענה. מרבית המינים בסוג נענה הינם צמחי יום ארוך. נמצא כי קיים מתאם בין משך היום לבין התפתחות צמחי נענה, הבא לידי ביטוי בקצב הגדילה, הביומאסה, גובה הצמח והשראת פריחה. במקביל להיותו גורם משמעותי בוויסות היבטים שונים של התפתחות הצמח, לאורך היום מיוחסת השפעה על הרכב השמן האתרי. נמצא כי צמחי נענה מהמין *Mentha piperita* שגודלו בתנאי יום ארוך הכילו שמן אתרי בעל תכולה גבוהה של המרכיבים Menthone ו-Menthol. לעומתם, צמחים שגודלו בתנאי יום קצר הכילו כמויות גבוהות של Menthofuran. כמו כן, הגברת עוצמת האור בליווי טמפרטורה אופטימאלית מביאה לפוטוסינתזה מוגברת, וגורמת להגדלת אספקת הסובסטרטים הזמינים לייצור מרכיבי השמן (Clark and Menary, 1980).

כיוון שלגורמי הסביבה ישנה השפעה על ההתפתחות והמורפולוגיה של הצמח, קשה להבחין מהי השפעתם על פרופיל השמן האתרי. לכן צריך לבדוד כל גורם בנפרד, בכדי לזהות את השפעתו הישירה או השפעות הגומלין שלו עם גורמים סביבתיים על הרכב או תכולת השמן האתרי (דודאי וחובריו, 1994). לדוגמא, אורך היום משפיע על פריחת האזוב המצוי (*Origanum syriacum*), והפריחה משפיעה על תכולת השמן האתרי בצמח זה (Dudai et. al., 1992).

על מנת להפריד בין השפעת הגורמים השונים על פרופיל השמן האתרי, יש לגדל את הצמחים בתנאים אחידים ומבוקרים (חממה, פיטוטרון), בהם יש שילוב בין משטרי הטמפרטורה למשטרי אורך היום. תנאי הגידול השונים בפיטוטרון מדמים את עונות השנה, וכך מנוטרלת השפעתם של גורמים סביבתיים אחרים אליהם חשוף הצמח הגדל בבר או בשדה. בנוסף, ניתן לנטר את התפתחותם המורפולוגית והפנולוגית של הצמחים בקורלציה להרכב השמן. כך ניתן לבחון השפעות נוספות על מאפייני השמן האתרי, ולאפשר אפיון מקיף של הפרופיל הכימי הייחודי של טיפוסים כימיים נתונים. דוגמא לגידול בפיטוטרון לבדיקת השפעת אורך היום והטמפרטורה על

פרופיל השמן האתרי ניתן למצוא באזוב המצוי (*Origanum syriacum*), בו הוכח כי טמפרטורה גבוהה גרמה לעלייה בתכולת השמן האתרי בצמח (Dudai et. al., 1992).

כאמור, גם לגורמים ביולוגיים התפתחותיים ישנה השפעה על הרכב ותכולת השמן האתרי בצמח. גיל הרקמה הצמחית משפיע על הרכב השמן המוכל בה. דוגמא לכך היא גיל העלים לאורך ענף. העלים התחתונים נוצרים בשלב מוקדם יותר, לכן הם נחשבים לעלים הזקנים. עם העלייה לכיוון הקודקוד, נוצרו עליים בשלב מאוחר יותר, לכן הם העלים הצעירים. בעלים צעירים מכיל השמן האתרי כמויות גבוהות יותר של קדמים (פרקורסורים) במסלול הביוסינתטי, ואילו בעלים מבוגרים המרכיבים העיקריים הם תוצרים סופיים (דודאי וחוברין, 1994). דוגמא לכך היא הזוטה הלבנה (*Micromeria fruticosa*), בה נמצא כי Pulegone מהווה מרכיב עיקרי בעלים הצעירים, ו- Isomenthol, המשכו במסלול הביוסינתטי, מהווה מרכיב עיקרי בעלים הבוגרים (Dudai et. al., 2001). כמו כן, בבדיקת הרכב השמן האתרי בעלים שונים לאורך הגבעול בצמחי נענה חריפה (*Mentha piperita*), נמצא כי העלים הצעירים הכילו בעיקר את המרכיבים Pulegone ו- Menthofuran. לעומתם, עליים בוגרים הכילו Menthone, Menthol ו- Menthyl acetate (Viorin et. al., 1990). השינוי בעמדת העלים משנה גם את תכולת השמן האתרי. בצמחים רבים, עם גדילת העלה ישנה ירידה בתכולה היחסית של השמן האתרי הנובעת מעליה בגודל העלה. יחד עם זאת, ישנה עליה בכמות המוחלטת של השמן האתרי, עד לנקודה בה נפסק סנתוז השמן האתרי בעלה או נפסקת היווצרות בלוטות חדשות, ואז התכולה המוחלטת יורדת גם היא (Dudai, 2005).

במחקר בו נבדק הקשר בין מדדים מורפולוגיים לתכונות השמן האתרי בנענה, נמצא כי יש התאמה בין ערכים גבוהים של קוטר ואורך הגבעול, ושל אורך ורוחב העלה לתכולת השמן האתרי בצמח (Mirzaie-Nodushan et. al., 2001). גורם נוסף המשפיע על תכולת השמן הכוללת בצמח הינו מספרן וצפיפותן של השערות הבלוטיות בהן מיוצר ונאגר השמן האתרי (רביד וורקר, 1994).

שיטות וחומרים

1. החומר הצמחי

אוכלוסיות טבעיות של כתלה חריפה (*Chiliadenus* (syn. *Varthemia*) *iphionoides* (Boiss. et Blanche (Brullo), נאספו מצפון הארץ לדרומה, בדרך כלל באזורים הרריים העשירים בגיר. איתור האוכלוסיות בנגב התבצע בסיועו של פרופ' אבינעם דנין. בהתאם לגודל האוכלוסייה בכל נקודת איסוף, נאספו בכל אחת מהן בין שישה לעשרה צמחים, כאשר החלק הנאסף הוא החלק העל קרקעי בלבד. לעיתים (בהתאם לגודל האוכלוסיה) נעקר צמח שלם ונשתל בעציץ כדי לגדלו בחממה בנווה יער.

2. הפקת שמן אתרי

2.1 זיקוק

דוגמאות של חומר צמחי (עלים וגבעולים) במשקל של לפחות 250 גרם זוקקו במערכת מעבדתית מטיפוס קלוונג'ר (Clevenger 1928). כל דוגמא הוכנסה לגולת זיקוק בנפח של 2 ליטר והוספה אליה מים בגובה של כ-1/3 מגובה החומר הצמחי. הדוגמאות חוממו עד לרתיחה ושהו במצב זה במשך כשעה וחצי. המים והשמן האתרי עברו עיבוי ונאספו במלכודת. כמות השמן האתרי הצף על פני המים נמדדה באמצעות השנתות על גבי המלכודת. השמן האתרי נאסף בבקבוק זכוכית ונשמר בקירור, בטמפרטורה של 4°C. לצורך הזרקת דוגמא למערכת גז כרומטוגרף ספקטרומטר המסות (GC-MS), נלקחה דוגמא של 30 מיקרוליטר שמן אתרי, והוספה לתוך 1 מ"ל (40°-60°) Petroleum Ether (BIO LAB). גם הדוגמאות האלה נשמרו בקירור, בטמפרטורה של 4°C, עד להזרקתן למערכת GC-MS (סעיף 3 להלן).

2.2 מיצוי

דוגמאות צמחיות (עלים, גבעולים, ניצנים ופרחים) במשקל הנע בין 0.3 ל-1 גרם הוכנסו לבקבוקי סינטילציה מזכוכית, סגורים הרמטית, בנפח של 20 מ"ל. לכל דוגמא הוסף ממס אורגני Isobutyl methyl tert butyl ether (MTBE) (99.8%) (BIO-LAB) אשר הכיל סטנדרט פנימי Isobutyl benzene (IBB) (Aldrich) בריכוז של 10 מיקרוגרם למ"ל, על מנת לבצע חישוב כמותי (Dudai et.al. 2001). היחס במיצוי היה 1 גרם חומר צמחי, ל-10 מ"ל נפח ממס. המיצוי נערך במשך כ-24 שעות בטלטול עדין. בגמר המיצוי, עברו הדוגמאות ניקוי על ידי העברתם דרך פיפטת פסטר המכילה Sodium sulfate anhydrous (Merk) ו-Silica gel 60 (230-400 mesh) (Merk), לצורך ייבוש וסינון חומרים פולאריים ובעלי משקל מולקולארי גבוהה (כדוגמת כלורופיל), בהתאמה. בגמר הניקוי, נאספה כל דוגמא בבקבוק זכוכית בנפח 2 מ"ל הסגור במכסה טפלון, ונשמרה בקירור, בטמפרטורה של 4°C, עד להזרקתה למערכת GC-MS (סעיף 3 להלן).

Solid Phase Micro Extraction (SPME) 2.3

בשיטה זו נדגמה האווירה בתוך בקבוק אטום המכיל דוגמא צמחית (Wardencki et. al. 2004). החומרים בפאזה הגזית נספחים למצע מוצק המצפה מעין מחט, המוחדרת לבקבוק ולאחר מכן למערכת ה-GC-MS.

המחט מסוג PDMS (Polydimethylsiloxane) / DVB (divinylbenzene), בעלת פולאריות בינונית ועובי ציפוי של 65µm (cat: 57310-U) (Supelco, PA, USA).

לכל בקבוק זכוכית בנפח 20 מ"ל הוכנסה דוגמא צמחית של כ-1 גרם. הבקבוק נאטם באמצעות פקק עם ספטה המאפשרת את חדירת המחט לתוך הבקבוק. לאחר החדרתה לבקבוק, שהתה המחט במצב פתוח למשך 30 דקות לצורך דגימת האווירה, ומיד לאחר מכן הוחדרה ל-GC-MS (סעיף 3 להלן).

3. הפרדה וזיהוי חומרים נדיפים בגז כרומטוגרף ספקטרומטר המסות (GC-MS).

דוגמאות ה-SPME או דוגמאות של 1 מיקרוליטר שהתקבלו על ידי תהליכי המינצוי והזיקוק המתוארים לעיל נבדקו במערכת GC-MS ממחושבת מטיפוס GC-6890N, המצוידת בגלאי מטיפוס Mass selective (MS)-5973 Network (Electron ionization 70eV) חברת Agilent Technologies (CA,USA). במכשיר ה-GC-MS הותקנה עמודת סיליקה קפילרית מטיפוס Rtx-5Sil MS (Restek Corporation, State College, PA) (30m x 0.25mm i.d x 0.25mm). הגז הנושא - הליום הוזרם בזרם קבוע של 1 מ"ל לדקה. דוגמאות המינצוי הוזרקו במצב "ללא פיצול" (Splitless) ואילו דוגמאות השמן וה-SPME הוזרקו במצב פיצול הדוגמא (Split) ביחס 1:50. טמפרטורת ההזרקה עמדה על 250°C, טמפרטורת הטרנספר ליין נקבעה על 280°C, וטמפרטורת הגלאי נקבעה על 280°C. גרדיאנט הטמפרטורה בעמודה נקבע על 50°C למשך דקה, תוספת של 5°C לדקה עד 200°C, לאחר מכן תוספת של 15°C לדקה עד 260°C, ו-260°C למשך 10 דקות. טווח איסוף הנתונים היה 41-450 m/z.

זיהוי המרכיבים נעשה באמצעות השוואת ערך זמני היציאה (RI) של המרכיבים לאלו של סטנדרטים מסחריים, ובאמצעות השוואת ספקטרום היונים של המרכיבים לאלו המצויים בספריות ה-MS: NIST 98, Adams 2001, ו-QuadLib 1607.

4. הפרדת השמן האתרי למקטעים באמצעות כרומטוגרפיה בעמודת זכוכית Flash

Chromatography

המקטעים מן השמן האתרי בודדו באמצעות כרומטוגרפיה על עמודת זכוכית (Ikan 1991) בעלת גולה בנפח של 1 ליטר בראשה, המכילה 250 גרם אבקת Silica gel 60 (230-400 mesh) (Merk), על ידי הרצה עם ריכוזים עולים של Ethyl acetate (BIO LAB) ב-Petroleum ether.

(40°-60°) (BIO LAB) . כמות הדגימה להפרדה הייתה 8 מ"ל שמן אתרי. בכל פעם הוספו אל ראש העמודה 400 מ"ל תערובת ממסים בעלת פולאריות הולכת וגדלה (1%-21% Ethyl acetate), לצורך הפרדת השמן למקטעים הנבדלים זה מזה בהרכבם.

נפח אלוציה של 80 מ"ל נאסף כל 10 דקות אל בקבוקי ארלנמייר מזכוכית בנפח של 100 מ"ל, בלחץ חנקן של 2 אטמוספרות. לאחר לקיחת דגימה של 1 מ"ל להזרקה ב- GC-MS (סעיף 3), רוכזה כל דגימה באמצעות Turbo Vap Concentrator עד לנפח של 1 מ"ל, ונשמרה בקירור, בטמפרטורה של 4°C. לשם הכנת דוגמא לבדיקה ב-NMR, אוחדו המקטעים המתאימים ורוכזו שוב באמצעות נידוף בעזרת מכשיר Turbo Vap Concentrator. לאחר מכן נודף הממס הנותר באמצעות הזרמת חנקן בצורה ידנית על הדוגמא. הדוגמא נשקלה לפני הנידוף בחנקן ואחריו על מנת לוודא שאכן נודף הממס עד תום.

תוצאות

1. הרכב השמן האתרי של אוכלוסיות בר של כתלה חריפה בישראל

1.1 סקר אוכלוסיות בר של כתלה חריפה בישראל

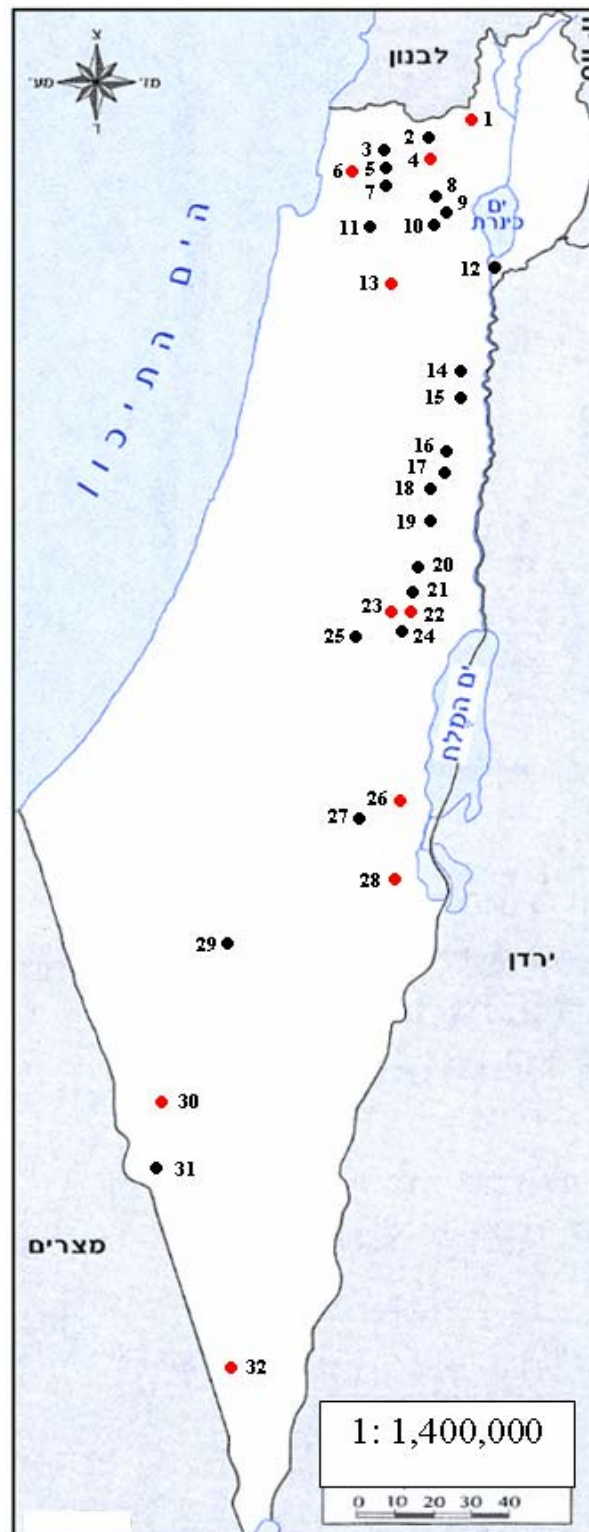
על מנת לאפיין את השמן האתרי של הכתלה החריפה בישראל, בוצע סקר אוכלוסיות בר ברחבי הארץ (טבלה מס' 1). כידוע, הצמח גדל באזורים סלעיים (בעיקר סלעי גיר), לכן דיגום הצמחים התבצע באזורים הרריים, או עשירים בסלעי גיר מצפון הארץ ועד דרומה (איור מס' 2). הסקר בוצע בחודשים מאי-יוני, טרם מועד הפריחה החל באוקטובר. סה"כ נדגמו כ- 32 אוכלוסיות, ומכל אוכלוסיה נדגמו 6-10 פרטים, בהתאם לגודל האוכלוסייה. בבחינת הרכב השמן האתרי (מיצוי ב-MTBE) (נספח מס' 1) נראה כי בניגוד לתוצאות שהתפרסמו במחקרים בירדן (Avato et. al., 2004), ישנם שבעה מרכיבים עיקריים: 1,8-Cineole, Camphor, Borneol, Chrysanthemic acid, Unknown 29, t-Cadinol ו-Intermedeol. כמו כן, נמצאו עדויות לקשר בין מיקום האוכלוסייה בארץ לבין הרכב השמן האתרי שלה. לכן, נבחרו אוכלוסיות מייצגות לבדיקת שאלה זו, על בסיס בדיקה מפורטת כמותית של התפלגות המרכיבים השונים בין האוכלוסיות השונות לפי מיקומן הגיאוגרפי.

טבלה מס' 1: אוכלוסיות בר של כתלה חריפה שנדגמו בישראל

מספר	שם אוכלוסיה	מיקום	
		N	E
17	גיתית	32 06	35 23
18	צומת 505	32 05	35 21
19	כוכב השחר	31 57	35 20
20	אלון	31 49	35 20
21	עין פואר	31 49	35 19
22	נופי פרט	31 49	35 17
23	כפר אדומים	31 47	35 19
24	מישור אדומים	31 46	35 17
25	גבעת רם	31 46	35 11
26	המכתש הקטן	31 21	35 18
27	ערד	31 15	35 12
28	נחל זהר	31 09	35 14
29	נחל הרועה	30 57	34 40
30	הר רמון	30 35	34 39
31	הר שגיא	30 23	34 36
32	צומת סיירים	29 49	34 51

מספר	שם אוכלוסיה	מיקום	
		N	E
1	נחל קדש	33 06	35 32
2	קיבוץ יראון	33 04	35 27
3	צומת פלך	32 58	35 15
4	נחל מירון	32 57	35 29
5	כרמיאל	32 55	35 16
6	קיבוץ יסעור	32 54	35 10
7	יודפת	32 49	35 17
8	עין כמונים	32 54	35 27
9	צומת צלמון	32 51	35 28
10	מצפה נטופה	32 50	35 22
11	אלון הגליל	32 46	35 14
12	חמת גדר	32 41	35 37
13	גן נר	32 31	35 20
14	רותם	32 20	35 33
15	רועי	32 14	35 29
16	חמרה	32 11	35 26

איור מס' 2: מפת מיקום אוכלוסיות כתלה חריפה שנדגמו בישראל



● נקודת דיגום אוכלוסיות ● נקודת דיגום אוכלוסיות נבחרות

1.2 הרכב השמן האתרי באוכלוסיות נבחרות של כתלה חריפה בישראל

מתוך 32 האוכלוסיות נבחרו 10 אוכלוסיות מייצגות על פי מיקומן, ובהתאם לטופוגרפיה ולאקלים (איור מס' 2): הגליל העליון, הר מירון, מישור החוף הצפוני, עמק יזרעאל, הרי השומרון, צפון הנגב, הר הנגב הגבוה ודרום הנגב. מכל פרט נלקחה דוגמא למיצוי ב-MTBE ובנדיקה ב-GC-MS. בטבלאות הבאות מוצגים מרכיבים אשר תכולתם בשמן האתרי עולה על 1%. בכל אוכלוסיה נבדקו 10 צמחים שונים.

טבלה מס' 2: תכולה יחסית (%) של מרכיבי השמן האתרי העיקריים באוכלוסיית בר בנחל קדש

אכלוסיה מרכיב	נחל קדש						
	1	2	3	4	5	6	ממוצע
α -Pinene	1.31	0.86	1.01	1.52	1.13	1.37	1.20 $\pm$ 0.24
Sabinene	1.74	0.57	0.73	1.18	1.01	1.37	1.10 $\pm$ 0.43
β -Pinene	1.46	0.86	0.98	1.47	1.11	1.44	1.22 $\pm$ 0.27
5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene	0.76	1.75	1.03	1.12	1.56	1.17	1.23 $\pm$ 0.36
para-Cymene	0.75	0.90	1.21	1.17	1.25	0.72	1.00 $\pm$ 0.24
1,8-Cineole	10.89	9.45	9.63	12.39	10.06	11.12	10.59 $\pm$ 1.11
(E)-Chrysanthemol	4.01	3.96	5.64	3.22	3.85	6.12	4.46 $\pm$ 1.14
Lavandulol	1.95	1.71	1.44	1.68	1.10	2.43	1.72 $\pm$ 0.45
Borneol	12.31	22.56	14.36	23.55	15.63	18.72	17.86 $\pm$ 4.54
α -Terpineol	2.99	1.46	1.98	2.22	2.09	2.57	2.22 $\pm$ 0.52
Isobornyl formate	0.30	0.64	0.72	0.98	1.61	1.76	1.00 $\pm$ 0.58
Unknown 8	0.98	0.03	1.23	1.43	1.10	1.64	1.07 $\pm$ 0.56
Chrysanthemic acid	3.31	1.62	3.71	2.29	7.06	3.87	3.64 $\pm$ 1.89
allo-Aromadendrene	2.00	2.22	2.16	2.50	2.03	1.92	2.14 $\pm$ 0.21
Fokienol	2.52	3.34	3.25	3.10	2.28	2.44	2.82 $\pm$ 0.46
γ -Eudesmol	3.52	1.39	1.04	0.55	1.68	1.59	1.63 $\pm$ 1.01
τ -Cadinol	24.90	22.10	20.71	20.02	17.10	18.02	20.48 $\pm$ 2.82
Unknown 67	1.18	1.62	1.62	0.60	1.99	1.90	1.48 $\pm$ 0.52
Unknown 73	0.87	1.65	0.91	1.26	0.87	0.90	1.08 $\pm$ 0.32
Unknown 74	2.05	3.14	1.75	2.49	1.72	1.71	2.14 $\pm$ 0.57
Unknown 75	2.55	1.10	2.02	0.72	1.18	0.41	1.33 $\pm$ 0.81
תכולת שאר המרכיבים המזוהים	11.93	9.55	12.93	9.44	12.78	11.11	11.29
תכולת שאר המרכיבים הלא מזוהים	5.70	7.53	9.90	5.08	9.80	5.72	7.29
אחוז שמן אתרי בצמח	1.61	0.80	1.46	1.26	1.60	1.28	1.33 $\pm$ 0.30

טבלה מס' 3: תכולה יחסית (%) של מרכיבי השמן האתרי העיקריים באוכלוסיית בר בנחל מירון

אכלוסיה מרכיב	נחל מירון						
	1	2	3	4	5	6	ממוצע
Santolina triene	1.33	1.63	0.86	1.21	0.59	0.68	1.05 ± 0.41
α-Pinene	1.87	1.35	1.12	1.24	2.11	2.03	1.62 ± 0.43
Sabinene	2.47	1.90	1.49	1.57	2.51	2.61	2.09 ± 0.50
β-Pinene	1.67	1.35	1.22	1.41	1.61	1.78	1.51 ± 0.22
para-Cymene	2.08	1.95	1.07	1.58	2.03	1.46	1.70 ± 0.39
1,8-Cineole	24.39	17.72	15.85	14.50	23.45	20.18	19.35 ± 4.03
cis-Sabinene hydrate	1.18	0.97	0.71	0.81	1.21	1.09	1.00 ± 0.20
trans-Sabinene hydrate	1.52	1.15	0.85	0.95	1.50	1.49	1.24 ± 0.30
(E)-Chrysanthemol	3.02	1.24	1.30	0.92	1.50	2.35	1.72 ± 0.80
Borneol	0.11	0.09	11.37	11.61	1.09	0.07	4.06 ± 5.77
Unknown 5	1.83	1.15	0.77	0.32	0.78	1.18	1.00 ± 0.51
α-Terpineol	4.19	2.97	2.32	2.51	4.13	4.34	3.41 ± 0.92
Chrysanthemic acid	11.10	17.11	12.47	16.16	11.25	7.31	12.57 ± 3.61
Lavandulyl acetate	0.00	1.75	1.93	1.60	0.71	0.18	1.03 ± 0.84
Unknown 24	0.00	2.06	2.19	1.97	0.97	0.00	1.20 ± 1.02
Unknown 29	0.78	1.43	1.09	2.73	0.89	0.01	1.15 ± 0.90
allo-Aromadendrene	1.96	2.02	2.41	2.13	2.37	2.43	2.22 ± 0.21
Fokienol	1.26	1.67	1.08	1.03	1.72	0.08	1.14 ± 0.60
γ-Eudesmol	1.38	1.28	0.65	0.30	0.43	2.49	1.09 ± 0.82
τ-Cadinol	16.65	15.66	18.73	15.65	17.93	22.71	17.89 ± 2.66
Unknown 67	1.38	5.41	0.99	1.50	2.09	4.49	2.64 ± 1.84
Unknown 74	2.79	2.06	3.14	2.20	2.60	1.89	2.45 ± 0.48
Unknown 75	0.86	1.26	0.92	0.94	0.79	2.96	1.29 ± 0.83
תכולת שאר המרכיבים המזוהים	9.40	8.98	9.33	8.88	10.57	11.41	9.76
תכולת שאר המרכיבים הלא מזוהים	6.76	5.85	6.13	6.29	5.17	4.77	5.83
אחוז שמן אתרי בצמח	0.47	0.60	0.47	1.05	0.57	0.64	0.63 ± 0.22

טבלה מס' 4 : תכולה יחסית (%) של מרכיבי השמן האתרי העיקריים באוכלוסיית בר בקיבוץ יסעור

אוכלוסיה מרכיב	יסעור						
	1	2	3	4	5	6	ממוצע
5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene	2.76	1.28	1.75	2.59	3.25	2.47	2.35 ± 0.71
1,8-Cineole	6.34	10.90	9.23	9.70	7.62	10.83	9.10 ± 1.81
(E)-Chrysanthemol	3.52	3.85	2.46	2.95	2.73	3.15	3.11 ± 0.51
α-Terpineol	1.70	3.00	2.61	2.07	1.49	2.56	2.24 ± 0.58
Unknown 8	1.56	1.24	1.39	1.14	1.73	1.55	1.43 ± 0.22
Chrysanthemic acid	39.25	24.05	31.73	27.57	35.18	32.71	31.75 ± 5.40
Lavandulyl acetate	1.51	2.78	2.40	2.90	2.17	2.70	2.41 ± 0.52
Unknown 21	1.09	1.13	0.83	1.20	1.14	1.23	1.10 ± 0.14
Neryl acetate	0.68	1.97	1.03	1.23	1.39	1.14	1.24 ± 0.43
Unknown 24	1.24	1.93	2.29	3.36	2.01	2.46	2.21 ± 0.70
Unknown 29	6.41	2.01	3.42	5.46	6.99	4.92	4.87 ± 1.87
Unknown 34	0.77	0.84	0.96	1.82	1.07	1.69	1.19 ± 0.45
Unknown 36	0.60	0.96	0.79	1.21	1.52	1.14	1.04 ± 0.33
Unknown 45	0.43	1.05	0.90	0.98	1.61	1.01	1.00 ± 0.38
Fokienol	1.43	1.47	1.76	1.95	1.39	1.39	1.56 ± 0.23
γ-Eudesmol	2.69	2.11	0.83	1.50	0.92	1.99	1.67 ± 0.73
τ-Cadinol	6.24	14.25	13.44	10.35	10.10	6.07	10.08 ± 3.45
Unknown 67	3.54	3.00	1.21	1.35	2.32	2.73	2.36 ± 0.93
Unknown 74	0.76	1.16	1.68	1.66	1.31	0.76	1.22 ± 0.41
Unknown 75	2.67	2.30	2.78	2.77	0.60	1.66	2.13 ± 0.86
תכולת שאר המרכיבים המזוהים	10.63	14.67	12.29	10.81	9.40	11.85	11.61
תכולת שאר המרכיבים הלא מזוהים	4.19	4.04	4.23	5.42	4.06	3.99	4.32
אחוז שמן אתרי בצמח	1.88	1.41	1.78	1.30	1.36	1.33	1.51 ± 0.25

