



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО
ФИТОХИМИЯ



Виктория Светлинова Иванова

**ФИТОХИМИЧНО ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ВИДОВЕ ОТ
РОД *INULA*, РАСТЯЩИ В БЪЛГАРИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд за присъждане на научна и
образователна степен „Доктор“**

професионално направление 4.2. "Химически науки",
научна специалност "Биоорганична химия, химия на природните и
физиологично активните вещества"

Научен ръководител:
проф. д-р Антоанета Трендафилова
Научен консултант:
доц. д-р Милка Тодорова

София, 2022 г.

Дисертационният труд съдържа 122 страници, 36 фигури и 13 таблици. Библиографията обхваща 159 заглавия. Резултатите са публикувани в 6 научни статии.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от обединено научно звено на колоквиум „Природни и синтетични биологично активни съединения” при Институт по органична химия с център по фитохимия към Българската академия на науките (ИОХЦФ-БАН) на 12.04.2022 г. Докторантът е зачислен на самостоятелна форма на обучение по професионално направление 4.2. „Химически науки“, специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“ към ИОХЦФ-БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на2022 г. в часа в ИОХЦФ-БАН, София, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 9.

Научно жури:

1. чл. кор. проф. дн Вася Банкова
2. доц. д-р Калина Алипиева
3. проф. д-р Светлана Банчева
4. доц. д-р Милена Николова
5. доц. дф Ренета Гевренова

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИОХЦФ-БАН, София, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 9, ст. 206.

Съдържание

Списък на използваните съкращения.....	1
Въведение	2
Обекти, цели и задачи на изследванията	4
Собствени изследвания	5
1. Растителен материал.....	5
2. Разработване на растителния материал	5
3. Изолиране и идентифициране на индивидуални съединения от видове <i>Inula</i>	6
3.1. Сескитерпенови лактони и други сескитерпеноиди.....	6
3.2. Тритерпеноиди и стероли.....	15
3.3. Флавоноиди и техни гликозиди.....	16
3.4. Фенолни киселини	19
4. Сравняване на химичния състав на изследваните видове <i>Inula</i>	20
4.1. <i>Inula britannica</i>	20
4.2. <i>Inula oculus-christi</i>	21
4.3. <i>Inula aschersoniana</i> var. <i>aschersoniana</i>	21
4.4. Хемотаксономични изводи	22
5. Сравнителен качествен и количествен анализ на екстракти на <i>I. britannica</i> , събрана от различни находища в България	24
5.1. Качествен анализ на хлороформени и метанолни екстракти	25
5.2. Количествен анализ на хлороформени и метанолни екстракти	26
6. Количествено определяне на фенолни съединения в екстракти на видове <i>Inula</i> и оценка на техния антиоксидантен потенциал.....	29
7. Количествено определяне на фенолни съединения в метанолни екстракти на <i>I. britannica</i> , събрана от различни находища в България и оценка на техния антиоксидантен потенциал	31
Изводи	34
Приноси.....	36
Списък с научни публикации по темата на дисертацията	37
Списък на забелязани цитати върху публикациите, включени в дисертацията	37
Списък на участия в научни конференции	39

Списък на използваните съкращения

ВЕТХ – високоефективна течна хроматография
ВЕТСХ – високоефективна тънкослойна хроматография
ГХ/МС – газова хроматография/маспектрометрия, газ хроматографски/маспектрален
ИЧ - спектроскопия – инфрачервена спектроскопия
КХ – колонна хроматография
МС – маспектрометрия, маспектър, маспектрална
ПТСХ – препаративна тънкослойна хроматография
ТСХ – тънкослойна хроматография
ТФС – тотално фенолно съдържание
ТФЛС – тотално флавоноидо съдържание
УВ - спектроскопия – ултравиолетова спектроскопия
Хл/Ац – хлороформ/ацетон
Х/Ац – хексан/ацетон
ЯМР – ядрено магнитен резонанс
¹H ЯМР – протонен ядрено магнитен резонанс
¹³C ЯМР – въглероден ядрено магнитен резонанс
ABTS – 2,2'-азинобис-(3-етилбензотиазолин)-6-сулфонова киселина
COSY – двумерна хомоядрена корелация (Two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy)
DPPH – 2,2'-дифенил-1-1'-пикрилхидразил
HSQC – двумерна хетероядрена корелация през една връзка (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
HMBC – двумерна хетероядрена корелация през повече от една връзка (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
m/z – маса/заряд
Glc – глюкозиден
MeOH – метанол
NaOMe – натриев метилат
NaOAc – натриев ацетат
NP – Natural product reagent; реагент за природни съединения
NOE – ядрен ефект на Оверхаузер (Nuclear Overhauser Effect)
NOESY – двумерна хомоядрена корелация за измерване на ядрен ефект на Оверхаузер (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
TOCSY - двумерна хомоядрена корелация (Total correlation spectroscopy)

Въведение

Предметът на фитохимията е изследване на химичния състав на различни растителни видове както диворастващи, така и култивирани. Освен като източник на основни хранителни суровини (белтъци, въглеhidрати и мазнини), те са свързани и с изучаването и използването на техните вторични метаболити. Това са преди всичко вещества с по-силно или по-слабо изразено биологично действие върху други живи организми (например алкалоиди, сапонини, полифеноли, витамини, терпеноиди и др.) и предимно на тях се дължат лечебните свойства на много растения. Фитохимичните изследвания са поставили основите на съвременната органична химия, както и на много от насоките в теорията и практиката за получаването и използването на лекарствените вещества.

Независимо от това, че днес има натрупан и обобщен огромен фактически материал от химични изследвания на природни органични вещества, живата природа продължава да бъде неизчерпаем източник на нови и интересни обекти от животински, растителен и микробиален произход, т.е. природата е една огромна лаборатория за синтез на разнообразни химически вещества, от които все още само една малка част е добре изучена. Постоянно се появяват голям брой нови и значими научни и приложни приноси - изследват се неизследвани обекти, откриват се нови вещества и интересни химични и биологични свойства, нови източници за получаване на познати вещества с полезно приложение или нови съединения, които служат като модели за получаване по синтетичен път. Трябва да се подчертае обаче, че съвременните постижения в тази област в голяма степен са възможни благодарение на развитието и широката достъпност на съвременните методи за изолиране, пречистване и структурно-химични изследвания на органичните съединения.