טבלה מס' 5: תכולה יחסית (%) של מרכיבי השמן האתרי העיקריים באוכלוסיית בר ביישוב גן נר

אוכלוסיה מרכיב	גן נר						
	1	2	3	4	5	6	ממוצע
5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene	1.19	2.16	1.77	1.27	2.57	1.75	1.78 ± 0.53
1,8-Cineole	8.57	7.62	7.52	10.63	5.89	8.11	8.06 ± 1.55
(E)-Chrysanthemol	3.12	4.30	7.03	5.23	2.17	6.15	4.67 ± 1.84
Lavandulol	0.72	1.13	2.56	0.96	1.82	0.72	1.32 ± 0.73
Borneol	9.67	0.05	0.04	0.16	5.29	0.26	2.58 ± 4.04
Unknown 5	0.80	1.02	1.26	1.51	0.72	1.72	1.17 ± 0.40
α-Terpineol	2.20	1.77	1.91	2.60	1.22	2.00	1.95 ± 0.46
Unknown 8	0.92	1.32	2.63	1.47	2.29	1.60	1.70 ± 0.64
Chrysanthemic acid	22.67	35.55	31.62	16.61	38.16	22.22	27.80 ± 8.54
Lavandulyl acetate	2.43	3.29	0.00	2.10	0.52	3.41	1.96 ± 1.42
Unknown 21	0.58	0.93	1.23	1.72	0.00	1.77	1.04 ± 0.68
Neryl acetate	2.08	2.26	0.00	2.36	0.00	1.77	1.41 ± 1.11
Unknown 24	1.44	2.23	0.00	1.53	0.00	2.91	1.35 ± 1.17
Unknown 29	2.26	5.58	3.52	1.84	6.69	2.79	3.78 ± 1.94
Fokienol	3.33	2.34	2.45	2.46	2.04	1.83	2.41 ± 0.51
Unknown 61	0.87	1.30	1.24	1.50	0.76	1.21	1.15 ± 0.28
γ-Eudesmol	3.06	1.84	2.01	3.84	0.86	3.48	2.51 ± 1.13
τ-Cadinol	8.84	0.00	8.58	8.83	10.91	9.04	7.70 ± 3.87
Unknown 67	1.84	3.40	4.61	1.60	1.38	2.11	2.49 ± 1.26
Unknown 74	0.99	0.00	0.95	1.22	1.50	1.44	1.02 ± 0.55
Unknown 75	2.27	3.88	3.19	6.58	1.07	2.09	3.18 ± 1.93
תכולת שאר המרכיבים המזוהים	13.73	7.59	11.86	12.60	10.41	10.15	11.06
תכולת שאר המרכיבים הלא מזוהים	6.41	10.44	4.04	11.37	3.72	11.49	7.91
אחוז שמן אתרי בצמח	1.62	1.79	1.41	1.69	2.44	1.55	1.75 ± 0.36

טבלה מס' 6: תכולה יחסית (%) של מרכיבי השמן האתרי העיקריים באוכלוסיית בר בתצפית נופי פרת

אוקלוסיה מרכיב	נופי פרת										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	ממוצע
Sabinene	0.55	1.19	0.84	1.26	0.93	0.52	0.70	2.22	0.93	1.08	1.02 ± 0.49
5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene	1.64	0.59	0.70	1.28	1.17	0.71	1.72	1.60	1.04	1.17	1.16 ± 0.41
1,8-Cineole	8.14	9.19	7.87	13.17	11.45	5.11	6.30	16.29	8.62	9.44	9.56 ± 3.30
trans-Chrysanthemol	2.01	0.38	0.87	1.67	1.15	1.59	1.75	2.83	0.94	0.54	1.37 ± 0.74
Borneol	7.13	4.79	8.22	0.26	0.06	14.34	9.45	0.15	10.49	11.73	6.66 ± 5.17
α-Terpineol	1.13	1.10	1.10	2.07	1.25	0.62	1.02	3.17	1.48	1.18	1.41 ± 0.72
Lavandulyl acetate	1.91	0.97	1.09	1.63	2.11	2.09	2.04	2.05	1.74	1.99	1.76 ± 0.42
Bornyl acetate	1.89	2.58	3.09	0.00	0.00	0.67	0.00	0.00	0.35	2.42	1.10 ± 1.25
Chrysanthemic acid	7.45	6.51	5.93	8.69	20.39	7.50	24.24	20.27	9.20	13.95	12.41 ± 6.81
Neryl acetate	0.89	2.20	1.50	2.27	2.50	1.21	0.88	3.29	1.35	1.83	1.79 ± 0.78
Unknown 24	2.25	0.95	1.06	1.39	2.13	1.74	1.93	1.33	1.73	2.14	1.67 ± 0.46
Unknown 29	4.10	1.94	2.67	3.37	4.24	2.55	5.30	4.43	2.97	4.32	3.59 ± 1.05
Unknown 34	1.62	0.77	0.86	0.97	1.71	1.43	1.44	0.97	1.21	1.73	1.27 ± 0.36
Unknown 36	1.06	1.92	1.54	2.10	2.20	0.94	0.78	2.66	1.66	1.81	1.67 ± 0.60
Unknown 45	1.13	2.10	1.73	2.28	2.45	1.09	0.84	2.83	1.68	2.04	1.82 ± 0.65
Fokienol	1.02	1.06	0.88	2.41	2.34	0.93	1.53	3.32	1.62	2.25	1.74 ± 0.81
Hexadecane	0.58	1.31	1.09	0.80	1.40	1.20	0.82	0.89	0.80	1.42	1.03 ± 0.29
Unknown 57	1.05	1.57	0.90	1.15	1.29	0.96	1.34	0.79	1.39	0.92	1.14 ± 0.25
τ-Cadinol	6.27	8.00	8.26	7.63	14.43	7.47	8.72	0.00	10.21	12.86	8.39 ± 3.89
Unknown 67	1.44	1.21	0.63	5.18	0.82	1.15	1.35	2.81	3.32	0.53	1.84 ± 1.48
Intermedeol	26.83	31.34	28.87	15.73	0.00	31.74	9.54	0.00	16.36	0.00	16.04 ± 13.23
Unknown 73	1.04	1.24	1.48	1.36	2.85	1.55	1.64	0.00	1.92	2.43	1.55 ± 0.78
Unknown 74	1.18	1.05	1.32	1.11	1.81	0.82	1.08	0.00	1.58	1.80	1.17 ± 0.53
תכולת שאר המרכיבים המזוהים	7.87	10.48	10.09	11.35	11.44	6.56	8.34	15.23	9.15	12.41	10.29
תכולת שאר המרכיבים הלא מזוהים	9.82	5.59	7.41	10.87	9.89	5.50	7.28	12.88	8.24	8.01	8.55
אחוז שמן אתרי בצמח	1.85	1.77	2.31	1.55	1.59	2.10	1.94	1.44	1.62	1.71	1.79 ± 0.27

טבלה מס' 7: תכולה יחסית (%) של מרכיבי השמן האתרי העיקריים באוכלוסיית בר בכפר אדומים

מרכיב \ אוכלוסיה	כפר אדומים						
	1	2	3	4	5	6	ממוצע
α -Pinene	2.85	1.53	1.45	1.50	1.82	1.53	1.78 $\pm$ 0.54
Sabinene	4.51	2.05	2.14	2.80	2.85	1.79	2.69 $\pm$ 0.99
β -Pinene	2.90	1.57	1.35	1.53	1.96	1.58	1.82 $\pm$ 0.57
para-Cymene	1.95	1.27	0.80	1.08	0.95	0.76	1.14 $\pm$ 0.44
1,8-Cineole	19.06	13.63	11.08	11.97	13.04	12.72	13.58 $\pm$ 2.83
Borneol	0.00	19.76	8.93	7.35	13.37	17.17	11.10 $\pm$ 7.20
α -Terpineol	3.26	1.58	1.13	2.22	2.19	1.77	2.03 $\pm$ 0.73
Isobornyl formate	0.00	1.42	0.42	1.55	0.17	2.95	1.08 $\pm$ 1.12
Chrysanthemic acid	1.05	0.00	0.31	1.15	4.12	4.45	1.85 $\pm$ 1.94
Lavandulyl acetate	1.39	0.50	0.86	1.21	1.50	1.34	1.13 $\pm$ 0.38
Neryl acetate	1.76	1.72	1.04	1.68	1.88	1.42	1.58 $\pm$ 0.31
Unknown 36	2.67	2.28	1.32	1.99	2.12	2.21	2.10 $\pm$ 0.45
Unknown 45	1.72	1.72	0.93	1.25	1.35	1.39	1.39 $\pm$ 0.30
γ -Cadinene	0.31	0.93	1.13	2.59	0.91	0.81	1.11 $\pm$ 0.77
Fokienol	4.65	2.55	3.25	5.55	5.12	3.13	4.04 $\pm$ 1.22
Hexadecane	1.97	2.60	1.60	1.43	1.64	1.33	1.77 $\pm$ 0.47
γ -Eudesmol	1.25	0.64	0.44	3.52	0.00	0.78	1.10 $\pm$ 1.25
τ -Cadinol	6.85	14.10	10.73	15.71	13.85	10.78	12.01 $\pm$ 3.20
Unknown 67	1.44	5.87	1.74	4.86	2.58	4.47	3.49 $\pm$ 1.82
Intermedeol	12.97	0.33	26.11	0.15	0.00	0.00	6.59 $\pm$ 10.85
Unknown 73	1.14	2.40	1.59	2.10	2.58	1.82	1.94 $\pm$ 0.53
Unknown 74	0.66	1.83	1.35	1.50	1.37	1.26	1.33 $\pm$ 0.38
תכולת שאר המרכיבים המזוהים	15.93	12.02	12.97	16.12	14.06	14.40	14.25
תכולת שאר המרכיבים הלא מזוהים	9.69	7.67	7.32	9.20	10.57	10.12	9.10
אחוז שמן אתרי בצמח	1.31	0.90	1.32	1.29	1.20	1.26	1.21 $\pm$ 0.16

טבלה מס' 8: תכולה יחסית (%) של מרכיבי השמן האתרי העיקריים באוכלוסיית בר במכתש הקטן

אוקלסיה מרכיב	המכתש הקטן						
	1	2	3	4	5	6	ממוצע
a-Pinene	11.11	12.28	9.92	12.74	10.76	11.22	11.34 ± 1.03
Camphene	5.29	6.61	5.25	6.78	5.20	6.28	5.90 ± 0.74
b-Pinene	1.34	1.11	1.02	1.11	1.44	1.23	1.21 ± 0.16
1,8-Cineole	4.22	0.23	3.15	0.17	5.57	3.75	2.85 ± 2.20
Camphor	41.89	48.92	42.23	48.77	44.91	46.00	45.45 ± 3.05
Borneol	1.67	3.62	3.09	2.27	2.74	2.16	2.59 ± 0.70
a-Terpineol	1.57	2.43	0.94	2.00	1.15	1.02	1.52 ± 0.60
Tetradecane	0.87	0.89	1.26	1.16	1.36	1.14	1.11 ± 0.20
Fokienol	8.16	3.56	5.85	4.77	5.40	3.68	5.24 ± 1.70
Hexadecane	1.67	1.78	2.35	2.18	2.63	2.20	2.13 ± 0.36
Unknown 61	0.85	0.92	1.87	1.11	0.84	0.95	1.09 ± 0.40
g-Eudesmol	2.79	0.00	0.00	0.00	0.00	5.87	1.44 ± 2.44
Unknown 67	0.00	1.61	3.00	1.32	1.30	1.38	1.43 ± 0.95
Unknown 71	1.45	1.51	1.43	1.34	1.28	0.61	1.27 ± 0.33
תכולת שאר המרכיבים המזוהים	11.44	7.97	10.10	7.50	10.58	8.23	9.31
תכולת שאר המרכיבים הלא מזוהים	5.64	6.57	8.56	6.80	4.84	4.26	6.11
אחוז שמן אתרי בצמח	1.03	0.99	0.84	0.82	0.76	0.70	0.86 ± 0.13

טבלה מס' 9: תכולה יחסית (%) של מרכיבי השמן האתרי העיקריים באוכלוסיית בר בנחל זוהר

אוקלסיה מרכיב	נחל זוהר						
	1	2	3	4	5	6	ממוצע
Sabinene	1.45	1.05	1.71	2.62	3.46	2.85	2.19 ± 0.93
b-Pinene	0.74	0.51	1.02	1.31	1.63	1.32	1.09 ± 0.41
1,8-Cineole	5.50	4.97	9.60	9.37	12.08	9.85	8.56 ± 2.76
a-Terpineol	1.56	0.60	2.15	2.50	3.46	2.33	2.10 ± 0.96
Chrysanthemic acid	0.08	0.15	12.02	0.17	1.55	1.08	2.51 ± 4.70
Lavandulyl acetate	1.28	2.65	2.81	1.53	2.67	2.50	2.24 ± 0.66
Neryl acetate	2.24	0.74	2.81	2.24	3.19	2.75	2.33 ± 0.86
Unknown 24	0.97	1.92	2.24	1.31	1.61	1.10	1.53 ± 0.49
Unknown 34	0.73	1.53	1.91	0.89	1.27	0.94	1.21 ± 0.45
Unknown 36	2.53	0.73	3.93	2.98	2.88	1.61	2.44 ± 1.12
d-Selinene	1.35	1.68	0.87	1.06	0.86	0.97	1.13 ± 0.32
Unknown 45	1.51	0.52	2.50	1.76	1.89	1.12	1.55 ± 0.68
Fokienol	3.36	3.51	3.07	3.16	4.48	5.12	3.78 ± 0.83
Hexadecane	1.14	3.50	0.82	1.32	1.35	3.07	1.78 ± 1.12
Intermedeol	59.98	58.29	36.79	49.05	38.13	44.96	47.87 ± 9.83
תכולת שאר המרכיבים המזוהים	10.25	12.61	11.06	12.77	14.39	13.53	12.44
תכולת שאר המרכיבים הלא מזוהים	5.32	5.04	4.63	5.96	5.13	4.91	5.16
אחוז שמן אתרי בצמח	0.90	0.54	1.57	0.78	0.70	0.48	0.83 ± 0.39

טבלה מס' 10 : תכולה יחסית (%) של מרכיבי השמן האתרי העיקריים באוכלוסיית בר בהר רמון

אוקלסיה מרכיב	הר רמון						
	1	2	3	4	5	6	ממוצע
a-Pinene	13.09	10.37	11.42	8.91	8.68	12.70	10.86 ± 1.87
Camphene	4.90	5.52	5.57	4.89	4.69	6.34	5.32 ± 0.62
b-Pinene	1.34	0.98	1.33	1.40	1.39	1.05	1.25 ± 0.19
1,8-Cineole	1.91	1.67	0.21	2.74	2.80	0.16	1.58 ± 1.17
Camphor	43.15	52.02	43.55	41.30	38.41	49.66	44.68 ± 5.16
Borneol	2.00	3.41	7.30	3.41	4.24	4.24	4.10 ± 1.77
a-Terpineol	1.27	0.63	3.24	1.40	1.28	0.99	1.47 ± 0.91
Fokienol	3.52	2.02	2.35	3.04	6.63	2.68	3.37 ± 1.68
Unknown 57	2.67	1.71	1.40	4.53	2.52	0.96	2.30 ± 1.27
Unknown 61	1.31	0.67	0.45	1.04	1.95	0.95	1.06 ± 0.53
Unknown 62	1.55	0.95	0.62	1.27	2.30	1.09	1.30 ± 0.58
תכולת שאר המרכיבים המזוהים	11.29	11.09	12.69	11.80	10.57	9.79	11.20
תכולת שאר המרכיבים הלא מזוהים	9.07	6.00	7.39	11.19	11.24	6.83	8.62
אחוז שמן אתרי בצמח	0.84	0.69	0.74	0.90	0.92	0.87	0.83 ± 0.09

טבלה מס' 11: תכולה יחסית (%) של מרכיבי השמן האתרי העיקריים באוכלוסיית בר בצומת סיירים

אוכלוסיה מרכיב	צומת סיירים								
	1	2	3	4	5	6	7	8	ממוצע
a-Pinene	6.36	6.47	5.70	8.34	7.09	7.15	8.33	8.36	7.23 ± 1.03
Camphene	3.57	3.26	2.49	2.84	2.51	3.93	2.29	3.91	3.10 ± 0.66
b-Pinene	0.69	1.11	0.67	1.10	1.32	1.11	1.17	0.88	1.01 ± 0.24
1,8-Cineole	3.44	3.58	2.97	3.91	3.41	3.46	4.47	2.55	3.48 ± 0.57
Camphor	36.61	31.64	33.39	27.24	25.07	38.09	27.41	36.83	32.03 ± 5.01
Borneol	2.06	1.29	0.63	1.21	0.97	3.15	1.14	1.55	1.50 ± 0.79
a-Terpineol	0.71	1.23	0.87	1.39	1.04	0.88	1.23	0.79	1.02 ± 0.24
Unknown 7	2.43	1.77	1.50	0.74	1.01	0.97	1.42	0.93	1.35 ± 0.56
Bornyl acetate	0.13	0.13	4.36	7.32	0.07	0.16	0.00	0.12	1.54 ± 2.77
Fokienol	6.06	8.54	5.16	7.43	7.84	4.35	7.12	4.21	6.34 ± 1.64
Unknown 57	1.11	1.90	1.13	0.80	0.75	2.49	2.24	2.12	1.57 ± 0.69
Unknown 61	4.43	2.81	3.51	1.72	1.81	2.10	3.03	1.75	2.64 ± 0.98
Unknown 62	5.42	3.59	4.28	2.33	2.23	2.40	3.89	2.27	3.30 ± 1.19
g-Eudesmol	0.00	0.00	5.82	9.33	17.62	4.66	0.40	14.46	6.54 ± 6.77
b-Eudesmol	0.00	0.00	1.01	1.14	2.01	1.92	0.00	2.07	1.02 ± 0.93
neo-Intermedeol	1.74	1.78	1.25	0.70	1.34	1.34	3.04	0.99	1.52 ± 0.71
Unknown 71	3.47	3.97	3.43	3.28	3.40	2.32	5.04	1.19	3.26 ± 1.13
תכולת שאר המרכיבים המזוהים	10.50	9.90	9.29	9.50	10.39	9.34	15.33	6.76	10.13
תכולת שאר המרכיבים הלא מזוהים	7.06	12.56	7.93	6.31	6.63	5.58	7.91	5.05	7.38
אחוז שמן אתרי בצמח	0.94	0.98	0.60	0.86	0.77	0.85	0.60	1.27	0.86 ± 0.22

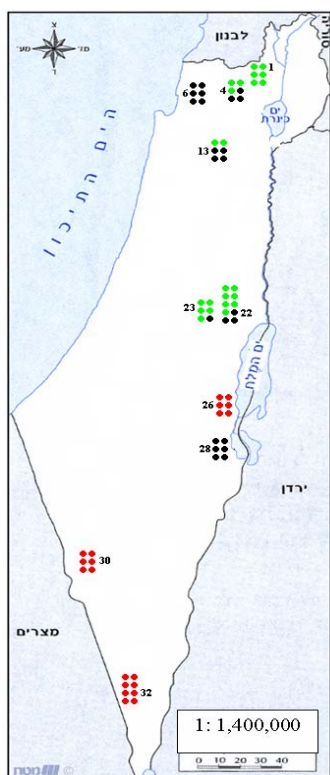
בבדיקת השמן האתרי ממיצוי הצמחים, נמצאו כ- 161 מרכיבים, כאשר 75 מתוכם, רובם מרכיבים מינוריים, אינם מזוהים ע"י ספריות ה-MS (נספח מס' 1). כמו כן, תכולת השמן האתרי בצמח עומדת על כ- 1% בממוצע.

התוצאות מצביעות על שונות רבה בהרכב השמן האתרי בקרב האוכלוסיות השונות (טבלאות מס' 2-11), כך שניתן לסווגן לכימוטיפ שונה בהתאם למרכיב העיקרי. המרכיבים העיקריים בטיפוסי השמן האתרי של כתלה חריפה הינם τ -Cadinol, Camphor, Intermedeol, Chrysanthemic acid, Borneol, ו-1,8-Cineole. בעוד שהמרכיב העיקרי בשמן האתרי באוכלוסיות הדרומיות הינו Camphor, רק אוכלוסיות יהודה, שומרון וצפון הנגב מכילות Intermedeol (איור מס' 3). שאר החומרים מהני"ל מהווים מרכיבים עיקריים באוכלוסיות הצפוניות ובמרכז. מעניין שבאזור ירושלים נמצאה שונות רבה בתוך האוכלוסיות, כנראה בשל העובדה שזהו אזור מפגש בין אזורי התפוצה של הטיפוסים הכימיים השונים.

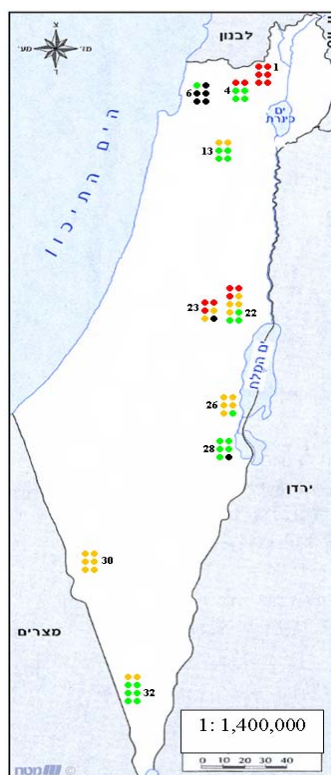
כמו המרכיבים העיקריים, גם מרכיבים אחרים מתפלגים בצורה שונה בין האוכלוסיות (איור מס' 4). ישנם מרכיבים אשר תכולתם בדרום הארץ גבוהה מזו שבצפונה, כגון α -Pinene, ו-Camphene, אשר אינו מצוי כלל בצפון הארץ. לעומת זאת, ישנם מרכיבים כגון Unknown 29 ו- γ -Eudesmol אשר אינם מצויים בנגב (γ -Eudesmol אינו מצוי בנגב מלבד בדרומו). כמו כן, ישנם מרכיבים כדוגמת Fokienol הפזורים בצורה דומה בכל הארץ.

איור מס' 3: התפלגות המרכיבים העיקריים באוכלוסיות המייצגות בארץ. כל נקודה במפה מהווה פרט בודד באוכלוסיה. הצבע מסמל את אחוז המרכיב בשמן האתרי.

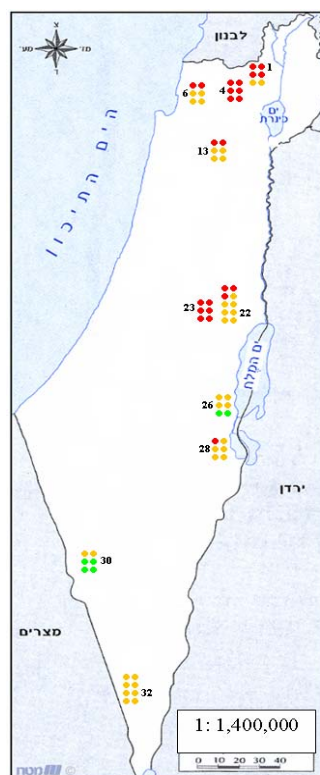
Camphor



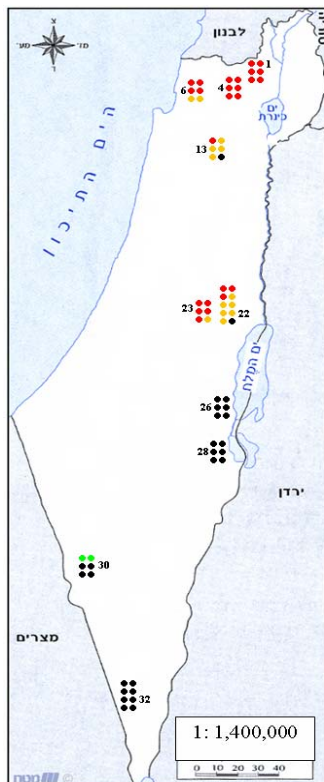
Borneol



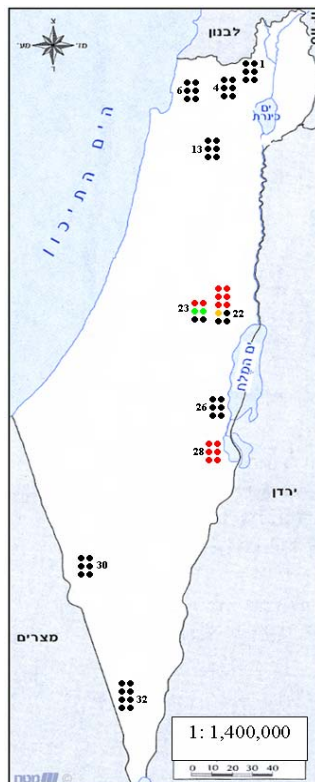
1,8-Cineole



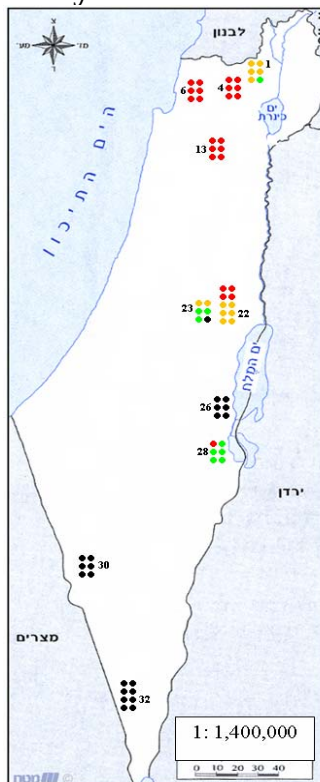
τ -Cadinol



Intermedeol

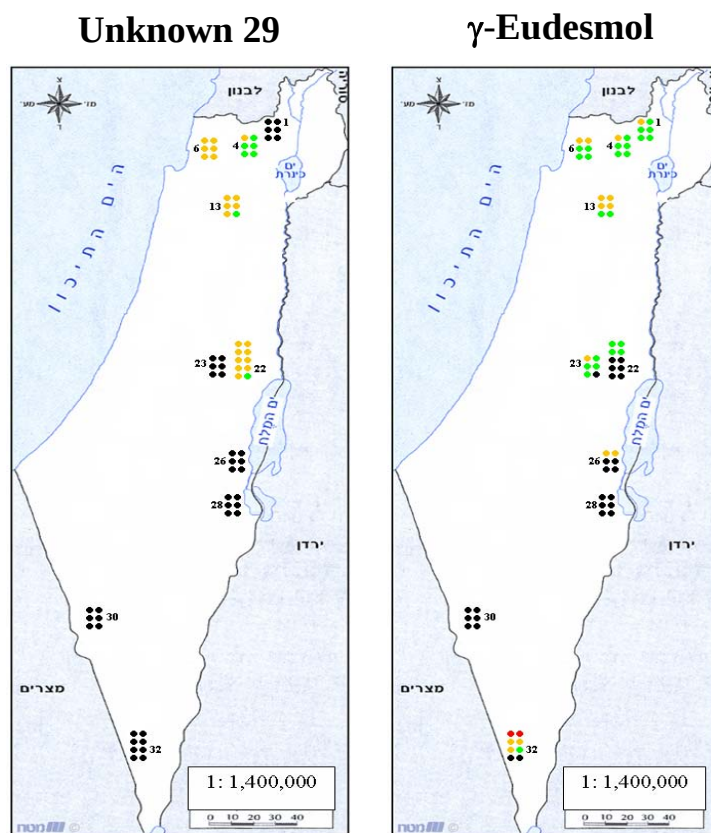
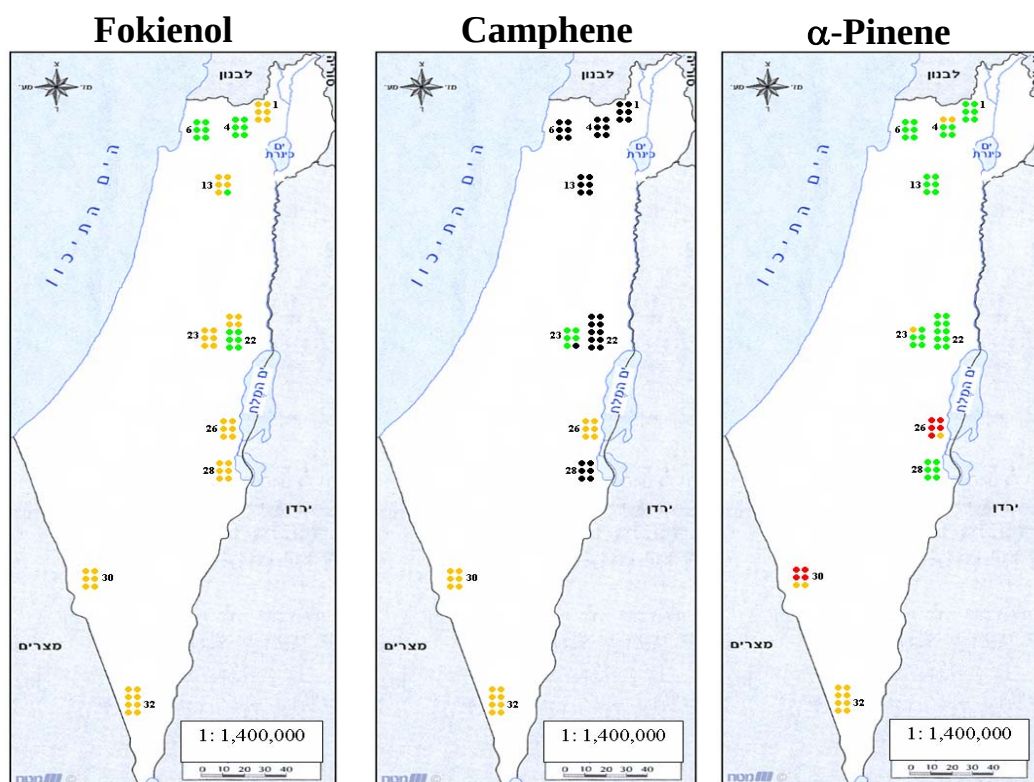


Chrysanthemic acid



27 ● לא קיים ● קטן מ- 2% ● 2%-10% ● גבוה מ- 10%

איור מס' 4: התפלגות מרכיבים אשר תכולתם בשמן האתרי גבוהה, והם אינם מרכיבים עיקריים.