Род *Inula* наброява около 100 вида, разпространени в Азия, Африка и Европа (предимно Средиземноморски регион). Някои представители на този род се използват в народната медицина, и най-вече в традиционната китайска медицина като експекторанти, противокашлично, бактерицидно, противодиабетно, противотуберкулозно и др. средства. Някои видове (*I. japonica* и *I. helenium*) са компоненти на търговски билкови продукти. Данните за етнофармакологичното и медицинско приложение на видове *Inula*, както и данните за техния химичен състав и биологична активност на екстракти и индивидуални компоненти са обобщени в няколко обзорни статии. Прави впечатление, че много малка част от видовете *Inula* (*I. helenium* L., *I. racemosa* Hook.f., *I. britannica* L., и *I. japonica*), главно с азиатски произход (в частност Китай) са били обект на детайлни фитохимични и/или биологични изследвания.

Въпреки малкия брой изследвани видове *Inula* повече от 400 вторични метаболити са изолирани досега. Сред тях поне 100 са нови природни съединения, на някои от които е установена добра биологична активност (противовъзпалителна и цитотоксична). Най-внушителен е броят на сескитерпеновите лактони (ейдесманолиди, секоейдесманолиди, гуайанолиди, псевдогуайанолиди, гермакранолиди, димерни лактони и др.) следвани от флавоноидите, фенолните съединения, стеролите и др. От разпространените в България 14 таксона (11 вида и 3 вариетета) само два от тях са частично изследвани фитохимично.

Голямото биологично разнообразие на род *Inula*, изолирането на нови природни вещества, както и намирането на нови активности определят актуалността и необходимостта от целенасочени изследвания на вторичните метаболити от този род. Още повече, предвид изменчивостта в химичния профил (наличие на хемотипове) известен за доста видове на сем. Asteraceae, както и липсата на данни за таксоните от български произход са в подкрепа на настоящите изследвания. Фитохимичните изследвания на род *Inula* трябва да се разширят и върху видове, които не са познати като лекарствени растения, тъй като биха могли да бъдат потенциални източници на ценни вторични метаболити.

Обекти, цели и задачи на изследванията

Обекти на настоящата дисертация са три вида от род *Inula*, растящи в България: *Inula britannica* L. (британски оман), *Inula oculus-christi* L. (скален оман) и суббендемичният вид *Inula aschersoniana* Janka var. *aschersoniana* (ашерсониев оман).

Целта на настоящите изследвания е фитохимично охарактеризиране на видовете, насочено към изучаване на техния терпенов (сескитерпеноиди и тритерпеноиди) и фенолен (флавоноиди и фенолни киселини) профил, както и оценка на техния антиоксидантен потенциал.

За постигането на целта на дисертацията са поставени следните задачи:

1. Получаване на различни по полярност екстракти: хлороформен и метанолен;
2. Фракциониране на получените екстракти;
3. Изолиране и идентифициране на индивидуални съединения;
4. Количествено определяне на фенолни съединения в екстракти на видове *Inula* и оценка на техния антиоксидантен потенциал;
5. Качествен и количествен анализ на сескитерпенови лактони и фенолни киселини в хлороформени и метанолни екстракти на *I. britannica*, събрана от различни находища в България и оценка на техния антиоксидантен потенциал.

Резултатите от фитохимичния профил на изследваните видове ще се използват за оценка за вътревидово разнообразие на разработваните видове, както и за намиране на междувидови родствени връзки (хемотаксономични изводи). Идентифицирането и количествено определяне на основни компоненти, както и степента на антиоксидантния капацитет ще дадат възможност за оценка на перспективността на видовете като източник на ценни вторични метаболити, а откриването на нови вещества ще обогати списъка на природните органични съединения.

Собствени изследвания

1. Растителен материал

За провеждане на настоящите изследвания са използвани материали от български популации на *I. britannica* L. (с. Кремиковци), *I. oculus-christi* L. (х. Марцеганица) и *I. aschersoniana* Janka var. *aschersoniana* (Източни Родопи), събрани във фаза на пълен цъфтеж и идентифицирани от доц. д-р Ина Анева от Института по биоразнообразие и екосистеми изследвания (ИБЕИ), БАН и проф. д-р Димитър Димитров от Национален природонаучен музей, БАН. Хербарийни образци са депозираны в ИБЕИ-БАН.



I. britannica L.



I. oculus-christi L.



I. aschersoniana Janka
var. *aschersoniana*

2. Разработване на растителния материал

Растителният материал е разработен по начин, показан на Схема 1. Смленият растителен материал се екстрахира последователно с хлороформ и метанол до получаване на съответните хлороформени и метанолни екстракти.

Метанолният екстракт се фракционира допълнително чрез КХ върху сефадекс с елуент метанол до получаване на обогатена на фенолни съединения фракция (фенолни киселини, флавоноиди и флавоноидни гликозиди). Фракционирането на последната, както и на хлороформения екстракт чрез КХ върху силикагел с подходящо избрана подвижна фаза и последващо рехроматографиране чрез КХ и/или ПТСХ на подбрани фракции води до изолиране на индивидуалните съединения.