● לא קיים ● קטן מ-2% ● 2%-10% ● גבוה מ-10%

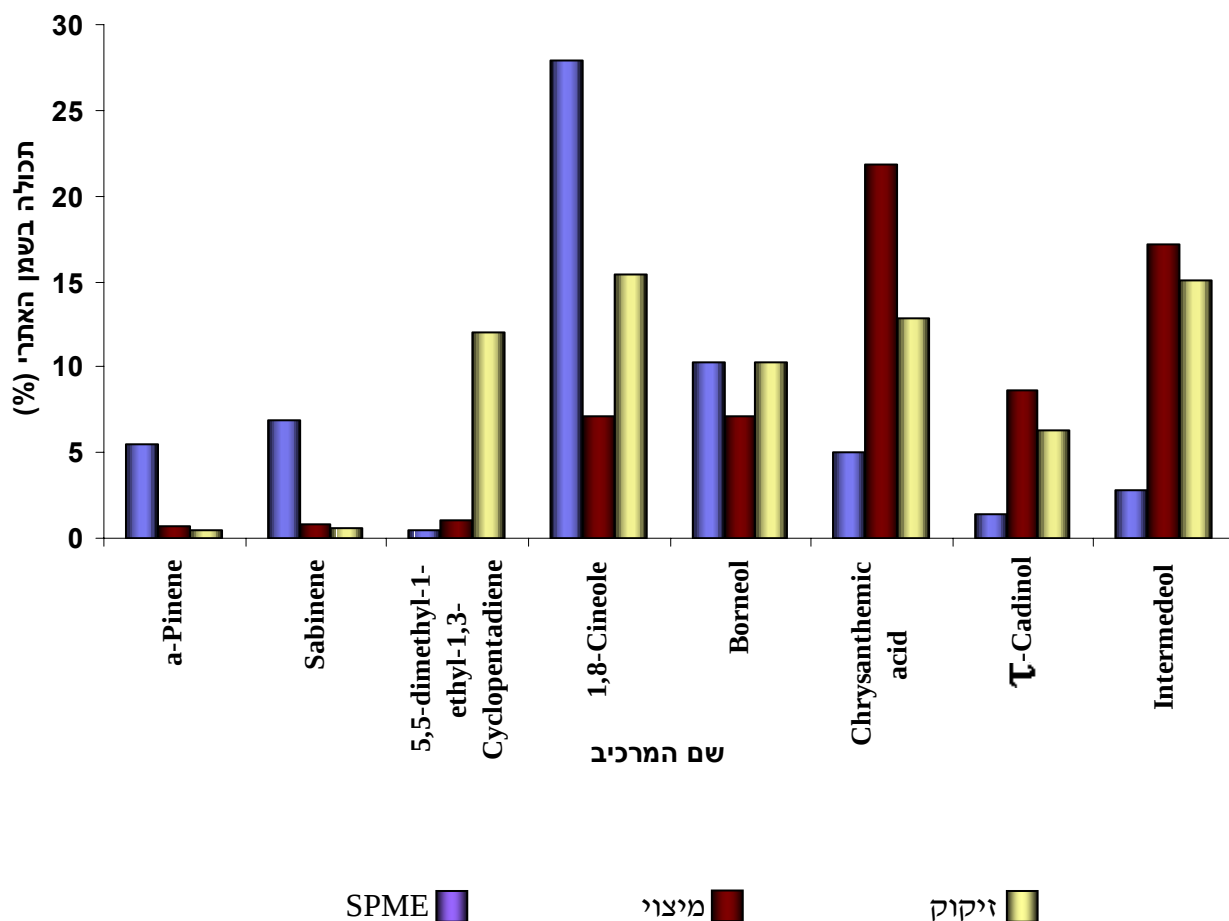
2. הרכב השמן האתרי בשיטות הפקה שונות

מאחר ולשמן האתרי אשר זוקק בניסויים הקדמיים, מצמחים שנאספו במדבר יהודה, היה הרכב שונה באופן משמעותי (הנתונים לא מוצגים) מזה שנמצא מאוחר יותר במיצוי בממס אורגני (טבלה מס' 6), נערכה אנליזה לבירור סוגיה זו.

2.1 השוואה בתכולת מרכיבים עיקריים בשמן האתרי (%) המתקבל בשיטות זיקוק, מיצוי ו-SPME

בשלב הראשון נערכה אנליזה לשמן האתרי אשר הופק בשלוש שיטות שונות. הבדיקה נעשתה עבור צמח בודד ממישור אדומים, מטיפוס כימי Intermedeol (זהה לזה שנבדק במדבר יהודה). שיטות ההפקה היו: 1. זיקוק במערכת קלוונג'ר; 2. מיצוי ב-MTBE; 3. SPME. בכל שיטה נבדקה תכולת המרכיבים בשמן האתרי.

איור מס' 5: השוואה בתכולת מרכיבים עיקריים בשמן האתרי (%) המתקבל בשיטות זיקוק, מיצוי ו-SPME



נמצאו הבדלים משמעותיים בתכולת השמן האתרי המתקבלת בכל שיטה (איור מס' 5). בשיטת ה-SPME בולטת ביותר נוכחות 1,8-Cineole (28 % לעומת 7 % במיצוי ו- 15 % בזיקוק). כמו כן ניכר הבדל משמעותי בתכולת α -Pinene ו- Sabinene אשר התקבלו בשיטה זו (5 % ו- 7 % בהתאמה) לעומת זו שהתקבלה במיצוי ובזיקוק (פחות מ- 1%). בשיטת המיצוי בולטת נוכחות Chrysanthemic acid (22% לעומת 5% ב-SPME ו- 13% בזיקוק) ו- Intermedeol (17 % לעומת 3 % ב-SPME ו- 15 % בזיקוק). הבדל ניכר נוסף נראה בין תכולת 5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3- Cyclopentadiene אשר התקבלה בזיקוק (12 %), לבין תכולתו אשר התקבלה ב-SPME ובמיצוי (0.5% ו- 1% בהתאמה). תכולה דומה של Borneol (כ- 10 %) התקבלה ב-SPME ובזיקוק, לעומת תכולתו במיצוי (7 %). כמו כן, תכולה דומה של τ -Cadinol התקבלה בזיקוק ובמיצוי (6 % ו- 8 % בהתאמה), לעומת תכולתו ב-SPME (1 %).

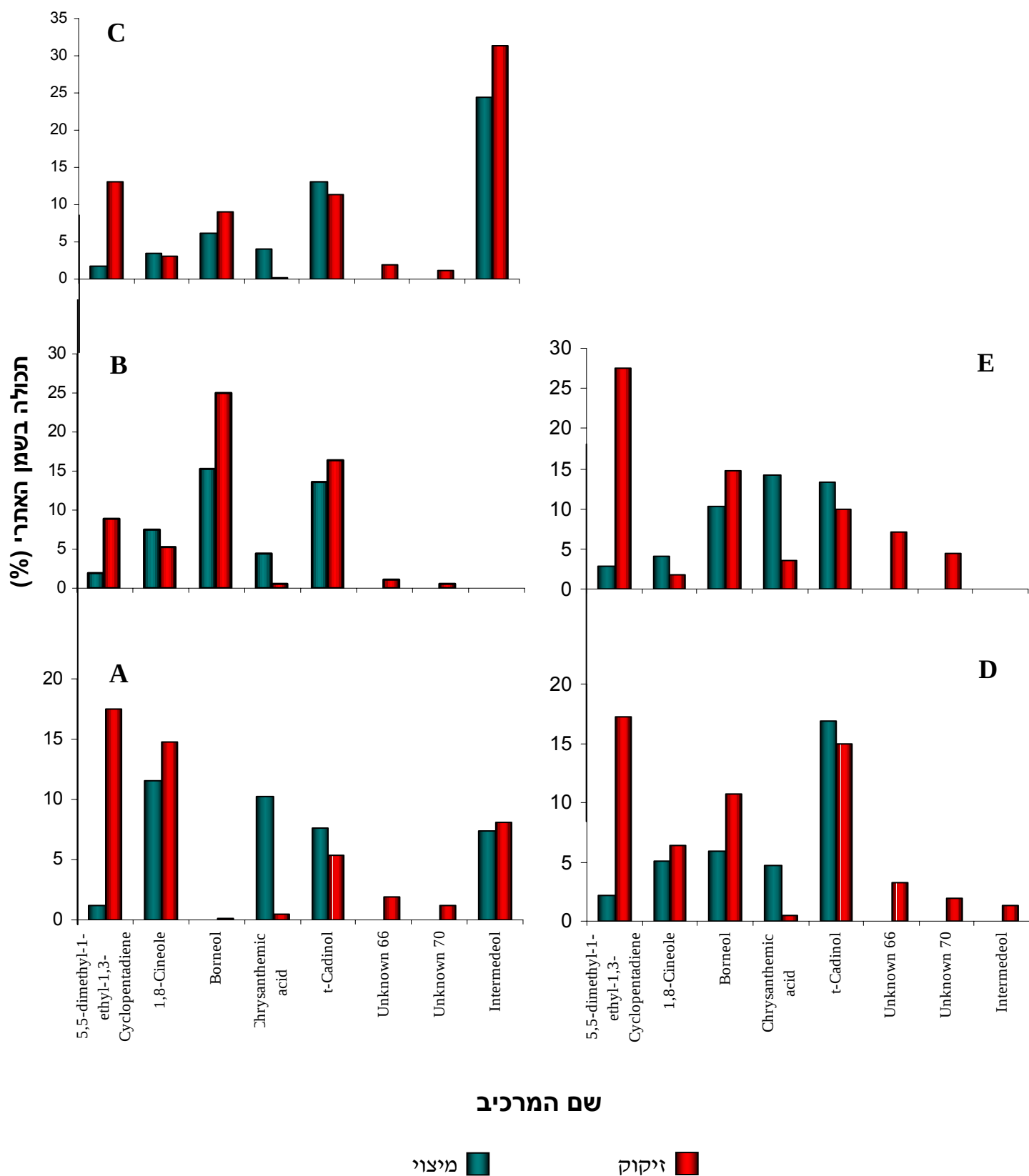
הסיבה להבדלים הנ"ל נעוצה בעובדה שבכל שיטה נבדק השמן האתרי המצוי באזור אחר בצמח. שיטת ה-SPME מודדת את נדיפות החומרים, כך שבעצם נמדד הריח של הצמח. בשיטה זו נבדק השמן האתרי המתנדף מהעלים, בשיטת המיצוי נבדק השמן האתרי המצוי בעיקר בשערות ובבלוטות הנמצאות על פני העלה, ובשיטת הזיקוק, האגרסיבית שבין השיטות, נבדק השמן האתרי המצוי גם בביבי הפרשה האופייניים למשפחת המורכבים, המצויים בתוך העלים והגבעולים. שיטת ה-SPME אינה כמותית, והיא לא בהכרח מייצגת את פרופיל השמן האתרי בצמח, לכן לא בוצע בה שימוש באפיון הכימוטיפים.

2.2 השוואה בתכולת מרכיבים עיקריים בשמן האתרי (%) המתקבל בשיטות זיקוק ומיצוי, בחמישה צמחים מטיפוסים שונים.

בהמשך העבודה נדגמו צמחים בודדים נוספים, על מנת לאפיין את מגוון הכימוטיפים בארץ. נבדקה תכולת השמן האתרי המתקבלת במיצוי לעומת זו המתקבלת בזיקוק. נבדקו חמישה צמחים מאוכלוסיית בר במישור אדומים, אשר בניסוי מקדים בשיטת המיצוי הראו שייכות לכימוטיפ מסויים.

צמח 1 = 1,8-Cineole (12%) ; צמח 2 = Borneol (15%) ; צמח 3 = Intermedeol (24%) ; צמח 4 = τ -Cadinol (17%) ; צמח 5 = Chrysanthemic acid (14%)

איור מס' 6: השוואה בתכולת מרכיבים עיקריים בשמן האתרי (%) המתקבל בשיטות זיקוק ומיצוי, בחמישה צמחים מטיפוסים שונים (A-E : צמחים 1-5 בהתאמה).



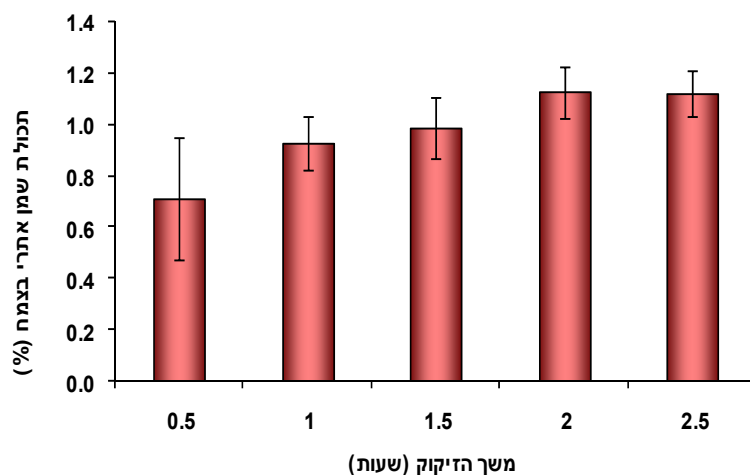
נמצאו הבדלים בולטים בתכולת המרכיבים בשמן האתרי המתקבלים בשתי השיטות (איור מס' 6). בכל הצמחים נראה הבדל ניכר בתכולת 5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene אשר התקבל בשיטת הזיקוק (27% - 9%) לעומת תכולתו אשר התקבלה במיצוי (2% - 1%). בנוסף, בשיטת הזיקוק התקבלו שני מרכיבים אשר אינם מזוהים על-ידי ספריות ה-MS (Unknown 66,) Unknown 70) והם אינם מתקבלים בשיטת המיצוי. כמו כן, היחס ביניהם נשמר בכל צמח. בכל הצמחים תכולת Chrysanthemic acid הייתה גבוהה בצורה משמעותית במיצוי (14% - 4%) לעומת התכולה בזיקוק (3% - 0.2%). בניגוד לכך, תכולת Borneol הייתה גבוהה יותר בזיקוק (25%-0.14%), בהשוואה למיצוי (15%-0.05%). כמו כן, גם תכולת Intermedeol הייתה גבוהה יותר בזיקוק (31%-1%) לעומת המיצוי (24%-0%). תכולה גבוהה של 1,8-Cineole התקבלה בזיקוק בצמחים 1 ו-4 (15% ו-6% בהתאמה) ביחס לזו אשר התקבלה במיצוי (12% ו-5% בהתאמה). בכל הצמחים, למעט צמח מס' 2, התקבלה תכולת גבוהה יותר של τ -Cadinol במיצוי (17%-8%) בהשוואה לזיקוק (15%-5%).

נוסף על כך, כאשר בוחנים מהו הכימוטיפ של כל צמח מתקבלת תוצאה זהה בשתי השיטות (במידה ולא לוקחים בחשבון את 5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene). לכן, מאחר וההבדלים בין הזיקוק למיצוי נובעים מסיבות הקשורות בתהליך הזיקוק, המשך העבודה התבסס על תהליך המיצוי.

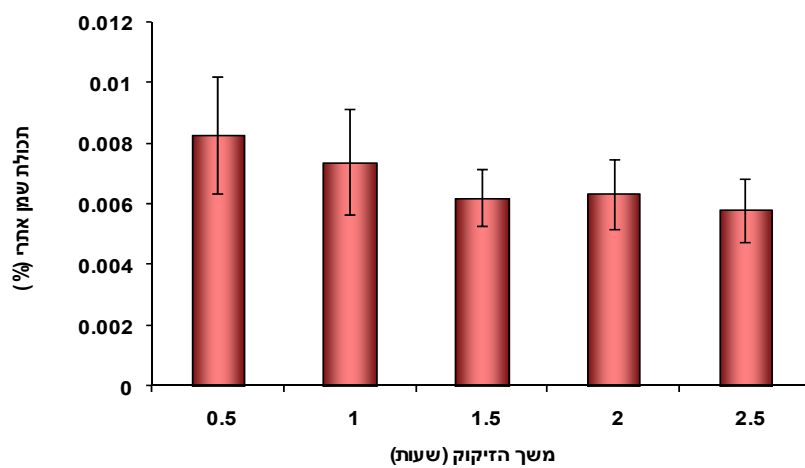
2.3 תכולת השמן האתרי בתהליך הזיקוק באורכי זמן שונים

על מנת לבחון האם לזיקוק בפרקי זמן שונים ישנה השפעה על תכולת השמן האתרי המתקבלת מהצמח, בוצעו חמישה תהליכי זיקוק באורכי זמן שונים. כמו כן, נבדקה תכולת השמן האתרי במי גולת הזיקוק, ובמי מלכודת איסוף השמן האתרי.

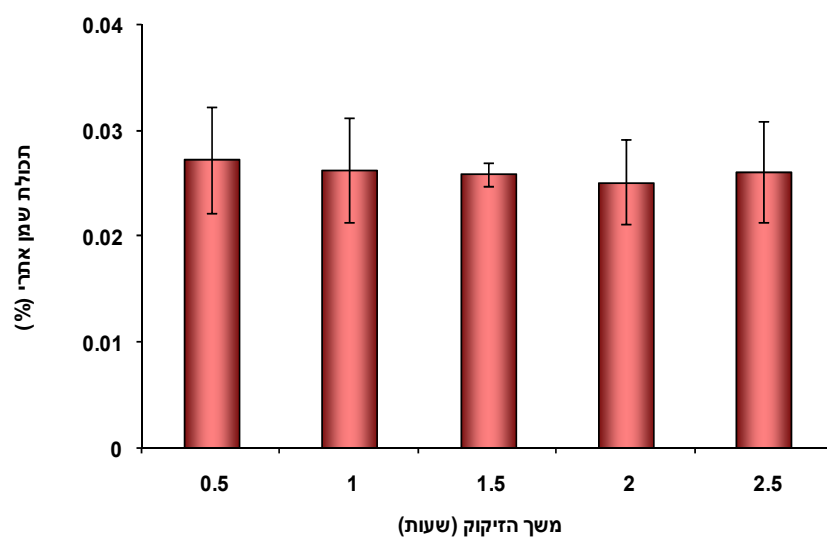
איור מס' 7: תכולת השמן האתרי (%) המתקבל בתהליך הזיקוק באורכי זמן שונים



איור מס' 8: תכולת השמן האתרי (%) הנשאר במי הגולה בקלוונג'ר בתהליך הזיקוק באורכי זמן שונים



איור מס' 9: תכולת השמן האתרי (%) הנשאר במי מלכודת הקלוונג'ר בתהליך הזיקוק באורכי זמן שונים



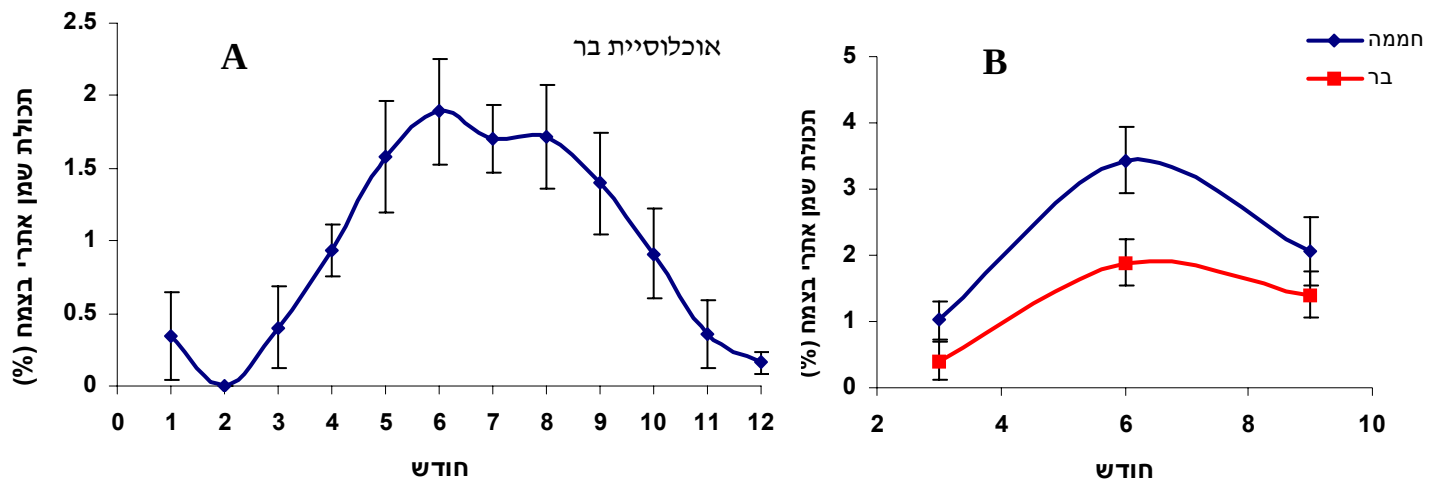
נראה כי משך הזיקוק המינימאלי בו מופקת הכמות המקסימאלית של שמן אתרי מכתלה חריפה הוא שעתיים (איור מס' 7), ומעבר לכך לא מופק עוד שמן אתרי. כמו כן, בחצי השעה הראשונה של הזיקוק מופקים כ- 60% מכמות השמן האתרי הסופית. בגולת הזיקוק (איור מס' 8) נשאר מעט מאוד שמן אתרי (מקסימום 0.08%) וכמות זו הולכת ופוחתת ככל שמשך הזיקוק מתארך, מאחר והשמן יוצא ממי הגולה ונאסף במלכודת. לעומת זאת, כמות השמן האתרי הנמצאת במי המלכודת (איור מס' 9) אינה משתנה והיא עומדת סביב 0.02%.

3. השתנות תכולת והרכב השמן האתרי של כתלה חריפה מאוכלוסיות גן נר במהלך השנה

על מנת לעקוב אחר שינויים בשמן האתרי במהלך השנה, שימשו הצמחים באוכלוסיית גן נר כצמחי בוחן. הבחירה באוכלוסיה זו בוצעה מטעמי נגישות לאוכלוסיה ביחס לאוכלוסיות אחרות. לצורך כך נבחרו שישה צמחים אשר אינם מצויים בסמיכות זה לזה, ומדי חודש נלקח מהם ענף לבדיקה. מאחר ונמצא הבדל משמעותי בין שיטות הפקת השמן האתרי, הוחלט להשתמש בשיטת המיצוי. הדוגמא הצמחית עברה מיצוי ב-MTBE והשמן האתרי נבדק ב-GC-MS.

3.1 השתנות תכולת השמן האתרי בצמחי כתלה חריפה מאוכלוסיית גן נר

איור מס' 10: השתנות תכולת השמן האתרי בצמחי כתלה חריפה מאוכלוסיית גן נר. (A) אוכלוסיית בר בגן נר, (B) השוואה בין אוכלוסיית הבר לזו הגדלה בחממה בנווה יער.



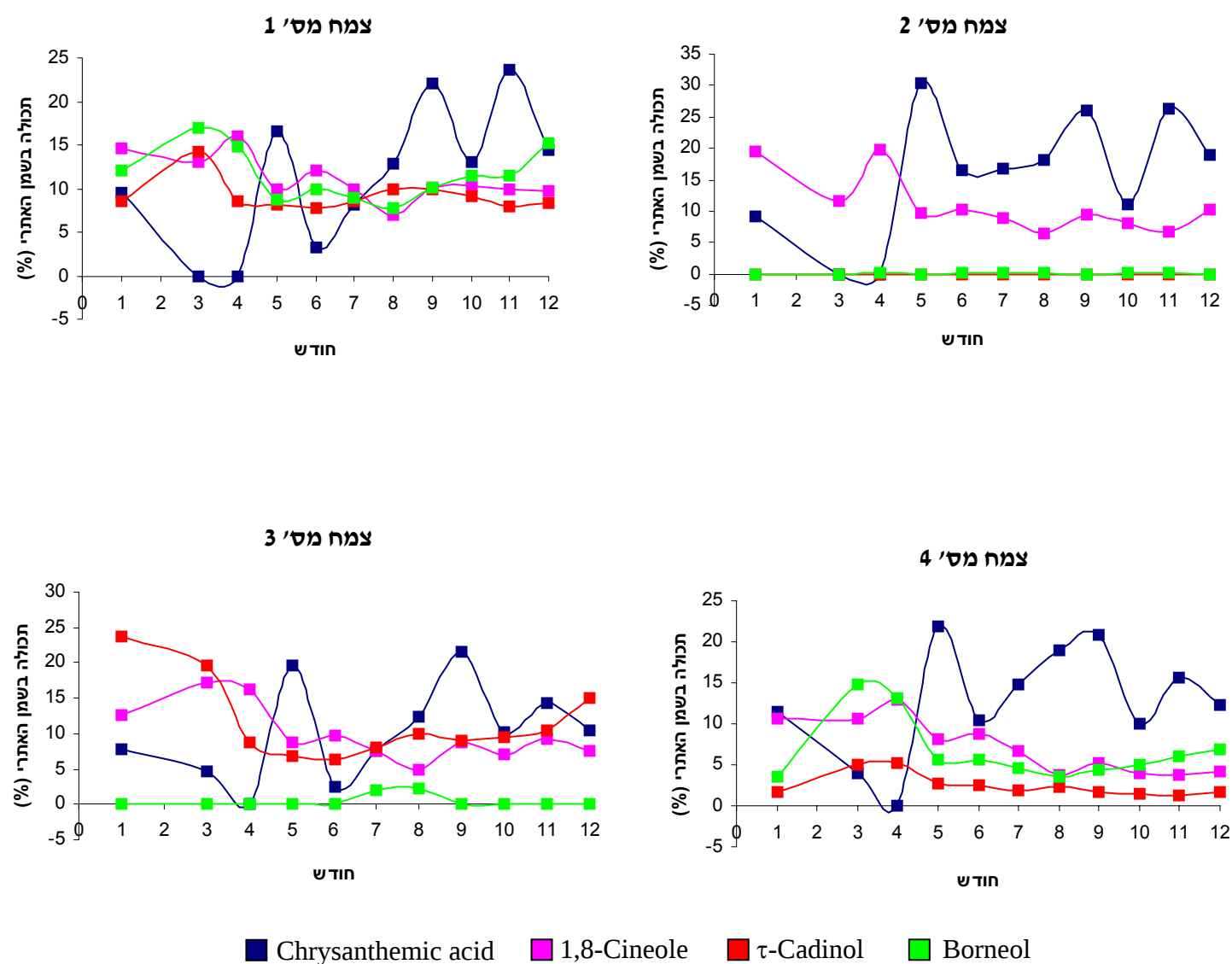
בבחינת השינוי לאורך השנה (איור מס' 10 A), נמצא כי תכולת השמן האתרי בצמח מצויה בשיאה בחודשי הקיץ, ביוני- אוגוסט, והולכת ופוחתת עד לרמה נמוכה מאד בחורף, והיא אפסית בחודש פברואר. תהליך זה תואם את המצב הפנולוגי של הצמח. כאשר הצמח מצוי בשיא לבלובו, בחודש יוני, לפני יצירת הפרחים, תכולת השמן בו היא הגבוהה ביותר. לאחר הפריחה הצמח מתייבש ופוחתת תכולת השמן האתרי. התכולה עולה שוב כשהצמח מתחיל להתחדש.

בהשוואה לצמחים הגדלים בחממה (איור מס' 10 B), המגמה היא זהה, אך תכולת השמן גבוהה יותר בצמחי החממה. הסיבה לכך היא כנראה ההבדל במשטר המים והטמפרטורה.

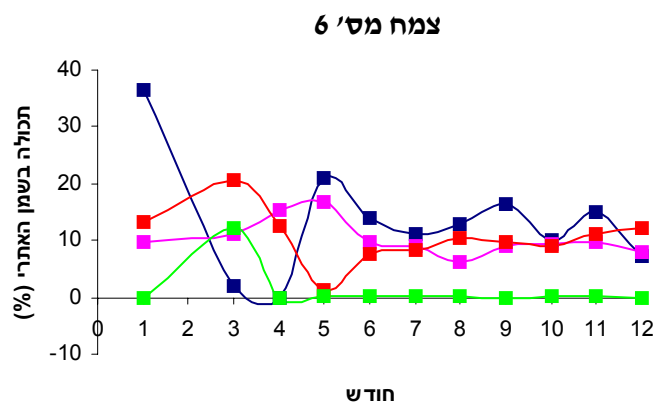
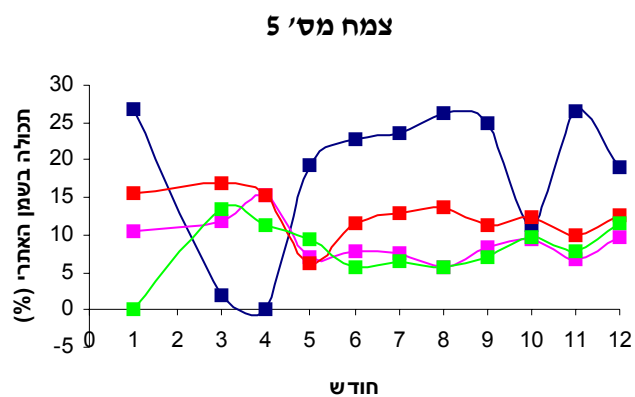
3.2 השתנות הרכב השמן האתרי של כתלה חריפה מאוכלוסיית גן נר

המרכיבים העיקריים בכתלה חריפה מאוכלוסיית גן נר הם 1,8-Cineole, Chrysanthemic acid, Borneol, ו- τ -Cadinol (איור מס' 11). המהווה מרכיב עיקרי באוכלוסיות אחרות, אינו מצוי כלל באוכלוסיה זו, ואילו Camphor המהווה מרכיב עיקרי באוכלוסיות הדרומיות, מצוי באוכלוסיה זו כמרכיב מינורי (נספח מס' 1). נראה כי תכולת המרכיבים (%) מכלל המרכיבים בשמן האתרי (בשמן האתרי שונה במעט בין הצמחים השונים, והיא משתנה במהלך השנה, בעיקר בתקופה בה הצמח מתחדש, בחודשים מרץ-אפריל. אחד השינויים הבולטים הוא העדר Chrysanthemic acid בשמן האתרי בתקופה זו. בהתאם לכך עולה תכולתם של מרכיבים אחרים (Borneol, 1,8-Cineole) בשמן האתרי. כמו כן, התנהגות Chrysanthemic acid מאופיינת בעלויות וירידות חדות במהלך השנה, בעוד השתנותם של שאר המרכיבים מתונה יותר.

איור מס' 11: השתנות תכולת המרכיבים העיקריים (%) בשמן האתרי בצמחי כתלה חריפה מאוכלוסיית גן נר.

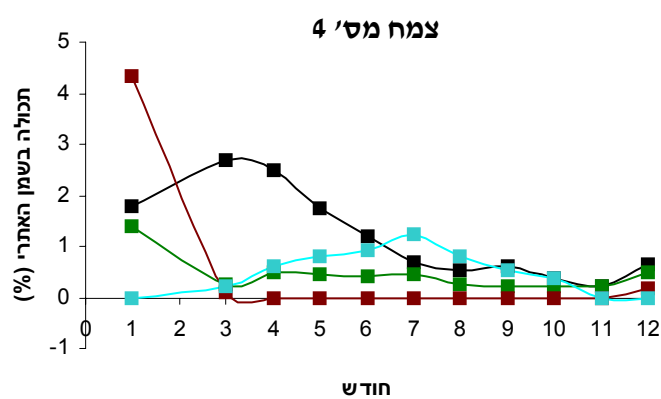
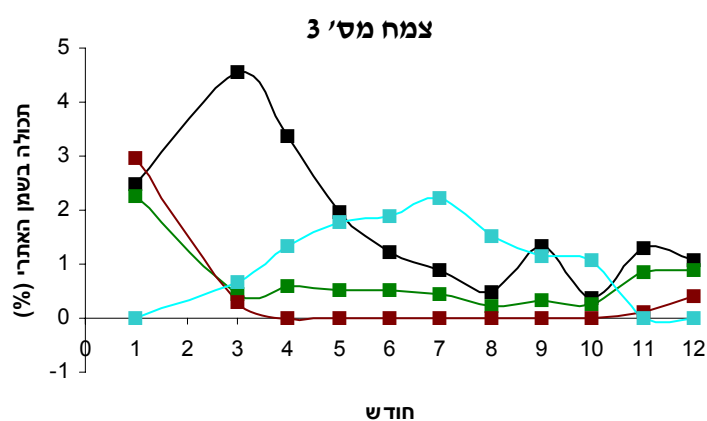
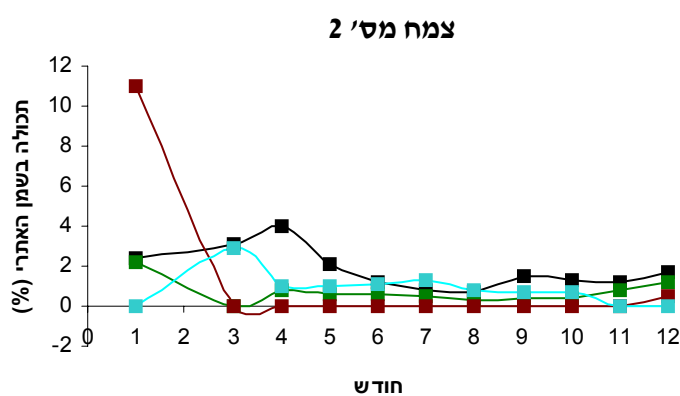
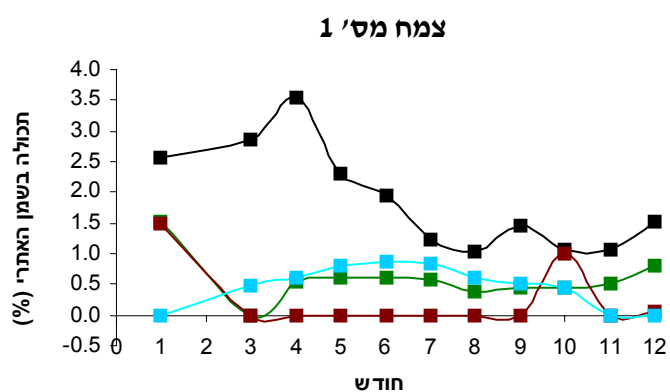


המשך איור מס' 11:



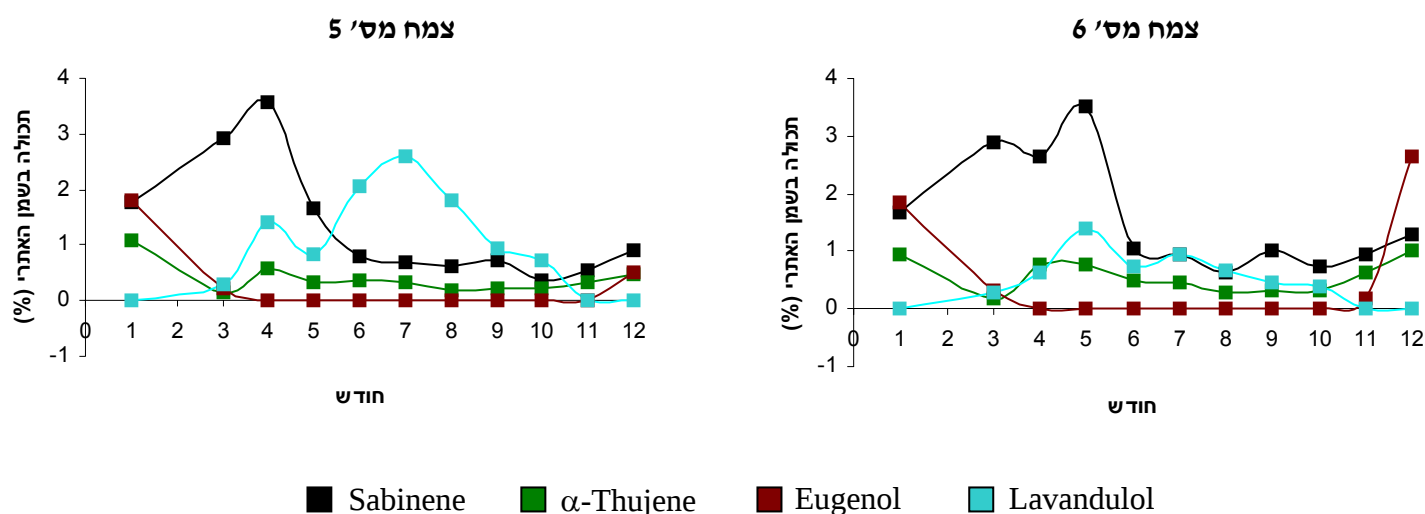
■ Chrysanthemic acid ■ 1,8-Cineole ■ τ-Cadinol ■ Borneol

איור מס' 12: השתנות תכולת מרכיבים נוספים (%) בשמן האתרי בצמחי כתלה חריפה מאוכלוסיית גן נר.



■ Sabinene ■ α-Thujene ■ Eugenol ■ Lavandulol

המשך איור מס' 12 :



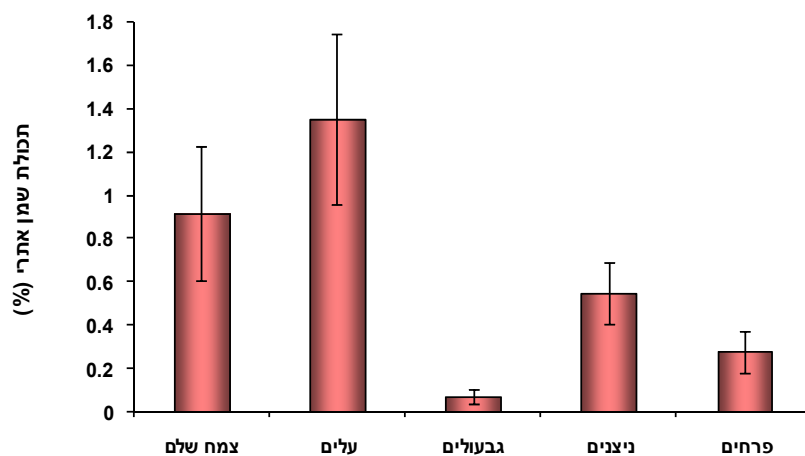
שאר המרכיבים בשמן האתרי מתנהגים באופן דומה (איור מס' 12). תכולתם נמוכה (כדוגמת α-Thujene) או גבוהה (כדוגמת Sabinene) בחודשי האביב, עם התחדשות הצמח. כמו כן, ישנם מרכיבים (כדוגמת Eugenol) הנראים רק בתקופה שבין נובמבר לפברואר או הנעדרים באותה תקופה (כדוגמת Lavandulol). בתקופה זו הצמח נמצא בשיא פריחתו, לכן יתכן שסינתזת מרכיבים מסוימים קשורה לפיסיולוגית הצמח.

4. התפלגות מרכיבי השמן האתרי בצמח

4.1 התפלגות מרכיבי השמן האתרי בין חלקי הצמח השונים

על מנת לבדוק היכן נאגר השמן האתרי בצמח הכתלה החריפה, נלקחו ענפים פורחים משישה צמחים שונים. חלקם הופרדו לחלקים שונים: עלים, גבעולים, ניצנים ופרחים, וחלקם נשארו שלמים. הדוגמאות הצמחיות עברו מיצוי ב-MTBE ולאחר מכן בדיקה ב-GCMS.

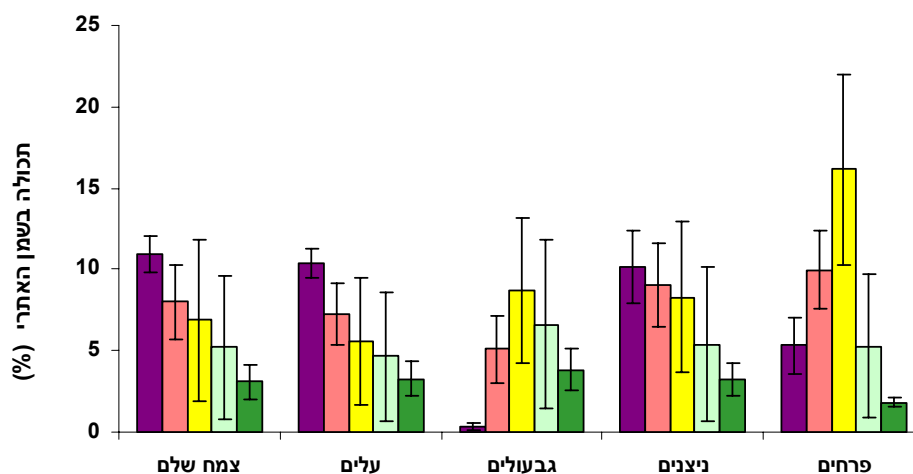
איור מס' 13 : התפלגות תכולת השמן האתרי (%) בין חלקי הצמח השונים.



נראה כי האיבר העשיר בשמן אתרי בכתלה חריפה הוא העלה (איור מס' 13). השמן האתרי מהווה כאחוז וחצי לערך ממשקלו. לאחר מכן נמצאים הניצנים והפרחים עם תכולת שמן אתרי נמוכה יותר (כחצי אחוז ממשקלם), והאיבר עם תכולת השמן הנמוכה ביותר הוא הגבעול, המעוצה בחלקו בתקופת הפריחה. בהתאם לכך, כאשר בודקים את תכולת השמן האתרי בצמח השלם, מקבלים ערך ממוצע כל תכולת השמן האתרי בחלקיו השונים (כאחוז ממשקל הצמח).

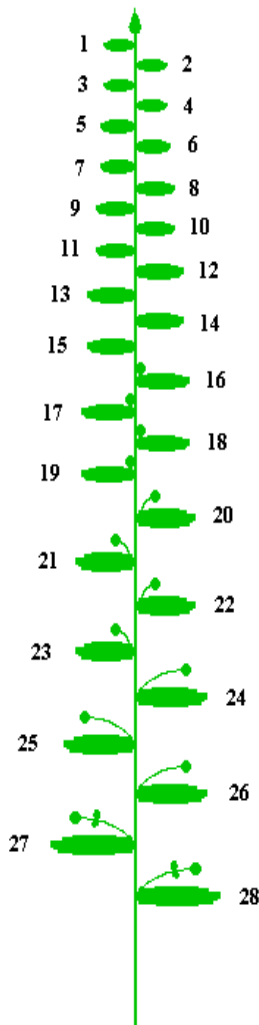
כאשר מסתכלים על הרכב השמן האתרי בחלקי הצמח השונים (איור מס' 14) נראה כי העלים והניצנים משקפים את תמונת התפלגות המרכיבים העיקריים בשמן האתרי בצמח השלם. הגבעולים והפרחים מראים תמונה שונה. בעוד ש- *Chrysanthemic acid* מהווה את המרכיב העיקרי בשמן האתרי בצמח השלם (כ-10%), הוא כמעט ואינו מצוי בגבעולים. בפרחים הוא אינו מהווה מרכיב עיקרי (כ-5%), אלא τ -Cadinol המהווה כ-15% מהשמן האתרי, והמהווה כמרכיב העיקרי בשמן האתרי בגבעולים (כ-8%). לא נמצא הבדל משמעותי בתכולת *1,8-Cineole*, *Borneol* ו-*Fokienol* באיברים השונים.

איור מס' 14 : התפלגות מרכיבים עיקריים בשמן האתרי (%) בין חלקי הצמח השונים.



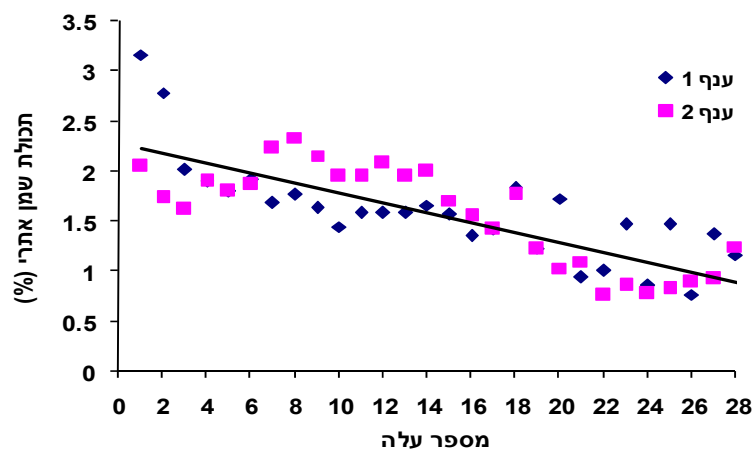
4.2 התפלגות תכולת השמן האתרי לאורך ענף

על מנת לבחון כיצד מתפלגת תכולת השמן האתרי לאורך ענף של כתלה חריפה, נלקחו שני ענפים זהים מבחינה מורפולוגית משני צמחים שונים מאוכלוסיית גן-נר הגדלים בחממה בנווה יער. בכל ענף היו 28 עלים (איור מס' 15), ובתחתית הענף החלו לצמוח ניצני פריחה. כל עלה עבר מיצוי ב-MTBE, ולאחר מכן בדיקה ב-GCMS.



איור מס' 15 :
סכימה של ענף כתלה חריפה.

איור מס' 16 : תכולת שמן אתרי בעלים לאורך הענף.

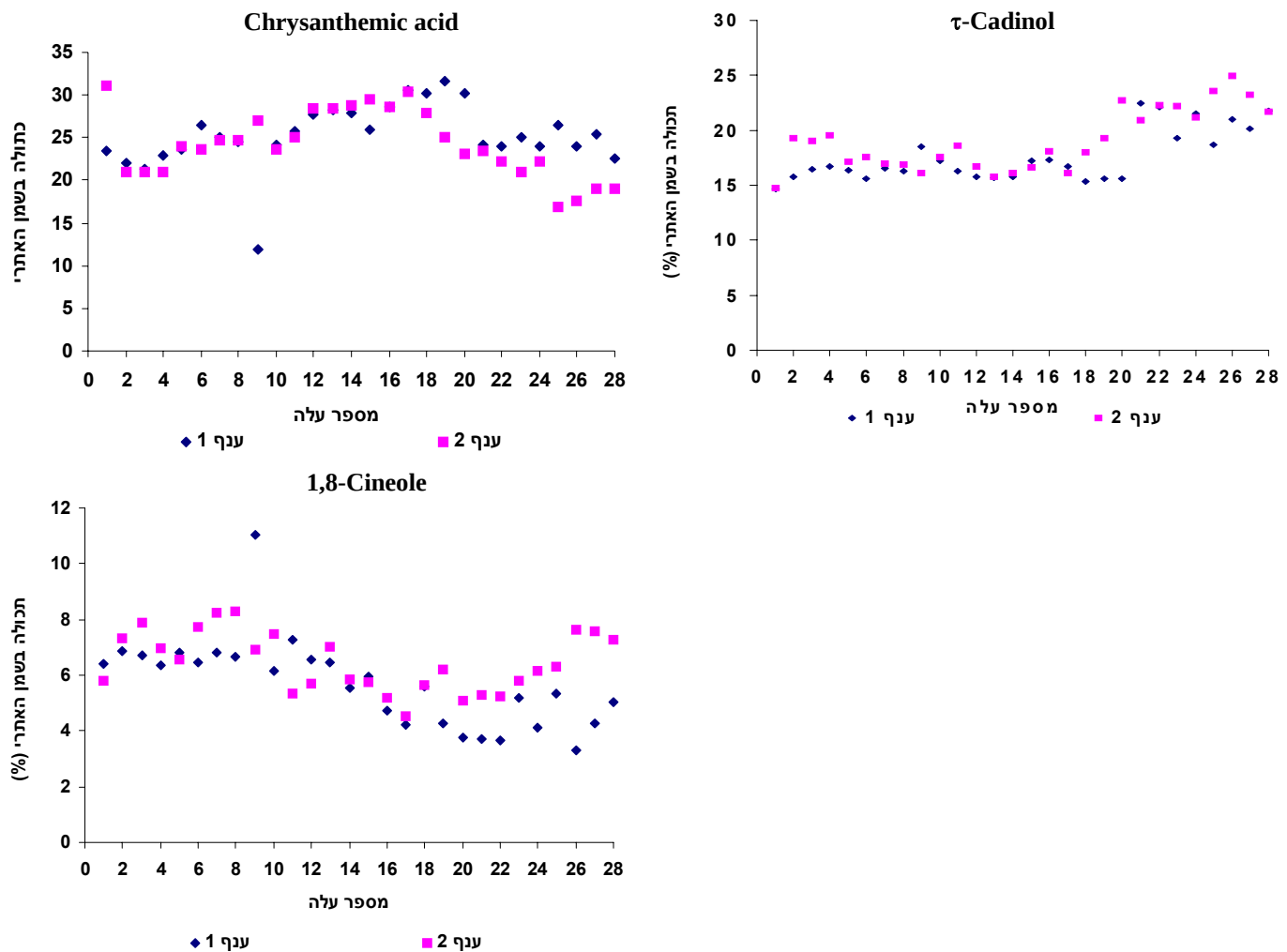


נמצא כי תכולת השמן האתרי בעלים (איור מס' 16) הולכת ויורדת לאורך הענף בכיוון באסיפטלי. לכאורה, ככל שגיל העלה עולה, יורדת תכולת השמן האתרי בו. מכיוון שתכולת השמן האתרי מחושבת ביחס למשקל העלה, יתכן וכמות השמן האתרי בעלה נשארת קבועה לכל אורך חייו, ומתפזרת על שטח גדול יותר ככל שהעלה גדל.

4.3 התפלגות תכולת מרכיבים עיקריים בשמן האתרי לאורך ענף

נראות מגמות מעורבות של התפלגות המרכיבים לאורך הענף (איור מס' 17). תכולת המרכיב העיקרי Chrysanthemic acid בשמן האתרי נשארת קבועה לאורך הענף. בניגוד לכך, תכולת המרכיב τ -Cadinol הולכת וגדלה ככל שגיל העלה עולה, ותכולת המרכיב 1,8-Cineole הולכת וקטנה ככל שגיל העלה עולה.

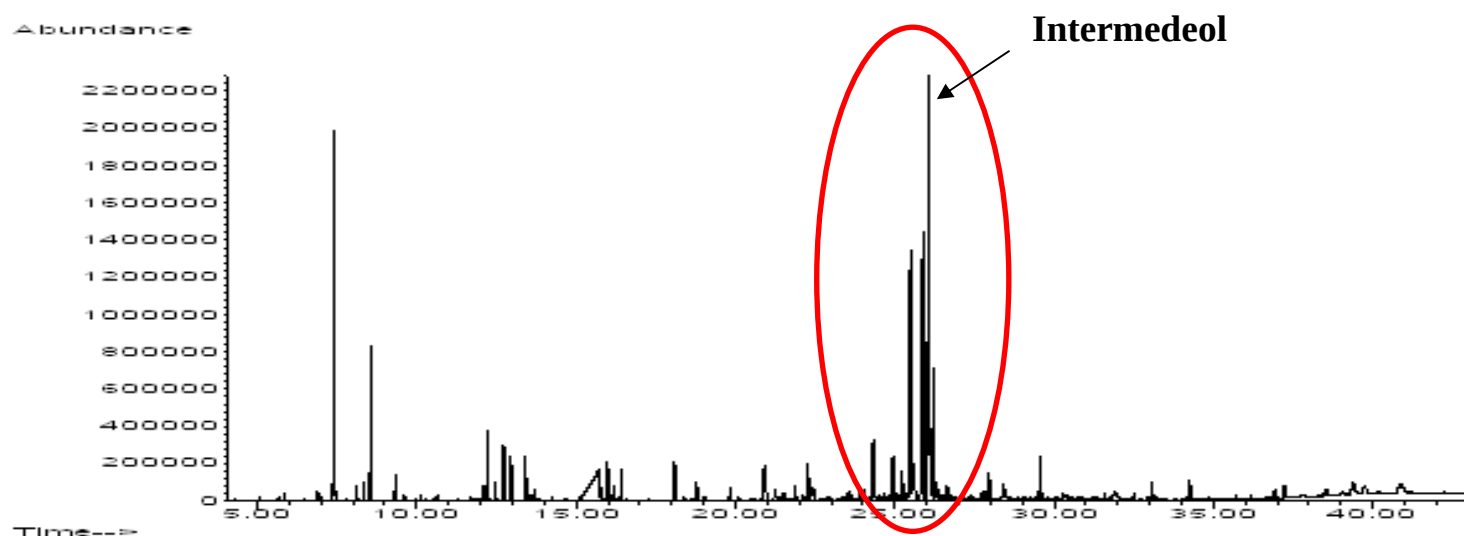
איור מס' 17: תכולת מרכיבים עיקריים בשמן האתרי בעלים לאורך הענף.