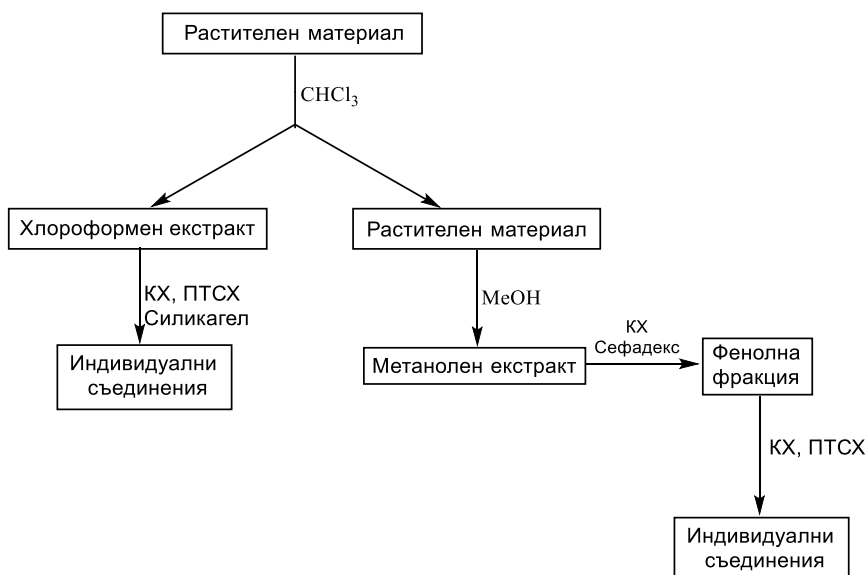


Схема 1. Схема на разработване на растителния материал

За визуализиране на ТСХ петна са използвани специфични реагенти за терпеноиди и фенолни съединения - конц. H_2SO_4 и/или анисалдеhid реагент и NP реагент (1%-ен 2-аминоетил естер на дифенилборна киселина в метанол), съответно. При напръскване на ТСХ плака с NP реагент и последващо нагряване се получават различно оцветени петна специфични за флавоноиди и фенолни киселини, които са видими под УВ светлина с дължина на вълната 365 нм.

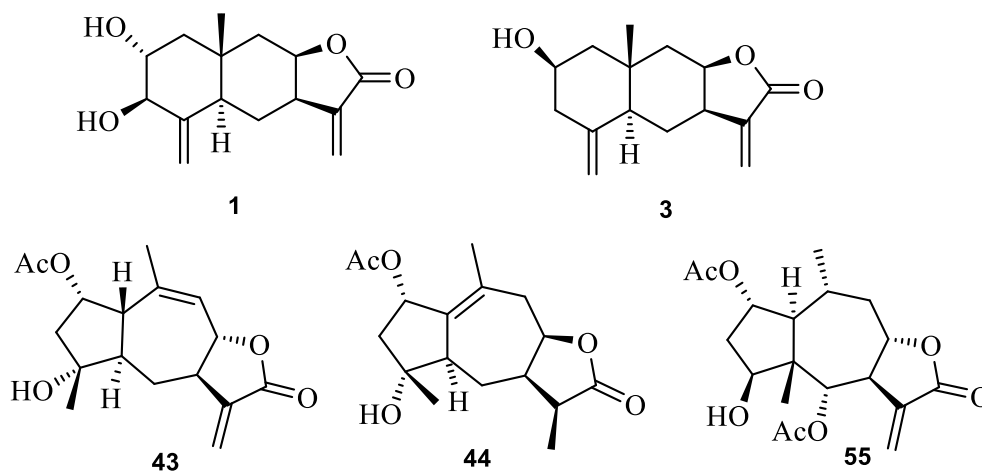
За структурното охарактеризиране на изолираните индивидуални вещества са използвани спектрални методи: ИЧ, УВ, МС и ЯМР (^1H и ^{13}C ЯМР, ^1H - ^1H COSY, НМВС, HSQC, NOESY и др.). Познатите съединения са идентифицирани чрез сравняване на спектралните им данни с тези описани в литературата и/или чрез ТСХ сравняване с автентични свидетели.

3. Изолиране и идентифициране на индивидуални съединения от видове *Inula*

3.1. Сескитерпенови лактони и други сескитерпеноиди

Хлороформеният екстракт, получен от цветове на *I. britannica* е разделен на 11 фракции чрез КХ върху силикагел и подвижна фаза Хл/Ац с нарастваща полярност. От фракциите, съдържащи сескитерпенови лактони (ИЧ контрол, абсорбционна ивица 1750-1760 cm^{-1}) чрез рехроматографиране (КХ и ПТСХ) са изолирани 5 сескитерпенови лактона, принадлежащи към 3 скелетни типа: ейдесманалодите пулшелин С (**1**) и ивалин (**3**), гуайанолидите

гайлардин (**43**) и 11,13-дихидроинучиненолид В (**44**) и псевдогуайанолида британин (**55**), представени на Фиг. 1.

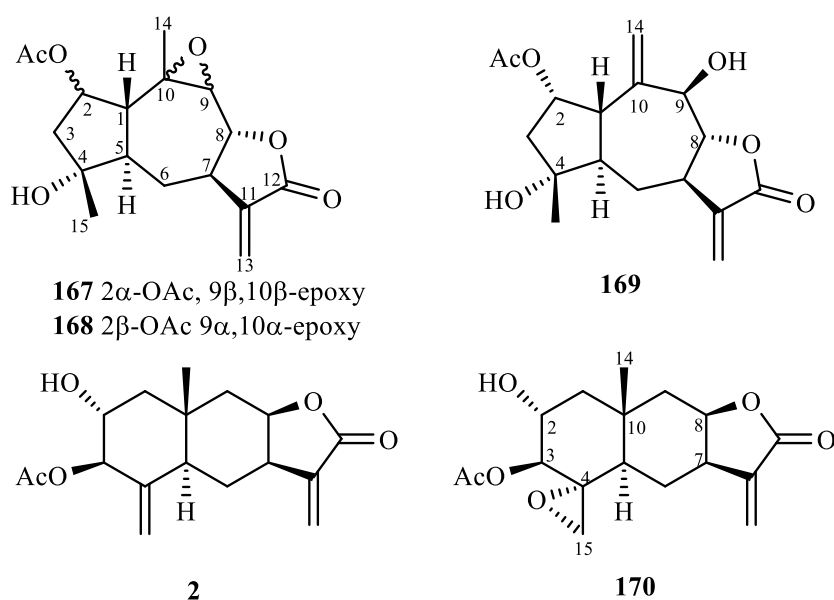


Фиг. 1. Структури на сескитерпеновите лактони **1**, **3**, **43**, **44** и **55**

Хлороформният екстракт, получен от надземни части на *I. oculus-christi* е разделен на 9 фракции чрез КХ върху силикагел и подвижна фаза Хл/Ац и от фракциите, съдържащи сескитерпенови лактони (ИЧ контрол, абсорбционна ивица 1750-1770 cm^{-1}) чрез рехроматографиране (КХ и ПТСХ) са изолирани 7 сескитерпенови лактона (Фиг. 2). Три от тях са идентифицирани като познатите пулшелин С (**1**), пулшелин Е (**2**) и гайлардин (**43**), а лактоните **167** – **170** са новооткрити природни съединения, чиято структура е определена въз основа на техните спектрални данни, описани детайлно по-долу.

9 β ,10 β -Епоксигайлардин (167): В HRESIMS спектъра на съединение **167** се наблюдава квазимолекулен йон $[M + H]^+$ при m/z 323.14872, съответстващ на съединение с молекулна формула $C_{17}H_{22}O_6$. 1H и ^{13}C ЯМР данните показват наличието на 3 метилни, 2 метиленови и 1 екзометиленова групи, 3 метинови и 3 оксометинови протона, 2 карбонилни функции, както и 2 четвъртични въглеродни атома до кислородна функция и 1 олефинов кватернерен въглерод. Спектралните данни показват, че в структурата на съединение **167** има α -метилен- γ -лактонен пръстен (δ_H 6.28 d и 5.58 d, δ_C 121.1, 137.3 (екзометиленова група), 169.0 (C=O)), ацетокси (δ_H 2.12 s (CH₃), δ_C 169.6 (C=O)) и третична хидроксилна (δ_C 76.9) групи и тризаместен епоксиден пръстен (δ_H 3.02 d, δ_C 64.8 и 58.9). Последователността на свързване на C-3-C-2-C-1-C-5-C-6-C-7-C-8 следва от COSY спектъра, в който се наблюдават следните взаимодействия: δ_H 2.03 (2H-3)/5.30 (H-2), 5.30/1.81 (H-1), 1.81/2.19 (H-5), 2.19/1.20 (H-6') и 2.45 (H-6), 1.20 и 2.45/2.85 (H-7), 2.85/4.02 (H-8), 2.85/6.28 (H-13) и 5.58 (H-13') (Таблицы 1 и 2). Единственото възможно място на третична хидроксилна група е при C-4, а за епоксидния пръстен - C-9/C-10. Всички тези данни, в допълнение с тези от

HSQC и HMBC експериментите, показват, че съединение **167** е производно на гайлардин (**43**), различаващо се в позиции С-9 и С-10, т. е. заместване на $\Delta^{9,10}$ двойната връзка с епоксидна група. Относителната стереохимия при хиралните центрове е определена с помощта на NOESY спектъра. От биогенетична гледна точка е прието, че Н-7 е α -ориентиран спрямо равнината на молекулата и следователно NOESY взаимодействията Н-7/Н-5, Н-7/Н-9, Н-14/Н-9 и Н-14/Н-5 (Фиг. 3) показват тяхната *syn*- α -ориентация, както и *cis*- β -свързването на епоксидния пръстен. *Транс*-анелирането на пет- и седемчленните пръстени в молекулата при С-1 и С-5 следва от наблюдаваното NOE между β -Н-8 (4.02 ppm) и Н-1 (1.81 ppm). От друга страна, NOE взаимодействието на Н-1 с Н-2, Н-8, Н-15 и Н-6' (1.20 ppm) показва тяхната β -ориентация.



Фиг. 2. Структури на сескитерпеновите лактони **2** и **167-170**

9 α ,10 α -Епокси-2-епи-гайлардин (168): Съединение **168** е с молекулна формула $C_{17}H_{22}O_6$, определена от HRESIMS, в който е налице квазимолекулен йон при m/z 323.14871 $[M+H]^+$. Сравняването на 1H и ^{13}C ЯМР спектри на съединение **168** с тези на лактона **167** (Таблицы 1 и 2) показва, че те са изомери, които се различават в стереохимията при С-2, С-9 и С-10. *Транс*-свързването на лактонния пръстен, т.е. β -ориентация на Н-8 следва от голямата стойност на вицинална константа $J_{7,8} = 10.7$ Hz. По-нататък, NOESY взаимодействията Н-8/Н-6' (δ_H 0.94), Н-6'/Н-1 и Н-1/Н-15 (δ_H 1.19) (Фиг. 3) определят β -ориентацията на тези протони. Прави впечатление разликата в мултиплетността на Н-9 сигнала в 1H ЯМР спектри на **167** и **168**. При съединение **167**, Н-9 се явява като дублет, а при **168** – синглет. Построяването на Драйдинг модела показва, че това е възможно, когато Н-9 е β -ориентиран, т.е. диедричният ъгъл между Н-8 и Н-9 е 90° . NOE корелациите (Фиг. 3)

между Н-9/Н-14 и Н-2/Н-14 показват α -ориентацията на епоксидната група. Моделът показва също, че взаимодействието между Н-2/Н-14 е възможно само, когато Н-2 е α -ориентиран, т.е. С-2 ацетокси групата е в β -ориентация.

Таблица 1. ^1H ЯМР данни на съединения **167-170** в CDCl_3 (J в Hz).