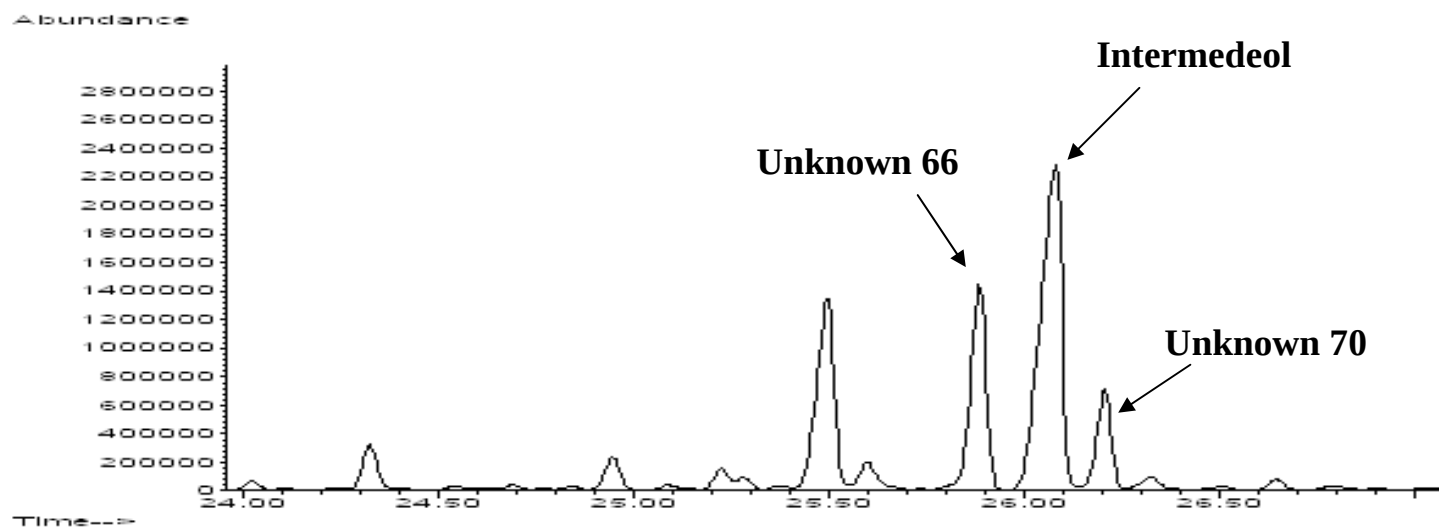
5. הפרדת מרכיבים לא ידועים בשיטת Flash Chromatography

כאמור, בשמן האתרי המופק מכתלה חריפה נמצאו כ- 75 מרכיבים אשר אינם מזוהים על ידי ספריות ה-MS (נספח מס' 2). בהפקת שמן אתרי בשיטת הזיקוק נמצאו שני מרכיבים עיקריים אשר אינם מזוהים על ידי ספריות ה-MS (איורים מס' 18 ו-19).

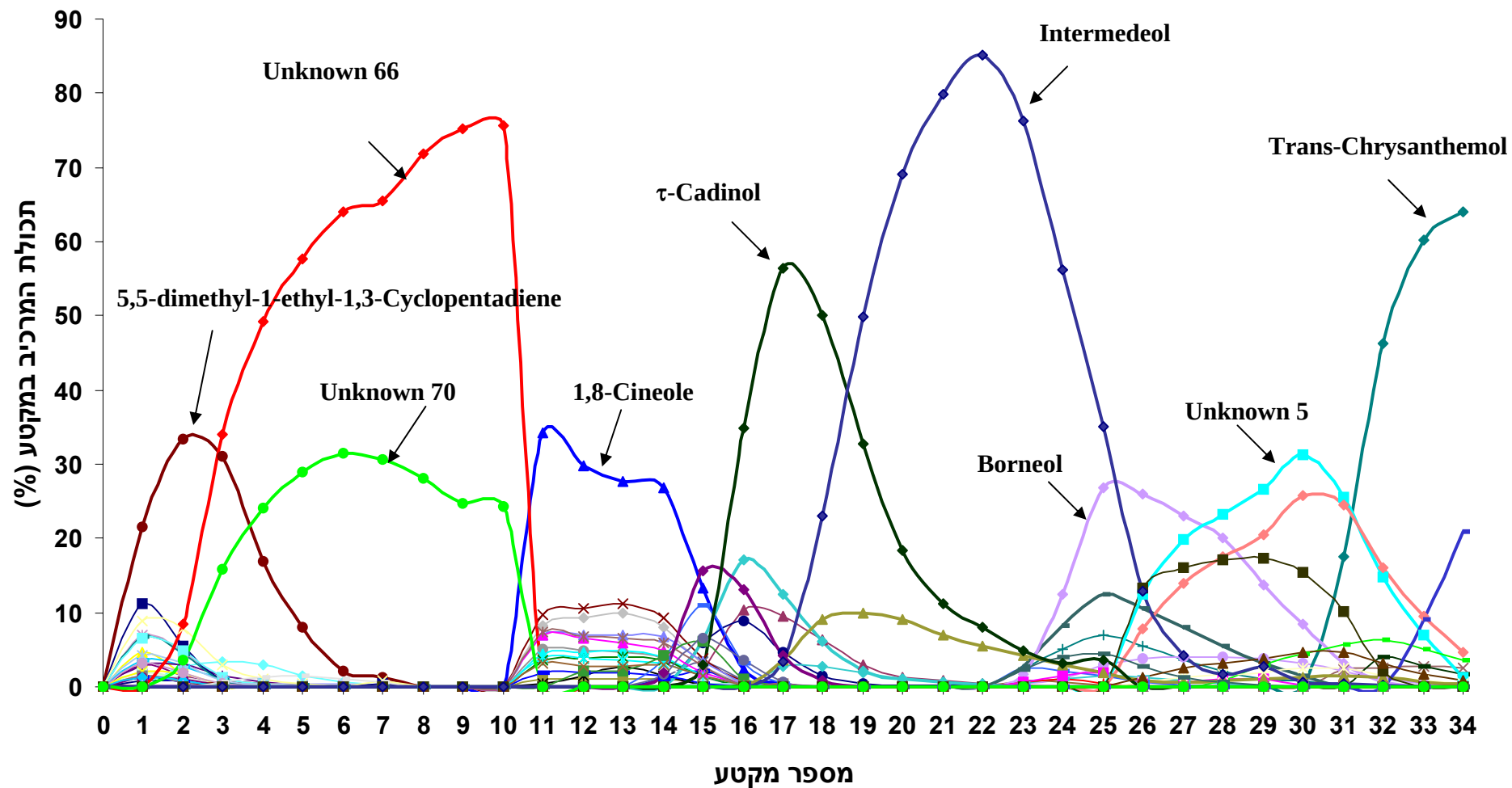
איור מס' 18 : כרומטוגרמה של שמן אתרי של כתלה חריפה אשר התקבלה ב-GCMS.



איור מס' 19 : הגדלה של האזור המסומן

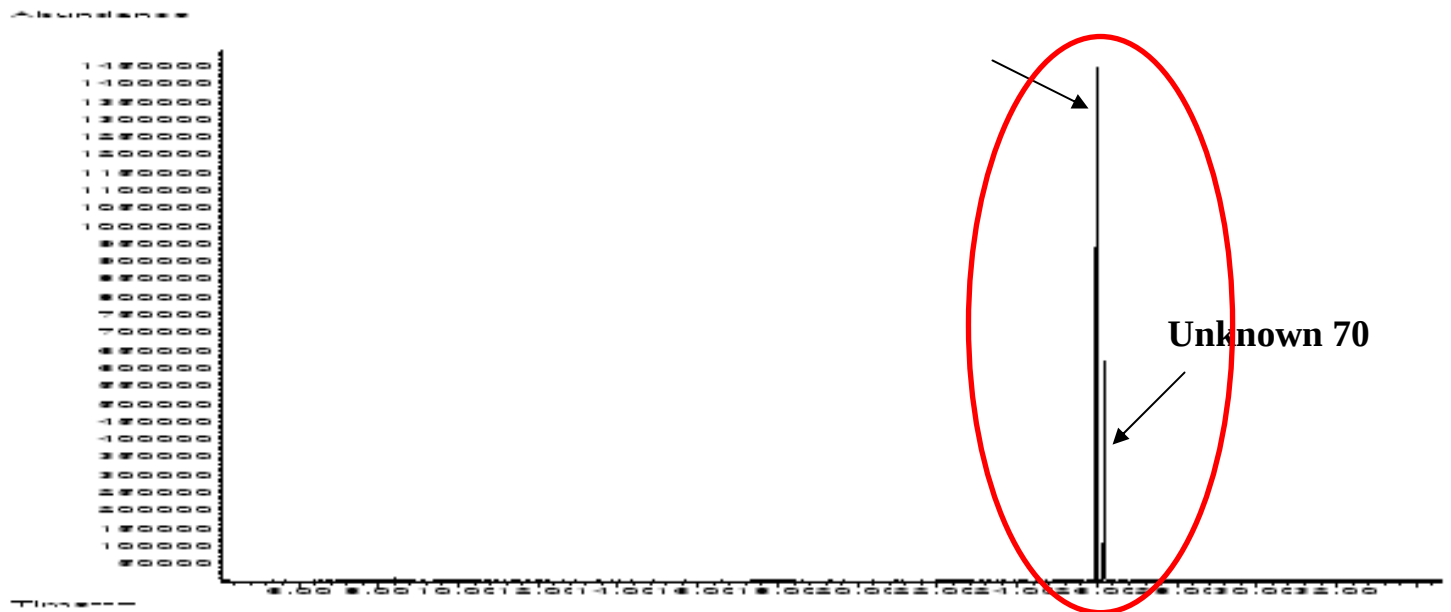


איור מס' 20: התפלגות מרכיבי השמן האתרי במקטעים לפי הפרדה בשיטת Flash chromatography

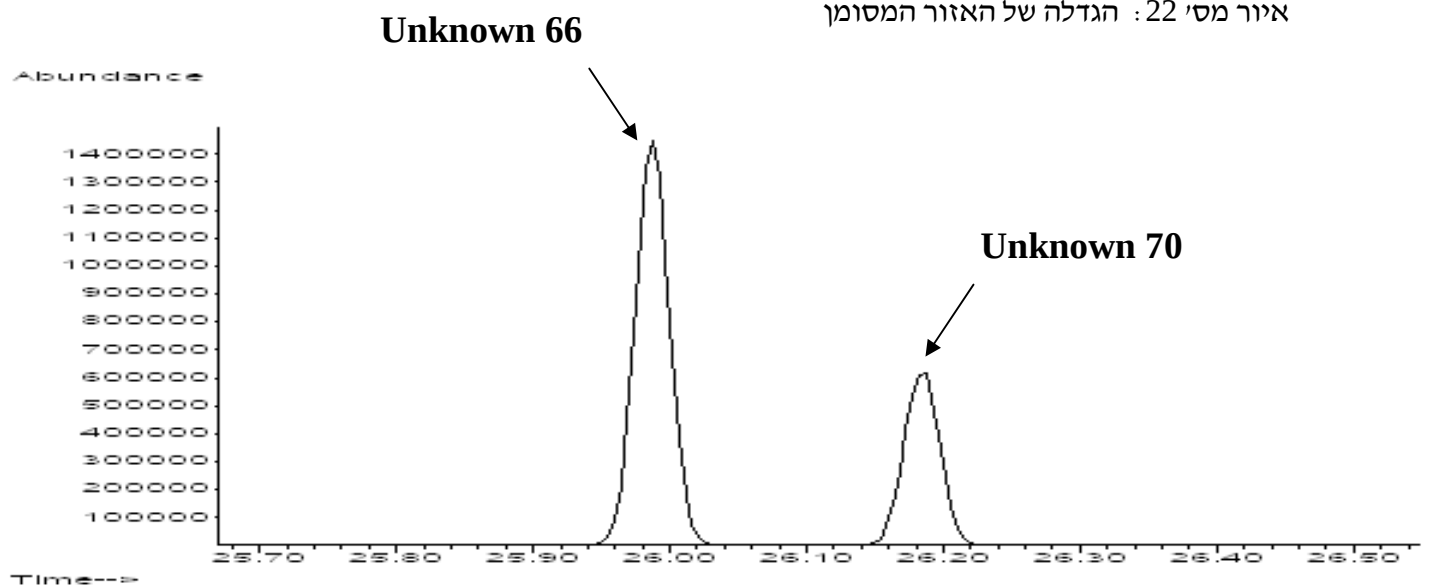


המקטעים 8, 9 ו-10 הכילו את שני המרכיבים Unknown 66 ו-Unknown 70 בלבד (נספח מס' 3, איורים מס' 20, 21, 22) והם אוחדו לתמיסה אחת. פרט לכך, לא התקבלו מקטעים המכילים חומרים לא מזוהים ברמת ניקיון גבוהה. לכן, לצורך המשך בידוד מרכיבים יש לבצע את ההפרדה בתנאי הרצה שונים.

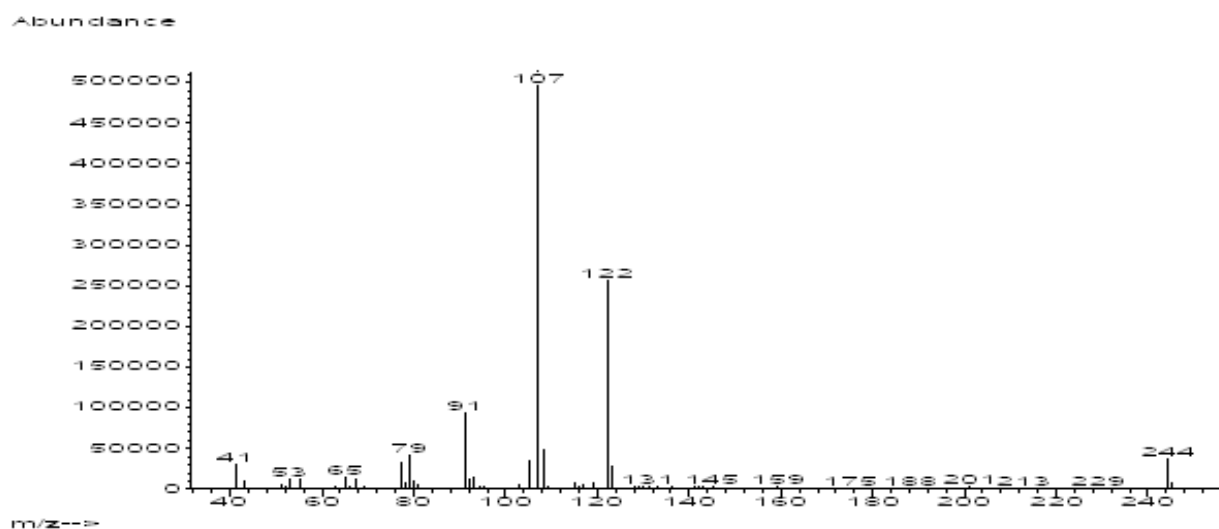
איור מס' 21: כרומטוגרמה של מקטע שמן אתרי המכיל את Unknown 66 ו-Unknown 70



איור מס' 22: הגדלה של האזור המסומן

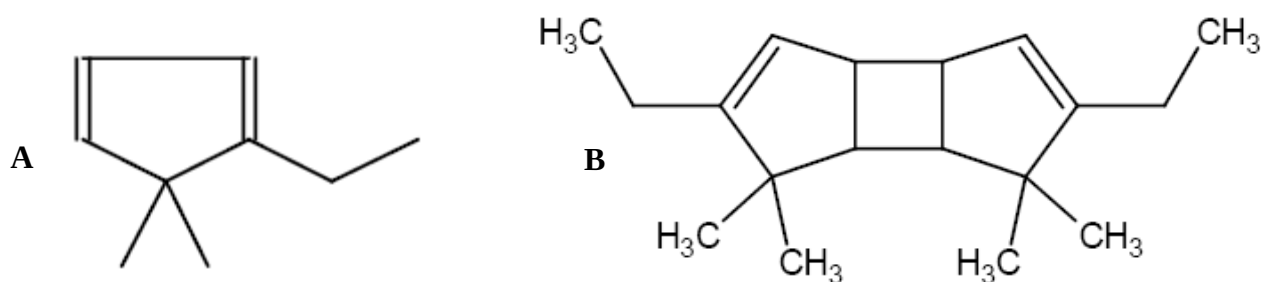


איור מס' 23: ספקטרום היונים של Unknown 66 ו- Unknown 70



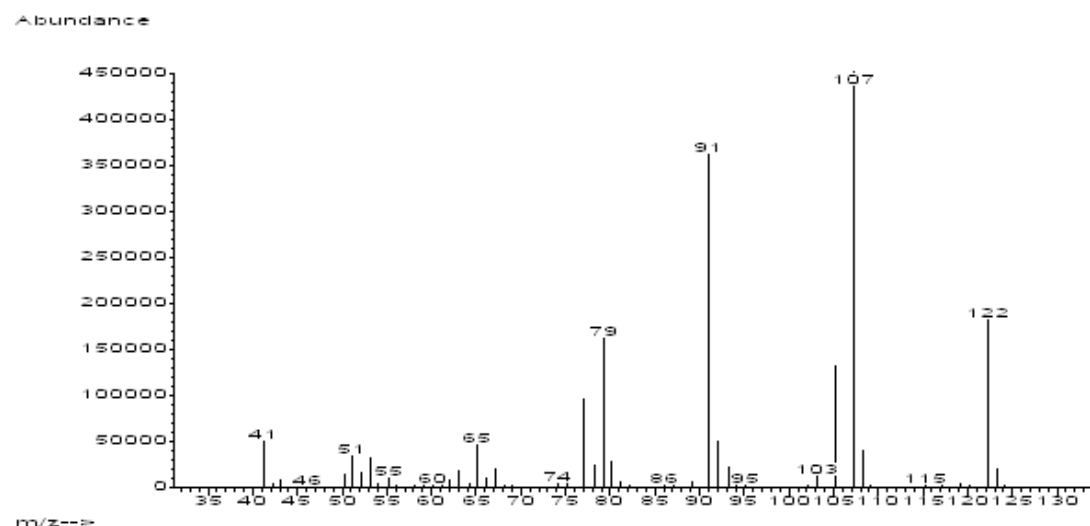
לאחר איחוד המקטעים 8-10, נלקחה הדוגמא לזיהוי שני המרכיבים באמצעות NMR על-ידי "תמי – מכון מחקר ופיתוח". על פי הממצאים, שני המרכיבים הם אכן איזומרים, והם מהווים דימר של המרכיב 5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene (איור מס' 24).

איור מס' 24: המבנה המולקולרי של המונומר 5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene (A) ושל הדימר (B)



כאשר מסתכלים על ספקטרום היונים שלו (איור מס' 25), מתקבלת תמונה דומה לזו של שני האיזומרים.

איור מס' 25: ספקטרום היונים של 5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene



ההבדל ביניהם הוא המצאות יון 244 (איור מס' 23), אשר מהווה כנראה את היון המולקולרי של הדימר. כמו כן, בספקטרום היונים של 5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene (איור מס' 25) נמצא יון 122 שהוא בדיוק מחצית מהיון המולקולרי של הדימר.

דיון ומסקנות

עבודה זו עוסקת באפיון השמן האתרי של כתלה חריפה, מאוכלוסיות מייצגות באזור התפוצה בישראל. תחילה אדון בשונות הרכב השמן האתרי בין האוכלוסיות ובתוכן, עם דגש על התפלגות המרכיבים העיקריים ביניהן. לאחר מכן נדון בהשפעת צורת הפקת השמן האתרי על הרכבו, ובהמשך בשינויים בהרכב ותכולת השמן האתרי במהלך חודשי השנה, והתפלגות הרכב השמן האתרי ותכולתו בחלקי הצמח השונים ולאורך הענף.

1. הרכב השמן האתרי של אוכלוסיות בר של כתלה חריפה בישראל

הפרסום היחיד של הרכב השמן האתרי של הכתלה החריפה הוא מאוכלוסיה הגדלה בגדה המזרחית של עמק הירדן, בה המרכיב העיקרי בשמן האתרי הוא המונוטרפן Borneol (Avato et al., 2004). בעבודה הקדמית, בה נערכה אנאליזה לאוכלוסיות כתלה חריפה באזור יהודה ושומרון, נמצא הרכב שמן אתרי שונה מזה המדווח לגבי האוכלוסייה הירדנית. נמצאו בו מספר מרכיבים דומים (בעיקר מונוטרפנים), אך הוא היה עשיר ב-Intermedeol (שכלל לא הוזכר), ב-Chrysanthemetic acid וב- τ -Cadinol. בעקבות הממצאים האלה פנינו לביצוע סקר אוכלוסיות בר ברחבי ישראל.

ממצאי הסקר (נספח מס' 1) מעידים על שונות בין האוכלוסיות השונות, הבאה לידי ביטוי בהבדלים בהרכב השמן האתרי. נראה כי בניגוד לתוצאות שהתפרסמו עי ידי הירדנים, ישנם שישה מרכיבים עיקריים: Chrysanthemetic acid, Borneol, Camphor, 1,8-Cineole, τ -Cadinol ו-Intermedeol.

1,8-Cineole הוא מונוטרפן הידוע גם בשם Eucalyptol. הוא המרכיב העיקרי בשמן אתרי המופק מאיקליפטוס (ומכאן שמו) המקנה לו את ריחו האופייני, ומצוי גם בצמחי תבלין שונים כגון: רוזמרין (*Rosmarinus officinalis*) (Boutekedjiret et al., 2003), בזיליקום (*Ocimum basilicum*) (Werker et al., 1993), אזובית המדבר (*Origanum dayi* Post) (Dudai et al., 2003), מרווה רפואית (*Salvia officinalis*) (Ranger et al., 1998) ולבנדר (*Lavandula officinalis*) (Guillen et al., 1996). ל-1,8-Cineole שימושים רבים בתחום המזון, הקוסמטיקה והרפואה. הוא בעל תכונות אנטי-דלקתיות, משכך כאבים, ומסייע לטיפול בדרכי הנשימה (Juergens et al., 1998; Santos and Rao, 2000).

Camphor הוא מונוטרפן הידוע בריחו האופייני החזק. הוא מופק בעיקר מ"עץ הקמפור" (*Cinnamomum camphora*) הגדל באסיה. הוא מצוי גם בשמן האתרי של צמחי תבלין כדוגמת רוזמרין, מרווה ולבנדר (Guillen et al., 1996), לענה (*Artemisia annua*) (Juteau et al., 2002), ובזיליקום (Simon et al., 1999). לקמפור יש פעילות של דחייה וקטילת חרקים (Obeng-Ofori et al., 1998) ופעילות אנטי-מיקרוביאלית (Santoyo et al., 2005). ברפואה הוא משמש כחומר מחטא ומאלחש, אך בריכוזים גבוהים הוא רעיל, ועלול לפגוע בכבד ובמערכת העצבים (Uc et al., 2000).

Borneol הוא מונוטרפן אשר בתהליך החימצון הופך לקמפור. הוא מצוי בצמחי תבלין רבים, כגון: לענה חד-זרעית (*Artemisia herba alba*), אזוב מצוי (*Origanum vulgare*), תימין (*Coridothymus capitatus*), ריחן (*Ocimum canum*), לבנדר ורוזמרין (Ravid et al., 1998). יש לו פעילות אנטי-מיקרוביאלית (Delamare et al., 2007) ופעילות של דחייה וקטילת חרקים (Rozman et al., 2007).

Chrysanthemic acid, מונוטרפן עם טבעת משולשת, הוא פירתרואיד (Pyrethroid) המשמש כאבן בנין לקוטלי חרקים רבים, בדומה לפירתרין (Pyrethrin) המופק מהחרצית (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (Nishizawa et al., 1995).

τ-Cadinol הוא ססקוי-טרפן המצוי בעיקר בשרף המור (*Commiphora guidottii*). ניתן למצוא אותו בצמחי תבלין כדוגמת לבנדר (Guillen et al., 1996) ותימוס (*Thymus praecox*) (Schmidt et al., 2004). הוא בעל תכונות אנטי-מיקרוביאליות ובתחום הרפואה משמש כמרפה שרירים חלקים (Claeson et al., 1991) ואף מסייע בטיפול במחלת הסרטן (Takei et al., 2006).

Intermedeol הוא ססקוי-טרפן המצוי בעלי קליקרה אמריקאית (*Callicorpa americana*) (Carroll et al., 2007), תימוס (*Thymus caespititius*) (Salgueiro et al., 2000), אשוח (*Abies normanniana*) (Sakar et al., 1999) ומשבב (*Bothriochloa pertusa*) (Kaul and Vats, 1998). הוא בעל פעילות של דחיית חרקים (Chen et al., 2008 ; Carroll et al., 2007), ובתחום הרפואה, הוא בעל פוטנציאל לטיפול בלוקמיה (Jeong et al., 2002).

לאור תוצאות הסקר, נראה קשר בין מיקום האוכלוסייה בארץ לבין הרכב השמן האתרי. לכן התעורר הצורך בבחירת אוכלוסיות מייצגות, ובבדיקת התפלגות המרכיבים בין האוכלוסיות לפי מיקומן הגיאוגרפי. בבדיקות אלו נמצאה שונות בין ובתוך האוכלוסיות. השונות יכולה להיות בנוכחות או בחוסר של מרכיב מסוים בשמן האתרי, ואז מקורה גנטי, או בכמות היחסית של מרכיב מסוים ואז היא גם יכולה לנבוע מהשפעות גורמי סביבה (Hey and Waterman, 1993). נמצאה שונות בין אוכלוסיות הצפון והדרום, כאשר יש נקודת מפגש ביניהן באזור יהודה ושומרון, שם קיימת שונות גבוהה בתוך האוכלוסיות. שונות זו יכולה לנבוע מהשפעות של גורמים סביבתיים כגון משקעים וטמפרטורה.

בהתאם להגדרת הכימוטיפ (chemotype) של Hallahan (2000) - אוכלוסיות יציבות בתוך מין בעלות פרופיל שמן אתרי שונה - ניתן לקבוע כי לכתלה החריפה ישנם שלושה כימוטיפים, בהתאם למרכיב העיקרי בשמן האתרי:

1. כימוטיפ "קמפורי" – הן האוכלוסיות הדרומיות, אשר כ- 40% בממוצע מתכולת השמן

האתרי שלהן הוא Camphor. על אוכלוסיות אלו נמנות: צומת סיריר, הר רמון והמכתש

הקטן.

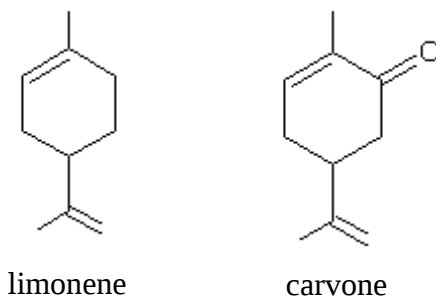
2. כימוטיפ "אינטרמדיאולי" – הן אוכלוסיות יהודה, שומרון, וצפון הנגב, אשר כ- 22% בממוצע מתכולת השמן האתרי שלהן הוא Intermedeol. על אוכלוסיות אלו נמנות: נחל זוהר, כפר אדומים ונופי פרת.

3. כימוטיפ "צפוני" – הן האוכלוסיות הצפוניות, אשר אינן מכילות Intermedeol בשמן האתרי, ו-Camphor מהווה מרכיב מינורי מתכולת השמן האתרי שלהן, אם בכלל. כמו כן הן עשירות ב-1,8-Cineole, Borneol, α -Cadinol ו-Chrysanthemic acid. על אוכלוסיות אלו נמנות: נחל קדש, נחל מירון, קיבוץ יסעור וגן-נר. יתכן כי גם האוכלוסייה הירדנית (Avato et al., 2004) נמנית על כימוטיפ זה.

נראה כי שילוב המרכיבים העיקריים בשמן האתרי של הכתלה החריפה באוכלוסיות השונות מקנה לו פוטנציאל לפעילות ביולוגית מגוונת. לחלק מהמרכיבים העיקריים ישנה פעילות ביולוגית דומה, כך שלשמן האתרי בכל הכימוטיפים, המורכב משילובים שונים ביניהם, פעילות ביולוגית דומה. ממצא זה מחזק את העדויות הרבות לשימוש בצמח ברפואה העממית ובהרחקת מזיקים (פלביץ' ויניב, 1991).

2. הרכב השמן האתרי בשיטות הפקה שונות

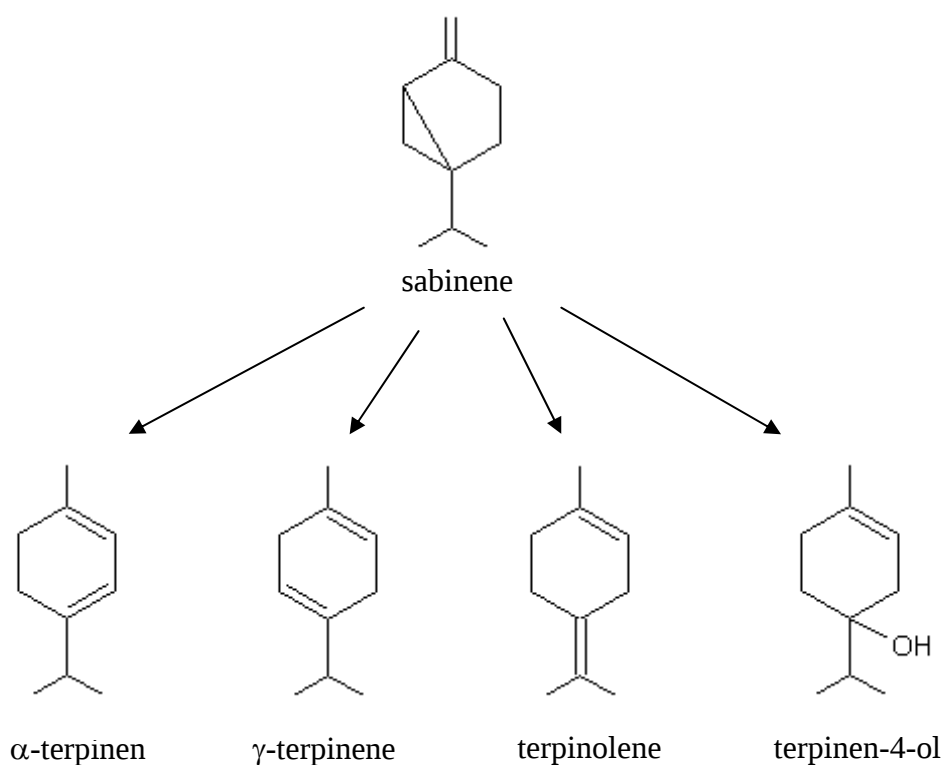
השיטות העיקריות כיום להפקת שמן אתרי מצמחים ארומאטיים הן מיצוי בממס אורגני, וזיקוק בקיטור או במים. שיטה נוספת, חדשה יחסית, היא שיטת ה-SPME, המאפשרת בדיקה של דוגמא קטנה מאוד, עד כדי בלוטת שמן אתרי אחת בלבד (Dudai and Belanger, 2008). כצפוי, נמצאו הבדלים משמעותיים בהרכב השמן האתרי של הכתלה החריפה המתקבל בכל שיטה. ההבדל המשמעותי ביותר נמצא בין שיטת ה-SPME לשתי השיטות האחרות. בשיטה זו נבדקת האווירה סביב הצמח. שיטה זו אינה כמותית, כך שלא ניתן לחשב את כמות השמן האתרי בצמח או בחלקיו השונים. בשיטת הזיקוק מעורב תהליך של חימום ממושך של הדוגמא, העלול לגרום לשינוי המרכיבים בשמן האתרי. על פי Koedam (1982), למשך זמן תהליך הזיקוק ישנה השפעה על הרכב השמן האתרי, כך שמרכיבים פולאריים המסיסים במים יעברו זיקוק לפני פחמימנים. לדוגמא: שמן אתרי של שמיר (*Anethum graveolens*) מכיל בעיקר limonene ו-carvone, המהווים יחדיו כ-95% מהשמן האתרי.



איור מס' 26: מבנה מולקולרי של limonene ו-carvone

נמצא כי במהלך תהליך הזיקוק, תכולת (%) ה- limonene בשמן האתרי הולכת וגדלה לעומת תכולת (%) ה-carvone ההולכת וקטנה. רק לאחר כ- 12 שעות זיקוק תכולתם (%) בשמן האתרי נשארת קבועה. מאחר ו-carvone פולארי יותר מ-limonene הוא נמס טוב יותר במים ועובר זיקוק מהיר יותר.

בנוסף לכך, במהלך הזיקוק יורד pH המים כתוצאה מנוכחות חומצות אורגניות. גם לחומציות מי הזיקוק ישנה השפעה על הרכב השמן האתרי כתוצאה מחימצון וארגון מחדש של מולקולות המרכיבים. לדוגמא: אחד המרכיבים העיקריים בשמן אתרי של ערער (*Juniperus sabina*) הוא sabinene, המהווה כ-30% מתכולת השמן האתרי. נמצא כי במהלך תהליך הזיקוק הופך ה-sabinene לארבעה מרכיבים שונים: α -terpinene, γ -terpinene, terpinolene ו-terpinen-4-ol. כתוצאה מכך, בתהליך ממושך של זיקוק תכולת (%) ה-sabinene בשמן האתרי יורדת, ותכולת (%) α -terpinene, γ -terpinene, terpinolene ו-terpinen-4-ol עולה.



איור מס' 27: שינוי המבנה המולקולארי של sabinene בתנאים חומציים

מקרה דומה נמצא גם בהפקת שמן אתרי מאורגנו (*Origanum dayi*) על ידי Dudai et al. (2003). (E)-sabinene hydrate acetate ו-(E)-sabinene hydrate הפכו בתהליך הזיקוק ל-terpinen-4-ol ול- α -terpinene.

בעבודה זו נמצא כי הזמן היעיל ביותר לזיקוק כתלה חריפה הוא שעותיים. בניגוד לשיטת הזיקוק, המצריכה דוגמא צמחית במשקל של לפחות כמה עשרות גרמים, בשיטת המיצוי ניתן להשתמש בדוגמא צמחית קטנה, עד כדי עלה בודד או פרח. בשיטת הזיקוק ניתן לכמת את התכולה היחסית של המרכיבים בשמן האתרי, באמצעות מדידת הנפח של התוצר המתקבל, ובשיטת המיצוי באמצעות אנאליזה ב-GC, עם שימוש בסטנדרט פנימי.

המסקנה העיקרית היא שלשיטת הפקת השמן האתרי מכתלה חריפה אכן יש השפעה מכרעת על ההרכב המתקבל באנליזה, ויש לבחור שיטה המתאימה לפי מטרות המחקר או השימוש. כפי שצוין בפרק התוצאות, ניתן לקבוע את הכימוטיפ של כל צמח גם על פי תוצאות שיטת הזיקוק וגם על פי תוצאות שיטת המיצוי. לכן, בעבודה זו, העוסקת באפיון השמן האתרי של הכתלה החריפה, בחרנו בשיטת המיצוי ב-MTBE, מאחר שהיא מייצגת באופן הקרוב ביותר את ההרכב של החומרים הנדיפים בצמח עצמו (Dudai and Belanger, 2008).

3. השתנות התכולה וההרכב של השמן האתרי מאוכלוסיות גן נר במהלך השנה

למרות ההשפעה הרבה שיש לגורמים הגנטיים על קביעת כימוטיפ הצמח, הרכב ותכולת השמן האתרי של כימוטיפ ספציפי יכול להשתנות במהלך השנה בהשפעת שינויים אקלימיים ופנולוגיים (Putievsky et al., 1988, Dudai et al., 2005).

עוצמת אור: עוצמת האור משתנתה במהלך השנה בהתאם לעוצמת קרינת השמש הפוגעת בכדור הארץ. עוצמת הקרינה משתנה כתוצאה מעננות והשתנות זווית השמש, בהתאם לעונות השנה. בניסוי של גידול אורגנו (*Origanum syriacum*) בתנאי הצללה שונים נראה כי להצללה הייתה השפעה על תכולת השמן האתרי וקצב הפוטוסינתזה (Dudai et al., 1992). ההשערה היא שיש קשר בין גורמים המשפיעים על פוטוסינתזה לשונות בתכולת השמן האתרי, מאחר ופוטוסינתזה מספקת חומרי גלם ליצירת תרכובות אורגניות בצמח. כמו כן Yamura et. al. (1989) הראו כי למרות שאור הוא גורם קריטי ליצירת שמן אתרי, מעורב בתהליך גם גורם נוסף שאינו קשור לפוטוסינתזה.

אורך יום: זהו גורם נוסף הקשור באור ומשתנה במהלך השנה. נראה כי גם לאורך היום ישנה השפעה על תכולה והרכב השמן האתרי (Dudai et al., 1992). לדוגמה, בניסוי שנערך בנענה (*Mentha piperita*) נמצא כי אורך יום משפיע על הרכב השמן האתרי הנוצר. בתנאי יום קצר השמן האתרי הכיל יותר מנטופורן ופחות מנטון ומנטול מאשר בתנאי יום ארוך (Clark and Menary, 1980). הסברים אפשריים לכך הם שאורך היום משפיע על ביטוי גנים, ושבבקה על יצירת שמן אתרי מעורבים רצפטורים המגיבים לאור כגון פיטוכרום או אחרים (McConkey et al., 2000).

טמפרטורה: כידוע, משתנה טמפרטורת הסביבה במהלך עונות השנה, ואכן יש לה השפעה על התכולה והרכב השמן האתרי. לדוגמה, בניסוי שנערך בצתרה (*Satureja douglassi*) נמצא כי

תכולת השמן האתרי בעלים הייתה גבוהה יותר בתנאי טמפרטורה של 25°C מאשר ב- 15°C, בתנאי הארה שונים. המסקנה הייתה שהטמפרטורה משפיעה על תהליכים אנוימתיים פוטוסינתטיים, המשפיעים על ההרכב והתכולה של השמן האתרי (Lincoln and Langenheim, 1978). בנוסף לכך, לטמפרטורה ישנה השפעה עקיפה על תכולת השמן האתרי, בכך שהיא משפיעה על מורפולוגית העלים, כפי שנמצא באזוב מצוי. עם עליה בטמפרטורה בלוטות השמן האתרי נעשו צפופות יותר והעלים קטנים יותר (Dudai et al., 1992).

זמינות מים: בטבע משתנית זמינות המים בהתאם לעונות השנה. גם לכמות המים המגיעה אל הצמח ישנה השפעה על הרכב השמן האתרי ותכולתו. עקת יובש עלולה לגרום לשינוי בתכולת השמן האתרי כתוצאה משינוי הביומסה של הצמח. בצתרה (*Satureja hortensis*) נמצא כי עקת יובש גרמה לירידה בגובה הצמח, במשקל יבש ומשקל טרי, אך גרמה לעליה בתכולת השמן האתרי (Baher et al., 2002). בגרניום (*Pelargonium graveolens*), עקת יובש גרמה לשינוי בהרכב ותכולת השמן האתרי בצמח. הביומסה של הצמחים אשר גודלו בתנאי עקה הייתה נמוכה, אך איכות השמן האתרי בהם הייתה גבוהה, כלומר היחס בין citronellol ל- geraniol היה גבוה יותר. הירידה בתכולת השמן האתרי נובעת מהירידה בביומסה של הצמח, אך היא אינה משפיעה על תכולת השמן האתרי בעלים (Putievsky et al., 1990).

צמחי הכתלה שגדלו בבר היו חשופים לתנאי האקלים המשתנים במהלך השנה: משרעת טמפרטורות רחבה, שינויים בעוצמת האור, שינויים באורך היום ובמשטר המים. תכולת השמן האתרי של אוכלוסיית בר (איור מס' 10 A) משתנה במהלך השנה כתוצאה ממספר גורמים אקלימיים. מאחר ושיא בתכולת השמן האתרי נצפה בחודשי הקיץ, יתכן שעוצמת אור גבוהה, יום ארוך וטמפרטורה גבוהה תורמים לכך, כפי שנמצא באזוב מצוי (Dudai et al. 1992). ואכן, בצמחים אשר גודלו בחממה (איור מס' 10 B), בתנאי טמפרטורה גבוהים יותר והשקיה מסודרת, תכולת השמן האתרי בצמח הייתה גבוהה יותר.

בצמחים ארומאטיים ממשפחת השפתניים תכולת השמן האתרי גבוהה יותר בשלב הפריחה, הודות לתכולת שמן אתרי גבוהה בעלי הגביע (Dudai et al., 1988). במחקרים שבוצעו בלענה (Juteau et al., 2002) נראית תמונה הפוכה. תכולת השמן הגבוהה ביותר היא בשלב הוגטטיבי ולא בשלב הפריחה. בעבודה זו נמצאה מגמה זהה.

מועד הפריחה של הכתלה הוא בסתיו, ובתקופה זו אכן חלה ירידה בתכולת השמן האתרי בצמח, אשר נמשכת עד לסוף החורף. במשך תקופה זו, גבעולי הצמח נעשים מעוצים עד להתייבשות מוחלטת בחורף. כאשר הצמח מתחדש, עולה תכולת השמן האתרי עם יצירת עלים חדשים. הצמח מגיע לשיא בלובו בחודשי הקיץ, כאשר תכולת השמן האתרי בצמח מגיעה לשיאה. היא מתחילה לרדת כאשר מתחילים להתפתח ענפים צדדיים בעלי עלים קטנים ומאוחר יותר גם פרחים. לסיכום, ניתן לומר כי תכולת השמן האתרי בכתלה משתנה במהלך השנה עם השינויים במורפולוגית הצמח.

כאשר מסתכלים על השינויים בתכולת המרכיבים העיקריים בשמן האתרי (איור מס' 11) נראות מגמות מעורבות. בתכולת Chrysanthemic acid נמצאו שני שיאים, האחד בתקופת לבלוב הצמח באביב, והשני לפני מועד הפריחה, בעת יצירת הניצנים בתחילת הסתיו. יש לציין כי בחודש אפריל לא נמצא כלל מרכיב זה. יתכן ויש קשר בין פעולת האנזים לסינתזת Chrysanthemic acid לבין שינויים פנולוגיים או גורמי סביבה.

על מנת לבדוק האם השינויים בתכולה ובהרכב השמן האתרי בצמח נובעים מגורמי הסביבה, יש לבצע ניסויים בתנאים מבוקרים כדי לבדוד את הגורמים הרלוונטיים. זאת אפשר לבצע באמצעות גידול צמחים באותו הגיל בפיטוטרון בתנאי טמפרטורה, הארה והשקיה מבוקרים. לדוגמא, בניסוי שנערך בזוטה לבנה (*Micromeria fruticosa*) נמצאו הבדלים דרמטיים בהרכב השמן האתרי בצמח במהלך חילופי עונות השנה. בקיץ, המרכיב העיקרי בשמן האתרי היה pulegone אשר הווה כ-80% מתכולת השמן האתרי, ובחורף המרכיב העיקרי היה isomenthol אשר הווה אף הוא כ-80% מתכולת השמן האתרי. כאשר גידלו את הצמחים בתנאי טמפרטורה והארה מבוקרים, נמצא כי הסיבה להבדלים אינה טמונה בתנאי הסביבה אלא בגיל העלה. מסתבר כי הרכב השמן האתרי בעלים הצעירים (הנוצרים בחורף) שונה בצורה משמעותית מהרכבו בעלים הבוגרים (בקיץ) (Dudai et al., 2001).

4. התפלגות מרכיבי השמן האתרי בצמח

בצמחים ארומאטיים נאגר השמן האתרי באיברים שונים בצמח. ישנם צמחים בהם השמן האתרי נמצא בעיקר בעלים (רוזמרין, טימין) וצמחים בהם הוא נמצא בעיקר בפרחים (לבנדר, קמומיל). בעבודה זו נמצא כי בכתלה חריפה מצוי השמן האתרי בעיקר בעלים. תכולה גבוהה של שמן אתרי נמצאת גם בניצנים של פרחים, משום שהם מורכבים גם מעלי הגביע, המכילים שמן אתרי. בהתאם לכך, דומה תכולת המרכיבים העיקריים בשמן האתרי של העלים ושל הניצנים. הרכב השמן האתרי של הפרחים והגבעולים אינו משקף את הרכב השמן האתרי של הצמח השלם. לכן, לצורך קביעת כימוטיפ הצמח צריך להפיק שמן אתרי מענף שלם, עלים או ניצנים.

בעבודה זו נמצא כי תכולת השמן האתרי בעלים הולכת ויורדת לאורך הענף בכיוון באסיפטלי. עובדה זו מתאימה לתוצאות מחקרים אשר נעשו בצמחים ארומאטיים אחרים. בצמחים רבים, עם גדילת העלה ישנה ירידה בתכולה היחסית של השמן האתרי הנובעת כנראה מעליה בגודל העלה. יחד עם זאת, ישנה עליה גם בכמות המוחלטת של השמן האתרי בעלה, עד לשלב מסוים שממנו ואילך התכולה המוחלטת אינה עולה ואף יורדת (Dudai, 2005).

העלים התחתונים בצמח נוצרים בשלב מוקדם יותר, לכן הם מייצגים עלים מבוגרים, לעומת העליונים שנוצרו בשלב מאוחר יותר, המייצגים עלים הצעירים. בעלים צעירים מכיל השמן האתרי כמויות גבוהות יותר של קדמים (פרקורסורים) במסלול הביוסינתטי, ואילו בעלים מבוגרים המרכיבים העיקריים הם תוצרים סופיים (דודאי וחובריו, 1994). בהתאם לכך ניתן

להסביר את השוני בתכולת המרכיבים לאורך הענף. מרכיבים אשר תכולתם בשמן האתרי הולכת וקטנה ככל שעולים לאורך הענף, מהווים קדמים למרכיבים אחרים אשר תכולתם בשמן האתרי הולכת וגדלה ככל שעולים לאורך הענף. מכך ניתן לשער כי α -Cadinol נמצא בשלב התחלתי של תהליך ביוסינתטי כלשהו, ולעומתו 1,8-Cineole נמצא בשלב מתקדם יותר. כמו כן, ישנם מרכיבים, כדוגמת Chrysanthemic acid, אשר תכולתם נשארת קבועה לאורך הענף, כלומר הם אינם לוקחים חלק במסלול ביוסינתטי ליצירת מרכיבים נוספים.

5. הפרדת מרכיבים לא ידועים בשיטת Flash Chromatography

השמן האתרי של הכתלה החריפה מכיל כ- 83 מרכיבים. יש לציין כי 21% מתכולתו (כ-25 מרכיבים) אינם מזוהים על ידי ספריות ה-MS, וביניהם מצויים שני חומרים אשר מהווים חלק ניכר מהשמן האתרי: Unknown 66 (9.15%) ו-Unknown 70 (4.78%). לצורך זיהויים היה צריך להפרידם מהשמן האתרי בצורה נקייה ביותר, בדומה להפרדת Piperitone oxide משמן אתרי של מנטה (Larkov et al., 2007) והפרדת Sabinene hydrate משמן אתרי של אורגנו (Larkov et al., 2005) בשיטת *Flash chromatography*. רוב המקטעים שנאספו היו שונים זה מזה בהרכבם הכימי, ומקטעים דומים, בהם נראתה חפיפה בין העקומות (איור מס' 20), אוחדו זה עם זה. כל עקומה מייצגת חומר נפרד, לכן ניתן להסיק כי לא חלה הפרדה מלאה בין מרכיבי השמן האתרי. כלומר, כל מקטע שנאסף הכיל מספר חומרים. על מנת להפריד בין החומרים יש לבצע כרומטוגרפיה נוספת עבור כל מקטע, ולהשתמש בתערובת ממסים בעלת פולריות שונה מזו ששימשה לקבלת התוצאות הנוכחיות. הרכב המקטעים אופיין גרדיאנט פולריות עולה, בהתאם לגרדיאנט תערובת הממסים, כך שהמקטעים הראשונים שנאספו הכילו חומרים אפולריים, וככל שהלך והתקדם איסוף המקטעים, עלתה פולריות החומרים המרכיבים אותם. המקטעים הראשונים הכילו פחמימנים כדוגמת α -Thujene (מקטע מס' 1), לאחר מכן יצאו מקטעים שהכילו קטונים, כדוגמת Camphor (מקטע מס' 15), והמקטעים האחרונים הכילו כהלים, כדוגמת Borneol (מקטע מס' 25-28). מכאן ניתן להסיק כי ניתן לשייך את המרכיבים הלא מזוהים לקבוצה פונקציונאלית מסוימת לפי סדר האלוזיה שלהם מעמודת ה-*Flash chromatography*. חיזוק לכך נמצא בזיהוי של המרכיבים Unknown 66 ו-Unknown 70 באמצעות NMR. הם נאספו מהמקטעים 8-10, כלומר אמורים להיות פחמימנים ללא קבוצה המכילה אטום חמצן. ואכן, התוצאות מצביעות על שני איזומרים פחמימניים (איור מס' 24).

לסיכום, מעבודה זו ניתן לקבוע כי קיימים שלושה טיפוסים כימיים של כתלה חריפה בישראל, הנבדלים ביניהם בהרכב השמן האתרי. לצורך הפקת שמן אתרי בקנה מידה תעשייתי, יש לקצור את הכתלה בחודשי הקיץ, לפני מועד הפריחה, ולהפיקו באמצעות זיקוק של הצמח השלם או של עליו. לשמן האתרי של כל הטיפוסים הכימיים יש פוטנציאל של פעילות אנטי-בקטריאלית ופעילות של דחיית חרקים, ומשום כך הוא יכול לשמש כבסיס לתכשירים פרמצבטיים או לחומרי הדברה טבעיים.

רשימת ספרות

- אלמוג, מ. (2001). שונות כימית בין ובתוך אוכלוסיות טבעיות של זוטה לבנה *Micromeria fruticosa* L. בבתי גידול שונים בארץ, עבודת גמר לתואר מוסמך, המחלקה למדעי הצמח, אוניברסיטת תל-אביב.
- בן-עזרה, ד. (1961). הכתלה החריפה, טבע וארץ, ט'. 382-389.
- דודאי, נ., פוטיבסקי, א. ורביד, ע. (1994), גורמים המשפיעים על כמות ואיכות השמן האתרי בצמחים ארומטיים. מחקר חקלאי בישראל, ז'. 3-20.
- דנין, א. (1983). כתלה חריפה. צמחים בעלי פרחים ב', החי והצומח של ארץ ישראל, משרד הביטחון-ההוצאה לאור, ישראל. 138.
- לינדר, י. (2001). השונות הכימית בין ובתוך אוכלוסיות טבעיות של צתרה ורודה *Satureja thymbra* L. בבתי גידול שונים בארץ. עבודת גמר לתואר מוסמך, המחלקה למדעי הצמח, אוניברסיטת תל-אביב.
- פינברון-דותן, נ. ודנין, א. (1991). המגדיר לצמחי בר בארץ ישראל. הוצאת כנה, ירושלים.
- פלביץ', ד. ויינב, ז. (1991). צמחי המרפא של ארץ ישראל. תמוז-מודן. 186-188.
- קריספיל, נ. (1985). ילקוט הצמחים. הוצאת כנה, ירושלים.
- רביד, ע. וורקר, א. (1994). השמן האתרי בצמחי ארומה מאגן הים התיכון – שיטות הפקה, הרכב, חומרים כיראליים ואברי הפרשה. מחקר חקלאי בישראל, ז'. 85-101.
- Adam, K.P., Thiel, R. Zapp, J. and Becker, H. (1998). Involvement of the mevalonic acid pathway and the glyceraldehyde-pyruvate pathway in terpenoid biosynthesis of the liverworts *Ricciocarpos natans* and *Conocephalum ocimum*. Arch. Biochemistry and Biophysics 354: 181-187.
- Adams, R.P. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, U.S.A., pp.1-7.
- Afifi, F.U. and Aburjai, T. (2004). Antiplatelet activity of *Varthemia iphionoides*. Fitoterapia. 75: 629-633.
- Afifi, F., Saket, M., Jaghabir, M. and Al-Eisawi, D. (1997). Effect of *Varthemia iphionoides* on blood glucose level of normal rats and rats with streptozonic-induced diabetes mellitus. Current Therapeutic Research. 58: 888-892.
- Al-Dabbas, M.M., Hashinaga, F., Abdelgaleil, S.A.M., Sugauma, T., Akiyama, K. and Hayashi, H. (2005). Antibacterial activity of eudesmane sesquiterpene isolated from common *Varthemia*, *Varthemia iphionoides*. Journal of Ethnopharmacology. 97: 237-240.

- Al-Mustafa, A.H. and Al-Thunibat, O.Y. (2008). Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11: 351-358.
- Avato, P., Raffo, F., Aldouri, N.A. and Vartanian, S.T. (2004). Essential oil of *Varthemia iphionoides* from Jordan. *Flavour and Fragrance Journal*. 19: 559-561.
- Baher, Z.F., Mirza, M., Ghorbanli, M. and Rezaii, M.B. (2002). The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis*. *Flavour and Fragrance Journal*. 17: 275-277.
- Barazani, O., Cohen, Y., Fait, A., Diminshtein, S., Dudai, N., Ravid, U., Putievsky, E. and Friedman, J. (2002). Chemotypic differentiation in indigenous populations of *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* in Israel. *Biochemical Systematics and Ecology*. 30: 721-731.
- Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R. and Bessiere, J.M. (2003). Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*. 18: 481-484.
- Cane, D.E. (1990). Enzymatic formation of sesquiterpene. *Chemistry Review*. 90: 1089-1103.
- Carroll, J.F., Cantrell, C.L., Klun, J.A. and Kramer, M. (2007). Repellency of two terpenoid compounds isolated from *Callicorpa americana* (Lamiaceae) against *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* ticks. *Experimental and Applied Acarology*. 41: 215-224.
- Chen, J., Cantrell, C.L., Duke, S.O. and Allen, M.L. (2008). Repellency of Callicarpinal and Intermedeol against workers of imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*. 101: 265-271.
- Claeson, P., Andersson, R. and Samuelsson, G. (1991). T-cadinol: a pharmacologically active constituent of scented myrrh: introductory pharmacologically characterization and high field ¹H- and ¹³C-NMR data. *Planta Medica*. 57: 352-356.
- Clark, R.J. and Menary, R.C. (1980). Environmental effects on peppermint. I. Effect of daylength, photon flux density, night temperature on yield and composition of peppermint oil. *Australian Journal of Plant Physiology*. 7: 685-692.
- Clevenger, J.F. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. *Journal of the American Pharmacists Association*. 17: 345-349.

- Delamare, A.P.L., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L. and Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in south Brazil. Food Chemistry. 100: 603-608.
- Dudai, N. (1998). Control and improvement of the quality and quantity of essential oils in aromatic plants. Natural Oils Research Association (N.O.R.A) Newsletter. 3: 4-8.
- Dudai, N. (2005). Factors affecting content and composition of essential oils in aromatic plants. in: Dris, R. (Ed), Crops Growth, Quality and Biotechnology, part III: Quality Management of Food Crops for Processing Technology, WFL Publisher, Helsinki, Finland.
- Dudai, N. and Belanger, F.G. (2008). Aroma as a factor in the breeding process of fresh herbs – the case of basil. Biotechnology in Flavor Production, Blackwell Publishing, U.S.A. pp. 169-170.
- Dudai, N., Larkov, O., Chaimovitsh, D., Lewinshon, E., Freiman, L. and Ravid, U. (2003). Essential oil compounds of *Origanum dayi* Post. Flavour and Fragrance Journal. 18: 334-337.
- Dudai, N., Larkov, O., Ravid, U., Putievsky, E. and Lewinsohn, E. (2001). Developmental control of monoterpene content and composition in *Micromeria fruticosa* (L.) Druce. Annals of Botany. 88: 349-354.
- Dudai, N., Putievsky, E., Ravid, U., Palevitch, D. and Halevy A.H. (1992). Monoterpene content in *Origanum syriacum* as affected by environmental conditions and flowering. Physiologia Plantarum. 84: 453-459.
- Dudai, N., Werker, E., Putievsky, E., Ravid, U., Palevitch, D. and Halevy, A.H. (1988). Glandular hairs and essential oil in leaves and flowers of *Majorana syrica* L. Israel Journal of Botany. 37: 11-18.
- Duke, S.O. and Paul, R.N. (1993). Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. International Journal of Plant Sciences. 154: 107-118.
- Ferreira, M.J.P., Costantin, M.B., Sartorelli, P., Rodrigues, G.V., Limberger, R., Henriques, A.T., Kato, M.J. and Emerenciano, V.P. (2001). Computer-aided method for identification of components in essential oil by ¹³C NMR spectroscopy. Analytica Chimica Acta. 447: 125-134.
- Gershenzon, J. (1994). Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. Journal of Chemical Ecology. 20: 1281-1328.