Н	167	168	169	170
1	1.81 (dd, 11.7, 7.6)	2.04 (dd, 12.7, 4.7)	2.61 (dd, 12.4, 6.8)	2.07 (dd, 13.2, 5.0)
1'				1.36 (dd, 13.2, 11.7)
2	5.30 (brq, 7.6)	5.26 (brt, 4.7)	5.12 (brq, 6.8)	3.90 (ddd, 11.7, 9.5, 5.0)
3	2.03 (d, 7.6)*	1.98 (d, 15.6)	2.20 (dd, 13.5, 6.8)	5.02 (d, 9.5)
3'	2.03 (d, 7.6)*	2.16 (dd, 15.6, 4.7)	2.10 (m)**	
5	2.19 (td, 11.7, 11.7, 3.0)	2.31 (td, 12.7, 12.7, 3.1)	2.10 (m)**	1.82 (dd, 12.9, 2.7)
6	2.45 (dt, 13.0, 3.0, 3.0)	2.26 (dt, 13.0, 3.1, 3.1)	2.34 (m)	1.66 (ddd, 14.0, 6.5, 2.7)
6'	1.20 (ddd, 13.0, 11.7, 10.7)	0.94 (ddd, 13.0, 12.7, 10.6)	1.33 (m)	0.98 (ddd, 14.0, 12.9, 11.8)
7	2.85 (tq, 11.7, 10.7, 3.5, 3.2, 3.0)	2.97 (tq, 10.6, 10.6, 3.3, 3.1, 3.1)	2.70 (m)	2.91 (ddd, 11.8, 6.5, 4.6)
8	4.02 (dd, 10.7, 6.0)	4.19 (d, 10.6)	4.14 (dd, 9.8, 6.8)	4.49 (brt, 4.6)
9	3.02 (d, 6.0)	3.30 (s)	4.31 (d, 6.8)	2.29 (dd, 15.4, 1.4)
9'				1.52 (dd, 15.4, 4.6)
13	6.28 (d, 3.5)	6.25 (d, 3.3)	6.28 (d, 3.5)	6.14 (s)
13'	5.58 (d, 3.2)	5.56 (d, 3.1)	5.56 (d, 3.3)	5.60 (s)
14	1.54 (s)	1.38 (s)	5.30 (s)	1.02 (s)
14'			5.35 (s)	
15	1.24 (s)	1.19 (s)	1.23 (s)	2.55 (d, 4.7)
15'				2.88 (d, 4.7)
Ac	2.12 (s)	2.15 (s)	2.06 (s)	2.10 (s)

* ABX система; **Припокриващи се сигнали

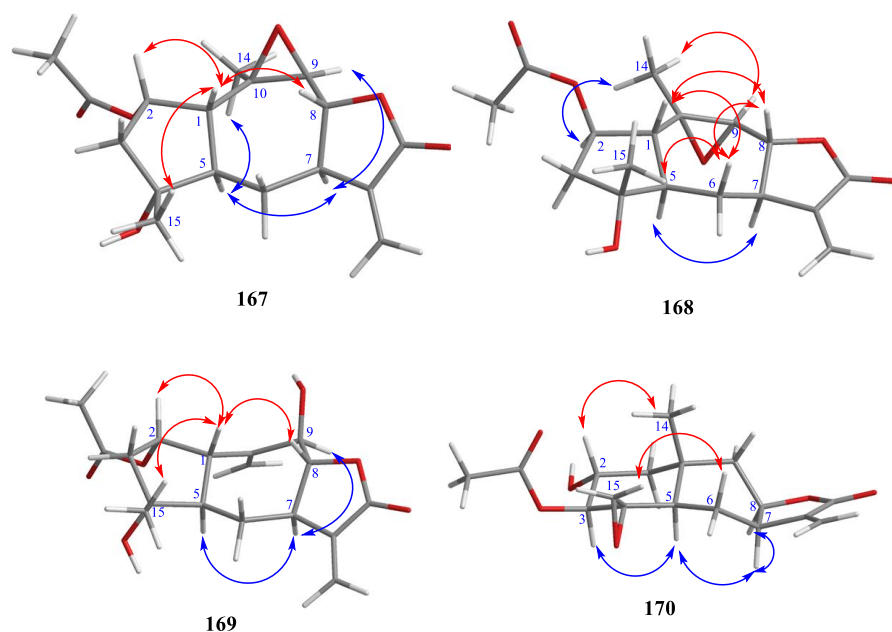
2 α -Ацетокси-4 α ,9 β -дихидрокси-1 β -гуайа-11(13),10(14)-диен-12,8 α -олид (169): В HRESIMS спектър на съединение **169** е налице квазимолекулен йонен пик $[\text{M}+\text{H}]^+$ при m/z 323.14878, съответстващ на вещество с молекулна формула $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_6$. ^1H и ^{13}C ЯМР спектралните данни (Таблицы 1 и 2) показват, че съединение **169** съдържа една ацетокси (δ_{H} 2.06 s (CH_3), δ_{C} 171.1 ($\text{C}=\text{O}$)), една вторична хидроксилна (δ_{H} 4.31 d и δ_{C} 80.0) и една третична хидроксилна (δ_{C} 77.2) групи, и α -метилен- γ -лактонен пръстен (δ_{H} 6.28 d и 5.56 d, δ_{C} 121.3 и 138.6 (екзометиленова група), 169.8 ($\text{C}=\text{O}$)). Мястото на функционалните групи и свързването С-3–С-2–С-1–С-5–С-6–С-7–С-8–С-9 е определено от COSY експеримента. Двойката синглети (δ_{H} 5.30 и 5.35) за два олефинови протона, както и съответният въглерод (δ_{C} 118.9) и сигналът за кватернерен въглерод (δ_{C} 147.5) са указание за наличие на екзометиленова група. Нейното място при С-10/С-14 следва от HMBC корелацията на Н-9

(δ_{H} 4.31 d) с тези въглеродни атоми. Относителната конфигурация на хиралните центрове на съединение **169** е определена от стойностите на константите на спин-спиново взаимодействие и от NOESY спектъра (Фиг. 3). Така, NOESY корелацията H-7/H-5 и H-7/H-9 показва тяхната *syn*- α -ориентация, а от стойността на вициналната константа $J_{7,8} = 9.8$ Hz следва, че лактонният пръстен е *транс*-свързан, т.е. β -H-8. Наблюдаваното NOE между H-8 и H-1 определя *транс*-свързването на C-1/C-5, а NOE взаимодействията H-1/H-2 и H-1/H-15 - α -ориентацията на ацетокси групата при C-2 и β -ориентацията на C-4 метилната група.

Таблица 2. ^{13}C ЯМР данни на съединения **167-170** в CDCl_3 .

C	167	168	169*	170
1	52.2	49.5	45.3	48.1
2	73.2	75.1	73.9	68.7
3	47.4	48.3	48.3	76.0
4	76.9	79.1	77.2	58.1
5	51.4	50.1	53.7	42.7
6	30.0	26.7	29.8	23.1
7	43.8	41.2	41.8	40.1
8	83.0	82.3	88.6	76.3
9	64.8	60.3	80.0	41.4
10	58.9	57.8	147.5	33.0
11	137.3	138.9	138.6	141.3
12	169.0	169.6	169.8	170.8
13	121.1	120.2	121.3	121.3
14	20.3	22.8	118.9	19.8
15	24.1	26.0	23.7	44.9
CH ₃ (Ac)	21.6	21.6	21.6	21.0
C=O (Ac)	169.6	170.9	171.1	170.2

*Данните са екстрахирани от ^{13}C ЯМР, HSQC и HMBC спектрите на смес от пулшелин С (**1**) и **169**.

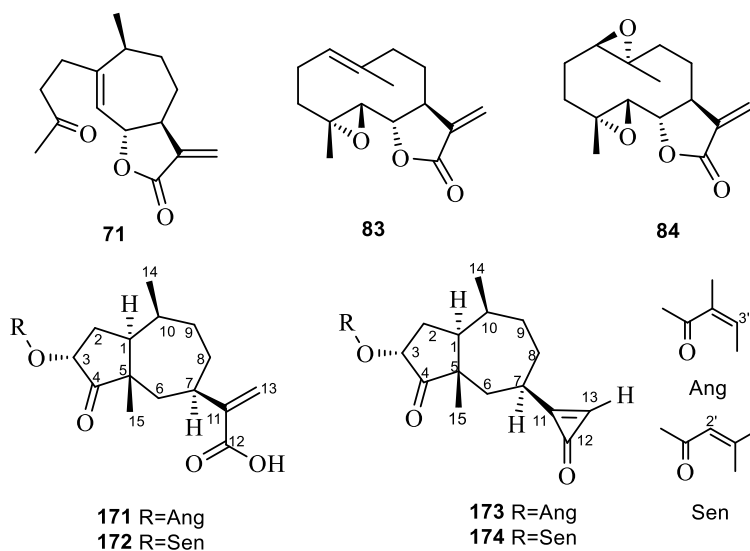


Фиг. 3. По-важни NOE взаимодействия в съединения **167-170**

4 α ,15 α -Епоксипулшелин Е (170): Съединение **170** е сескитерпенов лактон с молекулна формула C₁₇H₂₃O₆, определена от HRESIMS, в който е налице квазимолекулен йонен пик при m/z 323.14864 [M+H]⁺. ¹H и ¹³C ЯМР спектралните данни (Таблицы 1 и 2) са сходни с тези на пулшелин Е (**2**). Липсват обаче сигналите за C-4/C-15 екзометиленовата група. Вместо това са налице два дублета при δ_H 2.55 и 2.88 за метиленова група с геминална константа на спин-спиново взаимодействие $J_{gem} = 4.7$ Hz, въглероден сигнал при δ_C 44.9 и сигнал за кватернерен въглерод при δ_C 58.1. Тези данни потвърждават наличието на спироцикличен епоксиден пръстен при C-4. Мястото на функционалните групи в ейдесмановата структура е определено чрез COSY и HSQC експерименти, а относителната стереохимия – от стойностите на константите на спин-спиново взаимодействие и NOESY спектъра (Фиг. 3). Изхождайки от биогенетично приетата α -позиция на H-7, то наблюдаваните NOE взаимодействия между H-3/H-5, H-5/H-7 и H-7/H-8 показват тяхната α -ориентация, а това между H-2/H-14 - β -ориентацията на CH₃ групата при C-10. Константата на спин-спиново взаимодействие $J_{2,3} = 9.5$ Hz е в съответствие с *транс*-диаксиалното разположение на H-2 и H-3. H-6' (δ 0.98) е определен като β -ориентиран въз основа на големите вицинални константи на спин-спиново взаимодействие $J_{5,6} = 12.9$ Hz и $J_{6,7} = 11.8$ Hz, а NOE корелацията между H-6' и H-15 показва β -ориентацията на тези протони, съответно α -положение на епоксидния пръстен.

От хлороформения екстракт, получен при екстракция на надземните части на *Inula aschersoniana* Janka var. *aschersoniana* са изолирани и идентифицирани познатите

сескитерпенови лактони инусониOLID (71), партеноOLID (83) и диепоксикостуноOLID (84), както и четири нови съединения с псевдогуайанов скелет 171-174 (Фиг. 4).



Фиг.4. Структури на съединения 71, 83, 84 и 171-174

ТСХ на фракция F₅, получена при хроматографското разделяне на екстракта чрез КХ, показва две основни петна **A** и **B**, които бяха разделени чрез ПТСХ (X/Ац, 2:1). HRESIMS на **A** съдържа квазимолекулен йон при m/z 349.20085 [M+H]⁺, съответстващ на молекулна формула C₂₀H₂₈O₅. В ¹H и ¹³C ЯМР спектрите (Таблица 3) са налице сигнали, характерни за ангелоилокси и сенециоилокси естерни групи. Останалите сигнали са дублирани. Налице са сигнали за една вторична (δ_H 1.05/1.06, d, 7.3 Hz) и една третична (δ_H 1.13/1.15 s) метилни групи, екзометиленови протони (δ_H 5.65, 6.24/5.65, 6.25) и протон геминален на естерна група (δ_H 5.35/5.40, dd, 9.0 и 1.5 Hz), всички в съотношение 1:1.5. Очевидно изследваната проба **A** е неразделима смес от два естера (**171** и **172**) на един сескитерпеноид (Фиг. 4). В COSY спектъра се наблюдават следните корелации H-3/H-2/H-1/H-10/H-9/H-8/H-7/H-6 и H-10/H-14. Свързването на въглеродните атоми C-3 до C-6 през кватернерените C-4 и C-5 е установено чрез HMBC експеримент, в чийто спектър се виждат кръстосани пикове на H-3, H-2' и H-15 с C-4 (δ_C 214.72/214.25) и H-1, H-2', H-10 и H-15 с C-5 (δ_C 51.15). Присъствието на COOH група при C-12 следва от липсата на сигнали за съответните протони и корелацията на H-13 и H-13' с C-12 (δ_C 171.14). TOCSY спектърът потвърди последователността на свързване в молекулата и определи псевдогуайановия скелет на съединения **171** и **172** с естерна група при C-3, C-4 карбонилна и C-12 карбоксилна групи. Литературната справка показва, че изолираните съединения са 3-ацилокси производни на дамсинова киселина. Конфигурацията на асиметричните центрове в съединения **171** и **172** е определена с помощта на NOESY експеримента. Изхождайки от биогенетично приетата α -

позиция на Н-7, то наблюдаваните NOE взаимодействия между Н-7/Н-1, Н-1/Н-10, Н-15/Н-3 и Н-15/Н-14 показват β -положението на С-10 и С-5 метилните групи, α -ориентация на С-3 естерния остатък и *транс* - свързване на 5- и 7-члените пръстени в псевдогуайановата структура. Новоизолираните съединения са идентифицирани като 3 α -ангелоилокси (**171**) и 3 α -сенециоилокси (**172**) дамсинови киселини.