- Gotsiou, P., Naxakis, G. and Skoula, M. (2002). Diversity in the composition of monoterpenoides of *Origanom microphyllum* (Labiatae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 30: 865-879.
- Guillen, M.D., Cabo, N. and Burillo, J. (1996). Characterization of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 70: 359-363.
- Hallahan, D.L. (2000). Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of Labiates plants. *Advances in Botanical Research*. 31: 77-120
- Hey, R.K.M. and Waterman, P.G. (1993). *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*. Longman Scientific and Technical, Essex, UK.
- Holm, Y., Laakso, I., Hiltunen, R. and Galambosi, B. (1997). Variation in the essential oil composition of *Artemisia annua* L. of different origin cultivated in Finland. *Flavour and Fragrance Journal*. 12: 241-246.
- Ibrahim, M. A., Kainulainen, P., Aflatuni, A., Tiilikkala, K. and Holopainen, J.K. (2001). Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agricultural and Food Science in Finland*. 10: 243-259.
- Ikan, R. (1991). Flash chromatography of essential oil constituents. *Natural Products*, 2nd edition, Academic Press INC., Israel. pp. 198-201.
- Jeong, S.H., Koo, S.J., Choi, J.H., Park, J.H., Ha, J., Park, H.J. and Lee, K.T. (2002). Intermedeol isolated from the leaves of *Ligularia fischeri* ver. *Spiciformis* induced the differentiation of human acute promyeocytic leukemia HL-60 cells. *Planta Medica*. 68: 881-885.
- Juergens, U.R., Stober, M., Schmidt Schilling, L., Kleuver, T. and Vetter, H. (1998). Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-Cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. *European Journal of Medical Research*. 3: 407-412.
- Juteau, F., Masotti, V., Bessiere, J.M., Dherbomez, M. and Viano, J. (2002). Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil, *Fitoterapia*. 73: 532-535.
- Kaul, V.K. and Vats, S.K. (1998). Essential oil composition of *Bothriochloa pertusa* and phyletic relationship in aromatic grasses. *Biochemical Systematics and Ecology*. 26: 347-356.

- Koedam, A. (1982). The influence of some distillation conditions on essential oil composition. *Aromacit plants: Basic and Applied Aspects*. Martinus Nijhoff Publishres. Netherlands. pp. 229-236.
- Kokkini, S., Hanlidou, E., Karousou, R. and Lanaras, T. (2002). Variation of Pulegone content in Pennyroyal (*Mentha pulegium*) plants growing wild in Greece. *Journal of Essential Oil Research*. 14: 224-227.
- Kokkini, S. and Papageorgiou, V. (1988). Components of essential oils from *Mentha longifolia* growing wild in Greece. *Planta Medica*. 54: 59-60.
- Langenheim, J.H. (1994). Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*. 20: 1223-1280.
- Larkov, O., Dunkelblum, E., Zada, A., Lewinsohn, E., Freiman, L., Dudai, N. and Ravid, U. (2005). Enantiomeric composition of (E)- and (Z)-Sabinene hydrate and their acetates in five *Origanum* spp. *Flavour and Fragrance Journal*. 20: 109-114.
- Larkov, O., Matasyoh, J.C., Dudai, N., Lewinsohn, E., Mayer, A.A. and Ravid, U. (2007). Distribution of piperitone oxide stereoisomers in *Mentha* and *Micromeria* species and their chemical syntheses. *Flavour and Fragrance Journal*. 22: 328-333.
- Lincoln, D.E. and Langenheim, J.H. (1978). Effect of light and temperature on monoterpenoid yield and composition in *Satureja douglasii*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 6: 21-32.
- Loziene, K. and Venskutonis, P.R. (2005). Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 33: 517-525.
- McConkey, M.E., Gershenzon, J. and Croteau, R.B. (2000). Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiology*. 122: 215-223.
- Mirzaie-Nodoushan, H., Rezaie, M. and Jaumanad, K. (2001). Path analysis of the essential oil related characters in *Mentha* spp. *Flavour and Fragrance Journal*. 16: 340-343.
- Monterio, W.R., Castro, M.D.M., Mazzoni-Viveiros, S.C. and Mahlberg, P.G. (2001). Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. – Asteraceae. *Revta Brazil. Bot.*, Sao Paulo. 24: 349-357.
- Nishzawa, M., Shimizu, M., Ohkawa, H. and Kanaoka, M. (1995). Stereoselective production of (+)-*trans*-Chrysanthemic acid by a microbial esterase: cloning, nucleotide sequence, and overexpression of the esterase gene of *Arthrobacter*

- globiformis* in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 61: 3208-3215.
- Obeng-Ofori, D., Reichmuyh, C.H., Bekele, A.J. and Hassanali, A. (1998). Toxicity and protectant potential of Camphor, a major component of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum*, against four stored product beetles. International Journal of Pest Management. 44: 203-209.
- Putievsky, E., Ravid, U., Carmeli, D. and Eshel, A. (1992). Variation in essential oil of *Artemisia judaica* chemotypes related to phenological and environmental factors. Flavour and Fragrance Journal. 7: 253-257.
- Putievsky, E., Ravid, U. and Dudai, N. (1988). Phenological and seasonal influences on essential oil of cultivated clone of *Origanum vulgare* L. Journal of the Science of Food and Agriculture. 43: 225-228.
- Putievsky, E., Ravid, U. and Dudai, N. (1990). Effect of water stress on yield components and essential oil of *Pelargonium graveolens*. Journal of Essential oil Research. 2: 111-114.
- Ranger, R., Mechler, Ch. and Jurenitsch, J. (1998). Composition of the essential oils of commercial samples of *Salvia officinalis* L. and *S. fruticosa* Miller: a comparison of oils obtained by extraction and steam distillation. Phytochemical Analysis. 7: 289-293.
- Ravid, U., Putievsky, E. and Katzir, I. (1998). Stereochemical analysis of borneol in essential oils using permethylated β -cyclodextrin as a chiral stationary phase. Flavour and Fragrance Journal. 11: 191-195.
- Rozman, V., Kalinovic, I. and Korunic, Z. (2007). Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. Journal of Stored Products Research. 43: 349-355.
- Sakar, M.K., Ercil, D., Del Olmo, E. and San Feliciano, A. (1999). Phytochemical communication constituents of *Abies normanniana* ssp. *bornmuelleriana*. Fitoterapia. 70: 103-105.
- Salgueiro, L.R., Vila, R., Tomas, X., Canigual, S., Paiva, J., Proenca-Da-Cunha, A. and Adzet, T. (2000). Essential oil composition and variability of *Thymus lotocephalus* and *Thymus mourae*. Biochemical Systematics and Ecology. 28: 457-470.

- Salgueiro, L., Vila, R., Tomi, F., Figueiredo, A., Barroso, J., Canigüeral, S., Casanova, S., Proenca-Da-Cunha, A. and Adzet, T. (1997a). Variability of essential oils of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochemistry*. 45: 307-311.
- Salgueiro, L., Vila, R., Tom, F., Figueiredo, A., Barroso, J., Canigüeral, S., Casanova, S., Proenca-Da-Cunha, A. and Adzet, T. (1997b). Composition and variability of essential oils of *Thymus* species from section *Mastichina* from Portugal. *Biochemical Systematics and Ecology*. 25: 659-672.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F. and Sangwan, R.S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. 34: 3-21.
- Santos, F.A. and Rao, V.S.N. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-Cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*. 14: 240-244.
- Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F.J. and Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*. 68: 790-795.
- Sayyah, M., Nadjafnia, L. and Kamalinejad, M. (2004). Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*. 94: 283-287.
- Schmidt, A., Bischof-Drichnik, C. and Stahl-Biskup, E. (2004). Essential oil polymorphism of *Thymus praecox* subsp. *Arcticus* on the British Isles. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32: 409-421.
- Simon, J.E., Morales, M.R., Phippen, W.B., Vieria, R.F. and Hao, Z. (1999). Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria. pp. 499-505.
- Skoula, M., Abbes, J.E. and Johnson, C.B. (2000). Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia fruticosa* Mill. growing in Crete. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28: 551-561.
- Takei, M., Umeyama, A. and Arihara S. (2006). T-cadinol and calamenene induce dendritic cells from human monocytes and drive Th1 polarization. *European Journal of Pharmacology*. 537: 190-199.
- Uc, A., Bishop, W.P. and Sanders, K.D. (2000). Camphor hepatotoxicity. *Southern Medical Journal*. 93 : 596-598.
- Voirin, B., Brun, N. and Bayet, C. (1990). Effects of daylength on the monoterpene composition of leaves of *Mentha X piperita*. *Phytochemistry*. 29: 749-755.

- Walradt, J.P. (1982). Analysis of fragrance materials, *Fragrance Chemistry*. Academic Press, New York, U.S.A. pp. 575-612.
- Wardencki, W., Michulec, M. and Curylo, J. (2004). A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology*. 39: 703-717.
- Werker, E., Putievsky, E. and Ravid, U. (1985). Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of Labiatae. *Israel Journal of Botany*. 34: 35-45.
- Werker, E., Putievsky, E., Ravid, U., Dudai, N., and Katzir, I. (1993). Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Annals of Botany*. 71: 43-50.
- Werker, E., Putievsky, E., Ravid, U., Dudai, N., and Katzir, I. (1994). Glandular hairs, secretory cavities, and the essential oil in leaves of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Journal of Herbs, Spices & Medical Plants*. 2: 19-32.
- Yamaura, T., Tanaka, S. and Tabata, M. (1989). Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in thyme seedlings. *Phytochemistry*. 28: 741-744.

נספח מס' 1 – תכולת שמן אתרי של כתלה חריפה בסקר אוכלוסיות בר בישראל

טבלה מס' 1 א': תכולת מרכיבים עיקריים (%) בשמן אתרי של כתלה חריפה בסקר אוכלוסיות בר בישראל

שם המרכיב	אוכלוסיה	מחצית נטופה	צומת צלמון	עין כמונים	נחל מירון	צומת פלך	כרמיאל	יודפת	אלון הגליל	חמת גדר	חניון נחל קדש	קיבוץ יראון	צומת יסעור	גן נר
1,8-Cineole		7.08	10.81	3.56	13.48	8.21	5.68	6.51	6.31	1.46	7.87	8.79	3.10	10.22
Camphor		0.24	0.59	0.23	0.08	0.16	n.d.	0.16	n.d.	0.30	0.08	0.10	n.d.	0.17
Borneol		7.42	15.90	9.96	4.94	14.41	1.72	8.54	0.28	13.61	10.33	11.42	5.15	11.44
Chrysanthemic acid		9.81	5.12	15.71	7.24	18.88	21.95	10.55	17.72	1.28	24.28	13.33	8.23	13.05
Unknown 29		10.13	9.64	9.03	14.34	8.95	7.43	16.61	14.27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
τ-Cadinol		9.78	9.68	14.67	11.07	8.63	13.80	11.36	12.95	31.26	16.35	17.29	22.99	9.03

שם המרכיב	אוכלוסיה	אלון	כוכב השחר	צומת 505	גיתית	חמרה	רועי	רותם	כפר אדומים	מישור אדומים	נופי פרת	עין פואר	גבעת רם	נחל זוהר
1,8-Cineole		5.26	11.54	8.04	9.82	7.87	8.08	5.15	19.00	11.00	7.87	7.95	10.20	9.81
Camphor		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	n.d.	0.27	n.d.
Borneol		n.d.	0.11	4.45	6.13	12.17	10.00	5.73	n.d.	0.03	8.22	0.04	17.43	0.63
Chrysanthemic acid		19.36	19.69	32.24	18.97	25.57	18.35	26.75	1.05	12.18	5.93	21.90	22.81	1.07
Unknown 29		11.28	5.21	11.57	6.14	7.81	11.25	9.37	n.d.	2.99	2.67	7.75	1.91	n.d.
τ-Cadinol		1.05	18.12	16.98	15.45	16.92	15.11	16.79	6.83	3.64	8.26	6.71	0.17	n.d.
Intermedeol		27.50	n.d.	n.d.	10.21	n.d.	9.09	n.d.	12.92	19.45	28.87	15.81	1.13	44.77

שם המרכיב	אוכלוסיה	ערד	המכתש הקטן	נחל הרועה	הר רמון	הר שגיא	צומת סיירים
1,8-Cineole		7.49	5.54	8.92	1.91	3.80	3.44
Camphor		0.38	44.69	0.08	43.15	41.84	36.61
Borneol		6.11	2.73	4.17	2.00	1.14	2.06
Chrysanthemic acid		3.54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
τ-Cadinol		2.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Intermedeol		42.86	n.d.	37.49	n.d.	n.d.	n.d.

טבלה מס' 2 א' : תכולת מרכיבים שאינם עיקריים (%) בשמן אתרי של כתלה חריפה בסקר אוכלוסיות בר בישראל

שם המרכיב	אוכלוסיה	מצפה נטופה	צומת צלמון	עין כמונים	נחל מירון	צומת פלך	כרמיאל	יודפת	אלון הגליל	חמת גדר	חניון נחל קדש	קיבוץ יראון
Santolina triene		0.05	0.07	0.04	0.14	0.26	0.18	0.10	0.12	n.d.	0.53	0.46
α -Thujene		0.10	0.11	0.09	0.20	0.72	0.26	0.23	0.18	n.d.	0.34	0.45
α -Pinene		0.35	0.61	0.23	0.64	0.78	0.53	0.30	0.37	0.22	0.95	1.28
Camphene		n.d.	0.22	0.06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.12	0.18
Sabinene		0.11	0.15	0.12	0.23	0.91	0.78	0.35	0.20	n.d.	1.26	1.52
β -Pinene		0.27	0.42	0.21	0.32	0.79	0.64	0.28	0.27	0.13	1.21	1.47
5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene		1.86	1.57	1.45	1.68	1.36	1.14	2.19	1.94	0.86	0.66	0.57
α -Terpinene		0.26	n.d.	n.d.	0.49	0.75	0.36	n.d.	0.36	n.d.	0.28	0.43
para-Cymene		0.25	0.74	0.09	0.44	0.21	0.27	0.28	0.22	n.d.	0.23	0.53
γ -Terpinene		0.15	0.15	0.10	0.25	0.54	0.21	0.22	0.19	0.07	0.35	0.52
cis-Sabinene hydrate		0.58	0.30	0.27	0.56	0.58	0.54	0.55	0.55	n.d.	0.56	0.60
ortho-Guaiacol		0.54	0.59	0.41	0.56	n.d.	0.28	n.d.	0.57	n.d.	0.17	0.14
trans-Sabinene hydrate		0.13	0.12	0.10	0.19	0.43	0.27	0.24	0.17	n.d.	0.82	0.73
Phenyl ethyl alcohol		n.d.	0.18	0.06	0.09	n.d.	0.05	0.40	0.13	n.d.	0.12	0.49
trans-para-Menth-2-en-1-ol		0.08	0.10	n.d.	0.14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.05	0.05
trans-Pinocarveol		n.d.	0.35	n.d.	0.39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.11
trans-Chrysanthemol		0.77	0.17	1.62	n.d.	0.65	2.15	0.27	0.64	0.20	0.82	1.13
Lavandulol		0.14	n.d.	0.38	n.d.	0.31	0.35	0.20	0.40	n.d.	0.61	0.44
Terpinene-4-ol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.34	0.37
α -Terpineol		0.48	0.51	0.41	0.72	0.91	1.07	0.39	0.61	n.d.	1.88	1.85
methyl-trans-Chrysanthemate		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.34
Isobornyl formate		0.50	1.43	0.52	n.d.	0.32	0.16	0.38	n.d.	0.49	0.45	3.51
Bornyl acetate		1.83	3.34	1.95	1.41	n.d.	n.d.	2.48	n.d.	1.99	n.d.	1.99
Thymol		0.12	0.16	0.11	0.33	0.09	0.11	0.10	0.09	n.d.	0.08	0.33
Eugenol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.24	1.62	3.45

המשך טבלה מס' 2 א'

שם המרכיב	אוכלוסיה	מצפה נטופה	צומת צלמון	עין כמונים	נחל מירון	צומת פלך	כרמיאל	יודפת	אלון הגליל	חמת גדר	חניון נחל קדש	קיבוץ יראון
Neryl acetate		n.d.	0.16	0.18	0.18	n.d.	1.09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α -Copaene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.34	0.09	0.11
(E)-Caryophyllene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.79	0.26
(E)-9-epi-Caryophyllene		2.00	n.d.	1.58	3.76	1.35	0.48	n.d.	2.44	7.80	2.06	2.69
γ -Muurolene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.37	0.08	0.15
10,11-epoxy-Calamenene		0.35	0.48	0.51	0.48	0.14	0.30	0.31	0.46	0.72	0.14	0.18
α -Muurolene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.24	0.08	0.07
γ -Cadinene		0.60	0.47	0.46	0.32	0.25	0.83	0.55	0.47	1.72	1.07	0.51
δ -Cadinene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.10	0.06
Caryophyllene oxide		0.87	n.d.	0.71	n.d.	0.73	0.53	n.d.	1.49	1.32	0.51	0.28
Fokienol		0.89	0.54	1.80	0.54	1.56	2.04	0.84	1.68	1.95	3.14	2.68
β -Oplophenone		0.36	0.58	0.24	0.50	0.28	0.52	n.d.	n.d.	n.d.	0.08	n.d.
Muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol		0.53	n.d.	0.51	n.d.	n.d.	0.74	n.d.	n.d.	1.07	0.29	n.d.
α -Cadinol		0.78	n.d.	0.67	n.d.	n.d.	0.98	n.d.	0.83	1.24	0.61	0.56
2,4-dimethylether-Phloroacetophenone		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.46	0.26	0.19

המשך טבלה מס' 2 א'

שם המרכיב / אוכלוסיה	צומת יסעור	גן נר	אלון	כוכב השחר	צומת 505	גיתית	חמרה	רועי	רותם	כפר אדומים	מישור אדומים
Santolina triene	n.d.	0.44	0.12	0.08	0.18	0.24	0.20	0.14	0.19	1.44	0.19
α -Thujene	0.30	0.45	0.23	0.47	0.34	0.22	0.25	0.19	0.24	1.04	0.45
α -Pinene	0.37	0.74	0.35	0.65	0.56	0.66	0.73	0.53	0.46	2.84	1.07
Camphene	n.d.	0.06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sabinene	0.64	1.07	0.40	1.14	0.75	0.55	0.53	0.32	0.26	4.50	1.78
β -Pinene	0.50	0.66	0.30	0.65	0.63	0.65	0.81	0.45	0.40	2.89	1.23
5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene	1.11	1.24	3.57	0.76	1.44	0.65	0.75	1.75	1.22	0.41	0.94
α -Terpinene	n.d.	0.33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.54	0.30
para-Cymene	2.09	0.45	0.24	0.79	0.34	0.00	0.55	0.42	0.17	1.95	0.72
Limonene	n.d.	0.08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzene acetaldehyde	n.d.	0.09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.23	0.07
γ -Terpinene	0.30	0.46	0.20	0.42	0.42	0.29	0.30	0.22	0.25	1.37	0.46
cis-Sabinene hydrate	0.36	0.79	0.48	0.54	0.66	0.43	0.50	0.49	0.44	n.d.	n.d.
ortho-Guaiacol	0.17	0.16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
trans-Sabinene hydrate	0.26	0.86	0.42	0.77	0.69	0.58	0.59	0.45	0.49	1.24	0.69
Artemisia alcohol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.04
Terpinolene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.21	0.15
Linalool	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.18
cis-Sabinene hydrate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.99	0.81
Phenyl ethyl alcohol	1.24	0.10	0.18	0.17	0.07	0.05	0.20	0.08	0.04	0.09	0.11
trans-para-Menth-2-en-1-ol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.12	n.d.
cis-para-Menth-2-en-1-ol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.12	0.09
trans-Chrysanthemal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.09
trans-Pinocarveol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.43	n.d.
trans-Chrysanthemol	0.45	2.07	1.49	2.87	1.87	3.19	1.49	1.46	2.79	0.78	1.84
Pinocarvone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.11	n.d.

המשך טבלה מס' 2 א'

שם המרכיב	אנליזה	צומת יסודי	גן נר	אלון	כוכב השחר	צומת 505	גיתית	חמרה	רועי	רותם	כפר אדומים	מישור אדומים
Lavandulol		0.21	0.44	0.48	0.61	1.21	0.83	0.85	0.69	0.86	0.30	0.45
δ-Terpineol		n.d.	0.06	0.12	0.15	0.10	0.09	n.d.	n.d.	0.05	0.36	0.27
Terpinene-4-ol		n.d.	0.57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.28	0.47
para-Cymen-8-ol		n.d.	0.05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α-Terpineol		0.62	2.58	1.00	2.15	1.73	1.55	1.66	1.14	0.88	3.25	2.64
methyl-trans-Chrysanthemate		n.d.	n.d.	1.18	0.53	0.31	0.34	n.d.	n.d.	0.12	0.06	0.05
trans-Piperitol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.10	n.d.
exo-2-Hydroxycineole		n.d.	n.d.	0.23	0.24	0.29	0.37	0.37	0.31	0.25	n.d.	n.d.
Lavandulyl acetate		n.d.	2.42	1.99	2.80	1.63	2.45	1.52	2.51	3.13	1.38	1.12
Thymol		0.23	0.10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.25	n.d.
Carvacrol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.13	n.d.
Eugenol		9.61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.05	0.05
Neryl acetate		0.70	1.01	1.29	2.67	0.23	1.02	1.03	n.d.	1.08	1.76	4.43
α-Copaene		0.10	0.08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(Z)-Jasmone		n.d.	0.53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.15	0.11
Tetradecane		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.02	0.26
(E)-Caryophyllene		0.49	0.37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.26	0.22
α-Humulene		n.d.	0.05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(E)-9-epi-Caryophyllene		2.97	n.d.	n.d.	1.71	1.59	1.75	2.09	2.06	1.75	n.d.	n.d.
Aromadendrene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.30
γ-Murolene		0.11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Selinene		n.d.	n.d.	0.16	0.26	0.15	0.10	0.48	0.04	0.19	n.d.	n.d.
δ-Selinene		n.d.	n.d.	0.46	0.22	n.d.	0.21	n.d.	0.17	0.10	n.d.	n.d.
10,11-epoxy-Calamenene		0.23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.02
α-Selinene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.37	n.d.
Pentadecane		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	n.d.

המשך טבלה מס' 2 א'

שם המרכיב	אובלוסיה	צומת יסעור	גן נר	אלון	כוכב השחר	צומת 505	גיתית	חמרה	רועי	רותם	כפר אדומים	מישור אדומים
α -Muuroleone		0.15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
γ -Cadinene		2.04	0.38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.31	0.14
δ -Cadinene		0.74	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.04
7-epi- α -Selinene		n.d.	n.d.	0.60	1.35	0.07	0.44	0.32	0.02	0.85	0.27	0.20
Caryophyllene oxide		0.69	0.76	0.21	0.38	0.49	0.78	0.43	0.21	0.48	0.44	0.21
1-Hexadecene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.38	n.d.
Fokienol		2.94	3.29	1.35	2.76	1.45	0.77	1.23	1.42	1.76	4.64	2.63
Hexadecane		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.97	0.50
Tetradecanal		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.46	n.d.
Benzophenone		n.d.	0.20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol		0.35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
γ -Eudesmol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.25	0.59
α -Cadinol		0.85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.39	n.d.
2-methyl-Hexadecane		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.32	n.d.
2,4-dimethylether-Phloroacetophenone		0.19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

המשך טבלה מס' 2 א'

שם המרכיב	אנליזה	נופי פרת	עין פואר	גבעת רם	נחל זוהר	ערד	המכתש הקטן	נחל הרועה	הר רמון	הר שגיא	צומת סייירים
Santolina triene		0.16	0.21	1.27	0.46	0.82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α -Thujene		0.30	0.43	0.40	0.64	0.42	0.54	0.27	0.27	0.26	0.18
α -Pinene		0.68	0.50	0.98	0.96	0.87	10.70	0.72	13.09	7.83	6.36
Camphene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.06	5.17	n.d.	4.90	3.94	3.57
Sabinene		0.84	0.85	1.71	2.84	1.73	1.49	2.21	0.45	0.54	0.32
β -Pinene		0.62	0.56	1.13	1.31	0.89	1.43	1.15	1.34	0.99	0.69
5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene		0.70	2.58	1.35	0.26	0.70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α -Terpinene		0.22	0.37	0.13	0.26	0.20	0.15	0.11	n.d.	n.d.	n.d.
para-Cymene		0.29	0.21	0.23	0.09	0.32	0.23	0.41	0.08	0.07	0.05
ortho-Cymene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.20	0.15	0.89
Limonene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.14	0.07	0.17	0.13	n.d.
Benzene acetaldehyde		0.04	0.05	0.23	0.02	0.33	0.41	0.27	n.d.	n.d.	n.d.
(Z)- β -Ocimene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.16	n.d.	0.09	0.10	n.d.
γ -Terpinene		0.34	0.49	0.24	0.40	0.35	0.33	0.21	0.26	0.26	0.18
trans-Sabinene hydrate		0.39	0.43	0.66	0.48	0.51	0.48	0.45	0.33	0.36	0.27
Artemisia alcohol		0.04	0.06	0.08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Terpinolene		0.09	0.23	n.d.	0.10	0.08	0.09	0.06	0.14	0.13	0.13
Linalool		0.09	0.08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.09	n.d.	n.d.
cis-Sabinene hydrate		0.35	0.45	0.63	0.50	0.62	0.31	0.55	0.42	0.41	0.95
Phenyl ethyl alcohol		0.08	0.05	0.07	n.d.	0.42	0.09	0.12	n.d.	n.d.	n.d.
trans-para-Menth-2-en-1-ol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
cis-para-Menth-2-en-1-ol		0.07	0.06	n.d.	n.d.	0.02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
trans-Chrysanthemal		0.06	0.14	0.17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α -Campholenal		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.13	n.d.	0.38	0.19	0.28
trans-Pinocarveol		n.d.	n.d.	n.d.	0.06	0.09	n.d.	0.09	1.17	1.06	1.21

המשך טבלה מס' 2 א'

שם המרכיב	אובלוסיה	נופי פרת	עין פואר	גבעת רם	נחל זוהר	ערד	המכתש הקטן	נחל הרועה	הר רמון	הר שגיא	צומת סיירים
trans-Chrysanthemol		0.87	1.18	1.48	0.39	2.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pinocarvone		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.27	n.d.	0.52	0.42	0.46
Lavandulol		0.23	0.35	1.37	0.35	0.64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
δ-Terpineol		0.03	0.16	0.08	0.12	n.d.	n.d.	0.11	n.d.	n.d.	n.d.
Terpinene-4-ol		0.32	0.20	0.25	0.12	0.23	0.28	0.11	0.24	0.28	0.21
para-Cymen-8-ol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α-Terpineol		1.10	1.26	2.00	2.32	1.99	1.14	2.07	1.27	1.12	0.71
methyl-trans-Chrysanthemate		0.01	0.43	0.09	1.38	0.82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Myrtenol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.32	0.17	0.24
Verbenone		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	0.16	0.96
trans-Piperitol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
trans-Carveol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	0.03	0.07
Isobornyl formate		2.16	n.d.	0.83	0.21	0.27	n.d.	1.26	n.d.	0.13	0.19
Piperitone		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.04	0.04	0.03
γ-Terpinen-7-al		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.05	n.d.	n.d.
Nonanoic acid		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.12	0.15	0.07
Isobornyl acetate		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	0.03	n.d.
Bornyl acetate		3.09	n.d.	5.88	0.13	0.31	0.02	2.44	n.d.	0.23	0.13
Lavandulyl acetate		1.09	2.19	1.91	2.49	2.12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cogeijerene		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.06	n.d.	0.05
Thymol		n.d.	n.d.	n.d.	0.07	0.30	0.14	0.03	0.06	0.07	0.15
Carvacrol		n.d.	n.d.	n.d.	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.07	0.04
(3Z)-Hexenyl angelate		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.04	n.d.	n.d.	n.d.
Eugenol		0.03	n.d.	0.10	n.d.	0.07	0.06	0.22	0.07	0.04	n.d.
Neryl acetate		1.50	1.46	0.98	2.74	1.39	0.36	6.31	0.23	0.23	0.25

המשך טבלה מס' 2 א'

שם המרכיב / אוכלוסיה	נופי פרת	עין פואר	גבעת רם	נחל זוהר	ערד	המכתש הקטן	נחל הרועה	הר רמון	הר שגיא	צומת סירים
α -Copaene	0.05	0.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.06	n.d.	n.d.
(Z)-Jasmone	0.14	0.07	0.23	0.24	0.11	0.34	0.31	0.32	0.13	0.12
Tetradecane	0.55	0.29	0.89	1.56	0.33	1.35	0.76	0.23	0.79	0.29
(E)-Caryophyllene	0.17	n.d.	0.55	0.12	n.d.	1.24	0.15	0.40	1.20	0.24
α -Humulene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Aromadendrene	0.93	0.71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
γ -Murolene	0.06	0.06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	0.11	n.d.
β -Selinene	n.d.	n.d.	n.d.	0.48	0.06	n.d.	1.79	n.d.	n.d.	n.d.
δ -Selinene	n.d.	n.d.	n.d.	0.96	1.11	n.d.	0.81	n.d.	n.d.	n.d.
10,11-epoxy-Calamenene	0.06	0.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tetradecane	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.34	0.46	1.71
Valencene	n.d.	n.d.	n.d.	0.11	0.13	n.d.	0.08	n.d.	n.d.	n.d.
α -Selinene	n.d.	n.d.	n.d.	0.71	0.58	n.d.	0.45	n.d.	n.d.	n.d.
Pentadecane	n.d.	n.d.	n.d.	0.26	0.06	0.23	0.11	n.d.	n.d.	0.05
epi-Cubebol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.16	n.d.	n.d.
α -Murolene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	n.d.	n.d.
γ -Cadinene	0.31	0.37	n.d.	n.d.	0.44	n.d.	n.d.	0.20	n.d.	n.d.
δ -Cadinene	0.06	0.05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.18	n.d.	n.d.
7-epi- α -Selinene	0.32	0.15	n.d.	0.94	1.07	n.d.	0.56	n.d.	n.d.	n.d.
cis-Calamenene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.06	n.d.	n.d.
Raspberry Ketone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.43	0.13	n.d.
(E)-Nerolidol	n.d.	n.d.	n.d.	0.10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Palustrol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.28	n.d.	n.d.
Caryophyllene oxide	0.20	0.12	0.33	n.d.	n.d.	0.61	n.d.	0.51	0.84	n.d.
1-Hexadecene	n.d.	n.d.	n.d.	0.53	0.26	0.32	0.32	n.d.	n.d.	n.d.

המשך טבלה מס' 2 א'

שם המרכיב / אוכלוסיה	נופי פרת	עין פואר	גבעת רם	נחל זוהר	ערד	המכתש הקטן	נחל הרועה	הר רמון	הר שגיא	צומת סיירים
Fokienol	0.88	1.67	3.30	5.09	3.96	5.37	2.66	3.52	3.79	6.06
Hexadecane	1.09	0.56	1.74	3.05	0.65	2.62	1.60	0.41	1.43	0.54
Ledol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.55	n.d.	n.d.
Tetradecanal	n.d.	n.d.	n.d.	0.50	0.29	0.43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol	0.23	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
γ-Eudesmol	n.d.	0.67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α-Cadinol	0.21	0.25	n.d.	0.32	0.28	1.10	0.38	n.d.	n.d.	n.d.
2-methyl-Hexadecane	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
neo-Intermedeol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.47	1.74
2,4-dimethylether-Phloroacetophenone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.71	1.10	0.36

טבלה מס' 3 א' : תכולת מרכיבים לא מזוהים (%) בשמן אתרי של כתלה חריפה בסקר אוכלוסיות בר בישראל

אוכלוסיה שם המרכיב	מצפה נטופה	צומת צלמון	עין כמונים	נחל מירון	צומת פלך	כרמיאל	יודפת	אלון הגליל	חמת גדר	חניון נחל קדש	קיבוץ יראון	צומת יסעור	גן נר
Unknown 2	0.48	0.45	0.38	0.38	n.d.	0.27	0.44	0.39	0.36	n.d.	0.18	0.37	n.d.
Unknown 5	1.21	0.74	0.9	1.03	0.91	1.03	0.8	1.31	0.71	n.d.	n.d.	0.72	1.18
Unknown 6	0.38	0.4	0.27	0.51	n.d.	0.27	0.47	0.13	n.d.	n.d.	n.d.	0.26	n.d.
Unknown 7	0.58	0.39	0.6	0.37	0.34	0.52	0.4	0.64	n.d.	0.71	0.53	0.81	0.77
Unknown 8	2.03	0.77	1.71	1.17	1.86	1.79	2.27	2.99	1.26	1.39	1.07	n.d.	1.12
Unknown 11	n.d.	0.43	n.d.	0.44	n.d.	n.d.	0.36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 14	0.41	0.39	n.d.	0.39	n.d.	0.23	0.58	n.d.	n.d.	n.d.	0.29	0.46	n.d.
Unknown 15	1.55	0.91	1.37	0.82	2.1	2.55	1.35	1.86	n.d.	0.67	1.2	1.55	n.d.
Unknown 16	1.68	0.77	0.96	0.6	0.73	1.26	0.65	1.11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.29
Unknown 18	0.4	n.d.	0.27	n.d.	n.d.	0.1	n.d.	0.33	n.d.	0.04	0.06	n.d.	n.d.
Unknown 19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.84	1.27	0.75	n.d.
Unknown 21	1.92	0.86	1.64	0.78	1.63	2.25	1.03	1.48	n.d.	n.d.	n.d.	0.46	0.8
Unknown 24	1.75	2.25	1.78	2.36	0.13	1.91	2.69	0.14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.9
Unknown 25	0.98	n.d.	0.83	n.d.	n.d.	0.29	n.d.	1.39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 26	n.d.	0.3	0.22	0.22	n.d.	0.35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.17	0.3
Unknown 27	0.33	0.24	0.19	0.23	n.d.	0.26	0.26	n.d.	n.d.	0.07	n.d.	0.15	0.53
Unknown 31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.59	n.d.
Unknown 33	3.15	n.d.	2.37	2.02	0.64	1	1.47	3.66	n.d.	3.81	2.6	2.61	n.d.
Unknown 34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.22	1.37
Unknown 35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.39
Unknown 36	1.43	2.55	1.01	1.69	0	1.35	1.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.53
Unknown 37	0.57	0.39	0.48	0.36	0.59	0.4	0.78	0.5	0.64	0.28	0.24	0.34	n.d.
Unknown 41	0.44	n.d.	0.44	n.d.	0.4	0.45	n.d.	0.44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.47
Unknown 42	0.59	0.74	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.45
Unknown 44	0.46	0.55	0.26	0.26	n.d.	0.33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.67

המשך טבלה מס' 3 א'

אוכלוסיה שם המרכיב	מצפה נטופה	צומת צלמון	עין כמונים	נחל מירון	צומת פלך	כרמיאל	יודפת	אלון הגליל	חמת גדר	חניון נחל קדש	קיבוץ יראון	צומת יסעור	גן נר
Unknown 45	1.28	1.72	0.96	1.26	n.d.	1.32	0.92	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.62
Unknown 47	0.72	0.57	0.51	0.96	0.2	0.43	0.6	0.55	0.66	0.13	0.15	0.26	n.d.
Unknown 50	0.7	0.49	0.44	0.68	0.53	0.46	0.68	0.59	0.35	0.24	0.31	0.45	0.99
Unknown 52	0.26	0.22	0.13	0.21	0.11	0.14	0.21	0.24	0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 54	0.55	0.45	0.68	0.53	0.45	0.93	0.56	0.6	n.d.	0.36	0.24	0.83	n.d.
Unknown 56	0.47	0.41	0.44	0.43	0.23	0.43	0.43	0.38	0.65	0.13	0.17	0.28	n.d.
Unknown 57	1.23	2.62	0.42	0.6	1.95	0.57	1.04	1.09	1.03	0.91	0.2	1.35	2.56
Unknown 59	1.81	1.78	0.92	1.62	1.82	1.61	2.01	1.62	2.86	2.03	1.84	3.56	0.75
Unknown 61	2.31	1.8	2.27	2.19	1.99	1.98	3.22	2.9	2.2	1.04	1	2.1	1.44
Unknown 62	2.06	1.69	2.16	2.18	1.51	1.99	2.48	2.35	1.37	n.d.	n.d.	n.d.	1.3
Unknown 63	n.d.	1.51	n.d.	0.44	2.2	n.d.	1.28	n.d.	1.72	1	0.87	1.58	0.84
Unknown 67	3.28	0.85	2.61	1.77	3.89	1.52	1.69	1.62	4.65	1.37	1.37	1.34	1.89
Unknown 68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.86
Unknown 72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.92
Unknown 73	2.74	3.92	2.28	4.41	1.25	1.96	3.13	2.58	4.45	1.01	1.26	1.44	1.83
Unknown 74	2.85	3.58	2.45	3.38	1.39	2.59	2.49	2.8	1.26	0.39	0.68	1.08	1.31
Unknown 75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.31	1.45	1.89	1.98	2.63

המשך טבלה מס' 3 א'

אוכלוסיה שם המרכיב	אלון	כוכב השחר	צומת 505	גיתית	חמרה	רועי	רותם	כפר אדומים	מישור אדומים	נופי פרת	עין פואר	גבעת רם	נחל זוהר
Unknown 4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.25	0.24	0.19	n.d.	n.d.
Unknown 5	0.84	1	0.8	1.14	0.76	1.49	1.06	0.18	0.38	0.29	0.38	n.d.	n.d.
Unknown 6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.06	0.16	0.09	0.11	n.d.	n.d.
Unknown 7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.22	0.72	0.26	0.27	0.43	0.12
Unknown 8	1.26	0.7	1.52	1.2	1.17	2.02	1.13	0.14	0.75	0.47	0.56	1.61	n.d.
Unknown 14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.99	0.44	n.d.	1	n.d.
Unknown 15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.05
Unknown 16	0.79	0.39	0.18	0.04	n.d.	n.d.	0.01	0.28	0.46	0.2	n.d.	0.2	n.d.
Unknown 17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.23	n.d.	0.19	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 18	1.41	1.14	0.88	1.2	0.53	1.25	0.85	n.d.	0.19	0.12	0.6	n.d.	n.d.
Unknown 19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.61	0.3
Unknown 24	1.54	1.77	0.14	1.21	0.8	n.d.	1.54	1.01	0.85	1.06	2.54	0.72	1.1
Unknown 25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.14	0.11	0.41	n.d.	n.d.
Unknown 26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	0.21	0.22	0.14	0.06	0.22
Unknown 27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.13	0.14	0.14	0.27	n.d.	0.14
Unknown 30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.18
Unknown 31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.13
Unknown 33	2.43	0.61	2.23	0.76	1.04	2.54	0.25	n.d.	0.48	0.12	0.66	n.d.	n.d.
Unknown 34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.86	0.62	0.86	1.98	0.49	0.93
Unknown 35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.23	0.23	0.25	0.41	0.08	0.1
Unknown 36	2.02	3.09	0.17	1.14	1.13	0.17	1.87	2.67	3.71	1.54	1.43	0.7	1.6
Unknown 37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.4	0.46	0.11	0.14	0.35	0.78
Unknown 38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.13	0.18	0.18	n.d.	n.d.
Unknown 40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.5	0.45	0.13	0.14	n.d.	0.5

המשך טבלה מס' 3 א'

אוכלוסיה שם המרכיב	אלון	כוכב השחר	צומת 505	גיתית	חמרה	רועי	רותם	כפר אדומים	מישור אדומים	נופי פרת	עין פואר	גבעת רם	נחל זוהר
Unknown 42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.34	0.33	0.25	0.13	n.d.
Unknown 43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.32	0.59	0.31	n.d.	n.d.
Unknown 44	0.63	0.7	0.08	0.35	0.3	0	0.46	0.5	0.93	0.38	0.37	0.12	0.24
Unknown 45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.72	3.85	1.73	1.52	0.67	1.11
Unknown 47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.35	0.22	0.23	0.11	n.d.
Unknown 50	2.18	3.42	n.d.	1.37	1.45	n.d.	2.12	0.57	0.44	0.26	0.39	0.31	0.45
Unknown 52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.17	0.15	0.27	0.24	n.d.	0.08
Unknown 54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.39	0.34	0.48	0.24	n.d.
Unknown 57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.83	0.9	0.56	n.d.	n.d.
Unknown 59	0.89	0.46	0.47	0.41	0.44	0.71	0.94	0.29	0.49	0.26	0.45	0.36	0.11
Unknown 60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.29
Unknown 61	0.87	1.06	0.88	0.79	1.24	1.39	1.52	1.07	1.12	0.68	0.7	0.91	0.59
Unknown 62	0.72	1.08	0.74	0.74	1.24	1.18	1.23	0.49	0.99	0.52	0.59	0.67	0.3
Unknown 63	0.38	0.44	0.38	0.4	0.4	0.61	0.55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 67	2.53	4.34	1.03	4.32	2.25	1.72	4.24	1.43	1.33	0.63	0.64	5.03	n.d.
Unknown 68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.31
Unknown 71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.58	n.d.	0.22	n.d.	n.d.
Unknown 73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.14	0.65	1.48	1.19	n.d.	n.d.
Unknown 74	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.65	0.74	1.32	1.08	n.d.	n.d.

המשך טבלה מס' 3 א'

אוכלוסיה שם המרכיב	ערך	המכתש הקטן	נחל הרועה	הר רמון	הר שגיא	צומת סיירים
Unknown 1	n.d.	0.79	0.4	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 5	0.06	n.d.	n.d.	0.21	0.18	0.24
Unknown 6	0.13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 7	0.19	0.15	0.14	0.47	0.33	2.43
Unknown 8	0.34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 9	n.d.	0.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 10	n.d.	n.d.	n.d.	0.22	0.17	0.4
Unknown 11	n.d.	0.1	0.1	0.14	0.17	0.31
Unknown 12	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	0.13	0.29
Unknown 14	n.d.	n.d.	n.d.	0.14	0.06	0.09
Unknown 15	n.d.	0.02	0.11	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 16	0.46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 17	n.d.	0.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 19	0.17	n.d.	n.d.	0.08	0.04	0.07
Unknown 22	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	0.06	n.d.
Unknown 23	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	0.09	0.17
Unknown 24	1.07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 26	0.04	n.d.	0.89	0.07	0.06	0.04
Unknown 27	0.13	n.d.	n.d.	0.11	n.d.	0.11
Unknown 28	n.d.	n.d.	n.d.	0.11	0.16	n.d.
Unknown 30	0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 31	0.15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 32	n.d.	n.d.	n.d.	0.14	0.05	0.14
Unknown 34	0.85	n.d.	n.d.	0.06	n.d.	n.d.
Unknown 35	0.13	n.d.	n.d.	0.13	0.14	n.d.
Unknown 36	1.50	0.24	7.35	0.24	0.28	0.41
Unknown 37	0.42	0.68	0.49	0.43	0.57	1.84
Unknown 40	0.34	0.53	1.17	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 41	n.d.	n.d.	n.d.	0.82	0.42	1.25
Unknown 42	n.d.	0.29	n.d.	0.49	0.89	0.31
Unknown 44	0.24	0.44	0.99	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 45	0.62	n.d.	4.34	0.30	0.42	0.54
Unknown 46	n.d.	n.d.	1.13	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.55	0.29
Unknown 50	0.38	0.40	0.56	0.78	0.68	0.56
Unknown 52	0.09	n.d.	0.08	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 57	n.d.	n.d.	n.d.	2.67	3.98	1.11
Unknown 59	0.37	n.d.	0.29	0.20	n.d.	n.d.
Unknown 60	0.12	0.41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 61	0.57	0.83	0.62	1.31	1.80	4.43
Unknown 62	0.26	n.d.	n.d.	1.55	1.98	5.42
Unknown 63	n.d.	n.d.	n.d.	0.37	0.31	n.d.
Unknown 64	n.d.	0.35	n.d.	1.10	1.88	n.d.
Unknown 67	n.d.	1.30	n.d.	1.36	0.68	n.d.
Unknown 68	0.27	0.33	0.28	n.d.	n.d.	n.d.
Unknown 71	n.d.	1.28	n.d.	0.84	1.43	3.47

נספח מס' 2 – הרכב שמן אתרי אשר הופק בזיקוק מצמחי כתלה חריפה

טבלה מס' 4 א' : הרכב שמן אתרי (%) אשר הופק בזיקוק מצמחי כתלה חריפה הגדלים ביהודה

תכולה בשמן האתרי (%)	שם המרכיב	RT (דקות)
0.07	Santolina triene	4.76
0.09	α -Thujene	5.33
0.19	α -Pinene	5.50
0.01	Camphene	5.91
0.23	Sabinene	6.49
0.10	β -Pinene	6.61
12.48	5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene	6.98
0.29	Yomogi alcohol	7.09
0.07	α -Phellandrene	7.39
0.33	α -Terpinene	7.68
0.41	para-Cymene	7.90
0.06	Limonene	8.04
5.15	1,8-Cineole	8.12
0.69	γ -Terpinene	8.86
0.17	Unknown 2	9.16
0.05	cis-Sabinene hydrate	9.21
0.06	Artemisia alcohol	9.48
0.12	Terpinolene	9.65
0.04	para-Cymenene	9.79
0.06	Linalool	10.07
0.26	Unknown 3	10.63
0.06	cis-para-Menth-2-en-1-ol	10.80
0.09	trans-Chrysanthemal	11.20
0.07	(E)-Pinocarveol	11.28
0.09	(E)-para-Menth-2-en-1-ol	11.34
0.06	Camphor	11.46
0.48	Nerol oxide	11.60
1.82	(E)-Chrysanthemol	11.78
0.54	Lavandulol	12.01
0.10	δ -Terpineol	12.18
1.54	Borneol	12.24
0.92	Terpinen-4-ol	12.48
1.43	α -Terpineol	12.92
0.12	Methyl chavicol	13.03
0.29	methyl-trans-Chrysanthemate	13.16
0.03	(E)-Piperitol	13.31
0.09	Nerol	13.75
0.03	Isobornyl formate	13.86
0.05	Pulegone	14.20
0.07	Piperitone	14.66
12.83	Chrysanthemic acid	15.25

RT = retention time

תכולה בשמן האתרי (%)	שם המרכיב	RT (דקות)
1.38	Lavandulyl acetate	15.45
0.21	Thymol	15.69
0.71	Carvacrol	15.92
1.15	Neryl acetate	17.53
0.17	Unknown 12	17.86
0.05	α -Copaene	18.03
0.52	Unknown 14	18.23
0.05	(Z)-Jasmone	18.49
0.04	Unknown 26	18.97
0.33	(E)-Caryophyllene	19.22
0.14	Unknown 27	19.55
0.85	9-epi-(E)-Caryophyllene	20.29
0.32	Unknown 31	20.36
0.23	Unknown 32	20.66
0.05	10,11-epoxy-Calamenene	21.00
0.20	α -Muurolene	21.30
0.02	Unknown 41	21.53
0.87	γ -Cadinene	21.65
0.30	δ -Cadinene	21.80
0.12	Unknown 42	22.25
0.09	α -Calacorene	22.37
0.04	Unknown 45	22.57
0.07	Unknown 47	22.73
0.28	Unknown 50	22.88
0.38	Unknown 51	23.01
0.40	Unknown 52	23.28
0.28	Caryophyllane oxide	23.40
0.11	Unknown 57	23.63
2.80	Fokienol	23.80
0.11	b-Oplophenone	23.92
0.07	1,10-di-epi-Cubenol	24.21
1.04	Unknown 58	24.34
0.20	Unknown 61	24.52
0.64	Unknown 62	24.67
7.93	τ-Cadinol	24.87
1.02	Unknown 65	24.98
9.15	Unknown 66	25.26
20.67	Intermedeol	25.50
4.78	Unknown 70	25.70
0.37	Unknown 71	25.88
0.09	Unknown 73	26.18
0.15	Unknown 75	26.67

RT = retention time

נספח מס' 3 – הפרדת מרכיבים לא ידועים בשיטת Flash Chromatography

טבלה מס' 5 א' : התפלגות מרכיבי השמן האתרי במקטעים

שם המרכיב	מספר הפרקציה בו מצוי המרכיב	תכולה מירבית בפרקציה (%)
Santolina triene	1,2	0.79
α -Thujene	1	1.52
α -Pinene	1	4.75
Sabinene	1	1.32
β -Pinene	1	3.00
5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene	2,3	33.46
Yomogi alcohol	24,25,26	6.90
α -Phellandrene	1	1.26
α -Terpinene	1	3.59
para-Cymene	2,3,4	3.45
β -Phellandrene	1	1.89
1,8-Cineole	11,12,13,14,15	34.32
(Z)- β -Ocimene	2	0.08
γ -Terpinene	1,2	6.90
Unknown 2	25,26,27,28,29,30	4.07
Terpinolene	1,2	1.52
Unknown 3	23,24	2.45
cis-para-Menth-2-en-1-ol	25	1.51
allo-Ocimene	2	0.07
trans-Chrysanthemal	11,12,13,14	1.05
trans-Pinocarveol	23,24	0.74
trans-para-Menth-2-en-1-ol	31,32,33,34	2.67
Camphor	15	3.30
Nerol oxide	11,12,13,14	4.97
trans-Chrysanthemol	32,33,34	64.09
Lavandulol	25,26	12.50
δ -Terpineol	32	4.02
Borneol	25,26,27,28	26.93
Unknown 5	29,30,31	31.18
Terpinen-4-ol	16,17	10.40
α -Terpineol	29,30,31	25.76
Methyl chavicol	13	2.79
methyl-trans-Chrysanthemate	13	4.32
cis-Piperitol	24	1.08
Nerol	31,32	6.27

שם המרכיב	מספר הפרקציה בו מצוי המרכיב	תכולה מירבית בפרקציה (%)
Pulegone	15	2.20
Piperiton	23	0.09
Chrysanthemic acid	25	1.80
Unknown 13	11,12,13,14	4.84
Lavandulyl acetate	11,12,13,14	11.10
Unknown 15	11,12,13,14	4.07
Thymol	15,16	8.91
Carvacrol	15,16	17.13
α -Cubebene	1	0.24
α -Longipinene	1	0.07
Neryl acetate	11,12,13,14	9.84
α -Copaene	1	1.56
Unknown 26	11,12,13,14	7.07
β -Bourbonene	1	0.31
(Z)-Jasmone	30,31	2.54
Methyl eugenol	16	0.53
(E)-Caryophyllene	1,2	2.99
β -Copaene	1	0.31
trans- α -Bergamotene	1	0.07
α -Humulene	5	0.52
allo-Aromadendrene	1	11.21
Unknown 37	11,12	7.05
α -Selinene	1,2	2.12
Unknown 41	11,12,13	4.07
γ -Muurolene	1	1.29
Germacrene D	3	0.59
β -Selinene	1,2	6.83
10,11-epoxy-Calamenene	11,12,13,14	1.92
Valencene	1,2	1.22
δ -Selinene	1,2	6.54
β -Bisabolene	3	0.26
γ -Cadinene	1,2	8.96
δ -Cadinene	1,2	4.22
7-epi- α -Selinene	1	3.17
α -Cadinene	1	0.25
α -Calacorene	3	0.68
Unknown 52	15	10.99
Unknown 53	17,18	2.75

שם המרכיב	מספר הפרקציה בו מצוי המרכיב	תכולה מירבית בפרקציה (%)
Caryophyllene oxide	14,15	6.22
Fokienol	18,19,20	9.92
β -Oplophenone	11,12,13,14	3.12
Unknown 58	11,12,13,14	7.34
1,10-di-epi-Cubenol	15	6.53
Muurolo-4,10(14)-dien-1- β -ol	15	15.63
Unknown 61	34	20.92
γ -Eudesmol	24,25	4.38
τ -Cadinol	17,18	56.31
Unknown 67	28,29	17.30
α -Cadinol	30,31	4.63
Unknown 66	8,9,10	75.61
Intermedeol	21,22,23	85.24
Unknown 70	8,9,10	28.07

Abstract

Chiliadenus (syn. *Varthemia*) *iphionoides* (Boiss. et Blanche) Brullo is a member of the Composites family that grows in most parts of Israel, from mount Meiron to the Negev. It is almost endemic to Israel and native to the Mediterranean region. *C. iphionoides* is an aromatic plant whose aerial parts were used in the traditional medicine of the eastern Mediterranean region as medicinal infusion against influenza, fever, stomach ache, depression and nervousness. Furthermore, *C. iphionoides* has pharmacological potential for sugar regulation in the blood and renewal of blood vessels, and it also has antibacterial and antioxidant activities. This medical herb contains essential oils which are responsible for its unique aroma and biological activity.

So far there has been only one report describing the components of *C. iphionoides*'s essential oil in a plant sample from the Jordan Valley in Jordan, with Borneol as the main compound of this essential oil. Other major compounds were 1,8-Cineole, α -Terpinol, Camphor, Bornyl formate, Terpinen-4-ol and Bornyl acetate. A different essential oil composition was found in preliminary analyses of Judea and Samaria populations. Even though several similar compounds were found, mostly mono-terpens, these populations were rich in Intermedeol (not found in the Jordanian oil), Chrysanthemic acid and τ -Cadinol. Therefore, the primary objective of this research was to perform a survey to characterize the variation of the essential oil content and composition of 32 representative wild populations of *C. iphionoides* in Israel. In contrast to the Jordanian population, seven primary compounds were found in the essential oil of Israeli populations: Borneol, Camphor, 1,8-Cineole, τ -Cadinol, Chrysanthemic acid, Intermedeol and Unknown 29. In order to examine the variation in the essential oil composition, 10 populations were chosen for further analyses, according to geographical location, climate and topography. Altogether, 161 compounds were found in the essential oil extracts, of which 75 were minor components and not identified by the MS libraries. Considerable variation in essential oil composition was found among populations, enabling the identification of three main chemotypes: 1- "Camphorial", 2- "Intermedeolial", and 3- "Northern". The main compound of the southern populations was Camphor, therefore they belong to the "Camphorial" chemotype. Only the populations of Judea, Samaria and the northern

Negev contain Intermedeol, therefore they belong to the “Intermedeolial” chemotype. The rest of the compounds are the main compounds of the Northern populations, therefore they belong to the “Northern” chemotype. Great variance was found within populations, apparently as a result of overlapping between the different chemotypes areas of distribution.

In order to investigate whether the method used for essential oil extraction affected its composition, three extraction methods were compared: 1. Hydrodistillation in a Clevenger apparatus, 2. Methyl tert-Butyl Ether extraction, and 3. Solid Phase Micro Extraction. Significant differences were found in the composition of the essential oil extracted by each method. For hydrodistillation, large samples of 50-100 grams are needed, and chemical changes might occur during the process. For extraction smaller plant samples are required, even a single leaf or flower. The extraction method with MTBE maintained the most precise composition of the whole plant volatile content.

The annual cycle of change in the essential oil composition and in its distribution among the different parts of the plant and among leaves along a branch were studied in the Gan-Ner population. The highest content of essential oil occurs in summer and the lowest during winter, according to the plant's phenological state - a high content of essential oil before blooming is followed by a decrease at flowering time until the plant dries. The essential oil content increases with plant re-growth in the following rainy season. A similar trend manifested itself in the greenhouse, but in that case essential oil content was higher. Among the plant's organs, the leaves are richer in essential oil, followed by the buds, flowers and stems. Leaves and buds showed a different composition of essential oil compared to stems and flowers. Therefore, in order to determine a chemotype, the essential oil must be produced from a whole branch, leaves and buds. The essential oil content in the leaves decreased basipetally along the branch, apparently due to lower oil content in older leaves.

In the essential oil obtained by distillation, two major compounds were not identified by the MS libraries. Therefore they were fractionated by Flash Chromatography and identified by NMR, showing that these compounds were isomers and dimmers of 5,5-dimethyl-1-ethyl-1,3-Cyclopentadiene.

In conclusion, this work indicates that there are at least three chemotypes of *Chiliadenus iphionoides* in Israel that differ in their essential oil composition. For commercial production of essential oil, the plants must be harvested in the summer time, before flowering. The essential oil should be produced by hydrodistillation of the whole plant or its leaves.

This work has been carried out under the supervision of:

Dr. Nativ Dudai – Agricultural Research Organization, Neve Ya'ar Research Center.

Prof. Jaime Kigel – The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment,
The Hebrew University of Jerusalem.

Characterization of essential oils of *Chiliadenus iphionoides* in Israel

M.Sc. Thesis

Submitted to the Robert H. Smith Faculty of Agriculture,
Food and Environment
For the degree of Master of Science

By

Hilla Tamir

November 2009

Rehovot