Таблица 3. ЯМР спектрални данни на **A** (**171** и **172**) в CDCl₃

	δ_{H} (m, J Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	HMBC (C→H)	NOESY
1	2.54 ddd (5.4, 7.0, 13.5)	43.09/43.12	2, 3, 5, 9, 10, 14, 15	2', 7, 10
2	2.44 ddd (9.0, 13.5, 13.5)	29.73/29.86	1, 3	3, 15
2'	1.72 ddd (1.5, 7.0, 13.5)			1
3	5.35/5.40 dd (1.5, 9.0)	70.87/71.47	2'	15
4	-	214.72/214.25	3, 2', 15	
5	-	51.15	1, 2', 10, 15	
6	2.34/2.35 dd (3.1, 14.4)	37.32/37.40	1, 15	7
6'	1.68 m*			15
7	2.75 m	36.32/36.29	6, 13, 13',	1, 6, 8
8	1.88 m*	31.16/31.07	6, 10	
8'	1.60 m			
9	1.70 m* (2H)	33.86	8', 10, 14,	
10	2.05 m	34.64/34.61	1, 2, 8, 14	1
11	-	146.02	6, 8', 13	
12	-	171.14	13, 13'	
13	6.24/6.25 s	124.84		
13'	5.65 s			
14	1.05/1.06 d (7.3)	16.89		15
15	1.13/1.15 s	21.61/21.68		2, 3, 14
ангелоил				
1''	-	167.27	3, 5''	
2''	-	127.33		
3''	6.10 qq (7.3, 1.2)	138.95	4'', 5''	
4''	1.97 dq (7.3, 1.2)	15.93		
5''	1.90 dq (1.2, 1.2)*	20.58		
сенециоил				
1'''	-	165.73	3, 4'''	
2'''	5.73 brs	115.32	4''', 5'''	
3'''	-	158.47		
4'''	2.17 d (1.2)	20.42		
5'''	1.90 d (1.2)*	27.51		

[#]Определен чрез HSQC и HMBC; *Припокриващи се сигнали

В HRESIMS на ТСХ петно **B** се наблюдава квазимолекулен пик при m/z 331.19050 [M+H]⁺, съответстващ на молекулна формула C₂₀H₂₆O₄. ¹H и ¹³C ЯМР данните (Таблица 4) на **B** показват, че **B** също е смес от две съединения (**173** и **174**) (Фиг. 4), както и сходство със

спектралните данни на **A (171 и 172)**. Основната разлика между **A (171 и 172)** и **B (173 и 174)** в техните ЯМР спектри се отнася до страничната верига при C-7. Вместо сигнали за геминални винилови протони H-13 и H-13' се появява сигнал за олефинов протон като дублет при δ 8.45/8.46, с $J = 0.9$ Hz. ИЧ абсорбцията при 1830 и 1580 cm^{-1} , наличието на карбонилна функция (δ_{C} 173.80) и нейния β -ефект върху химичното отместване на олефиновия протон потвърждават присъствието на циклопропенонов пръстен. Относителната стереохимия на съединения **173** и **174** е определена от наблюдаваните корелации в NOESY спектъра. Тези нови съединения са наречени ашерсониянон **A (173)** и ашерсониянон **B (174)**.

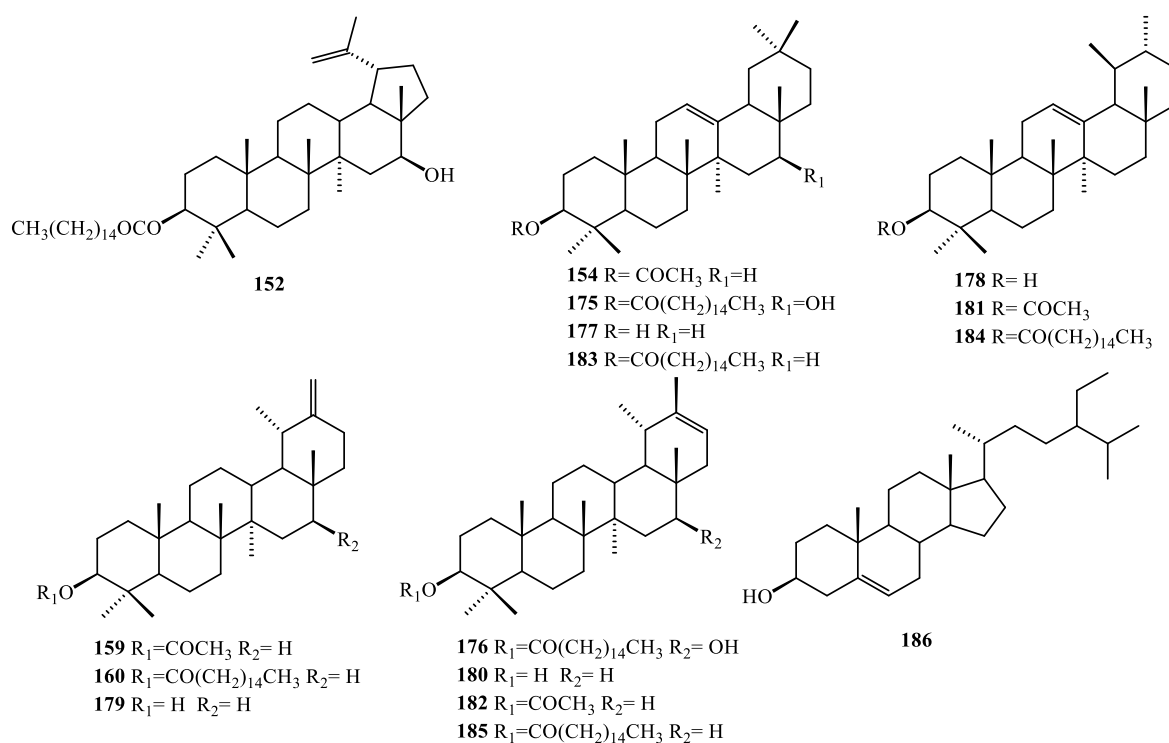
Таблица 4. ЯМР спектрални данни на **B (173 и 174)** в CDCl_3

	δ_{H} (m., J Hz)	δ_{C}	HMBC (C→H)	NOESY
1	2.51 m	44.70/44.74	2', 6', 9, 9', 14, 15	2', 7, 10
2	2.34 m*	30.15/30.12	1	
2'	1.82/1.86 ddd (1.4, 6.9, 14.6)			1
3	5.21/5.25 dd (1.4, 9.0)	71.83, 71.24	2'	2, 15
4	-	215.81/215.41	2, 2', 3, 6, 15	
5	-	52.04/52.08	1, 2, 2', 6, 6', 7, 15	
6	2.32 m*	38.46/38.62	1, 7, 8, 8', 9, 10, 15	
6'	1.96 m*			
7	3.21 m	36.78/36.86	6, 6', 8, 8', 9', 13	1
8	2.11 m*	26.89	6, 6', 7, 9, 9'	
8'	1.96 m*			
9	1.96 m*	32.23/32.20	7, 14	
9'	1.59 m			13, 14, 15
10	2.13 m*	32.96/32.91	1, 2, 6, 8, 9', 14	
11	-	157.53	7	
12	-	173.80	7, 13	
13	8.45/8.46 d (0.9)	147.57/147.62	7	9', 14, 15
14	0.99/1.00 d (7.3)	17.24/17.26	1, 9	9', 13
15	1.04/1.05 s	19.02	1, 6, 6'	3, 9', 13
ангелоил				
1''	-	166.81	3	
2''	-	127.10		
3''	6.12 qq (7.3, 1.2)	139.36		
4''	1.97 dq (7.3, 1.2)	15.96		
5''	1.90 dq (1.2, 1.2)*	20.57		
сенециоил				
1'''	-	165.34	3	
2'''	5.68 brs	115.04		
3'''	-	158.90		
4'''	2.17 d (1.2)	27.54		
5'''	1.90 d (1.2)*	20.43		

#Определен чрез HSQC и HMBC; *Припокриващи се сигнали

3.2. Тритерпеноиди и стероли

Установено е, че неполярните фракции, получени при хроматографското разделяне на хлороформения екстракт от *I. britannica* и *I. oculus-christi* не съдържат сескитерпенови лактони, но в техните ИЧ спектри е налице абсорбционна ивица при $1720-1730\text{ cm}^{-1}$, което е указание за наличие на естерна група. Чрез ПТСХ са изолирани познатите тритерпеноиди 16 β -хидрокси-лупеол-3-О-палмитат (**152**), 16 β -хидрокси- β -амирин-3-О-палмитат (маниладиол 3 β -палмитат) (**175**) и фарадиол 3 β -О-палмитат (**176**), а ТСХ сравняване с автентични свидетели показва присъствието на β -амирин (**177**) и β -ситостерол (**186**) (Фиг. 5).



Фиг. 5. Тритерпеноиди във видове *Inula*

За доказване на структурата на тритерпеновите естери **152**, **175** и **176** е осъществена хидролиза в алкална среда. Водният слой, съдържащ мастни киселини е подложен на естерификация с метанол и анализиран чрез ГХ-МС. В хроматограмата се наблюдава един пик, на който съответства мас-спектър с молекулен йон при m/z 270 $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$) и фрагменти при m/z 239 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}]^+$, 227, 143, 87 и 74, идентичен с този на метил палмитат (NIST14). ГХ-МС на хексаново-етилетерния слой, съдържащ тритерпенови алкохоли потвърди присъствието на 16 β -хидроксилупеол, маниладиол и фарадиол (Таблица 5) чрез сравняване на техните мас-спектри с литературни данни.

Таблица 5. Мас-спектрални данни на тритерпеноиди във видове *Inula*

Тритерпеноиди	Мас-спектрални данни, m/z (%)
β -Амирин (177)	426 (M^+ , 5), 218 (100), 203 (58), 189 (25)
α -Амирин (178)	426 (M^+ , 4), 218 (100), 203 (26), 189 (25)
Тараксастерол (179)	426 (M^+ , 32), 218 (20), 207 (80), 203 (16), 189 (100)
ψ -Тараксастерол (180)	426 (M^+ , 23), 357 (13), 315 (8), 218 (16) 207 (85), 203 (24), 189 (100)
β -Амирин ацетат (154)	468 (M^+ , 13), 453 (62), 408 (8), 393 (60), 218 (100), 203 (53), 189 (28)
α -Амирин ацетат (181)	468 (M^+ , 5), 408 (2), 218 (100), 203 (212), 189 (26)
Тараксастерил ацетат (159)	468 (M^+ , 15), 408 (10), 204 (17), 189 (100)
ψ -Тараксастерил ацетат (182)	468 (M^+ , 16), 408 (10), 249 (15), 204 (25), 189 (100)
Маниладиол*	442 (M^+ , 20), 424 (3), 234 (100), 216 (40), 207 (50), 203 (73), 190 (29)
1 β -Хидроксилупеол *	442 (M^+ , 5), 424 (3), 234 (100), 216 (28), 207 (25), 201 (28), 190 (22)
Фарадиол*	442 (M^+ , 5), 424 (11), 409 (4), 360 (13), 207 (46), 189 (48), 108 (100)

* След хидролиза на **152**, **175** и **176**

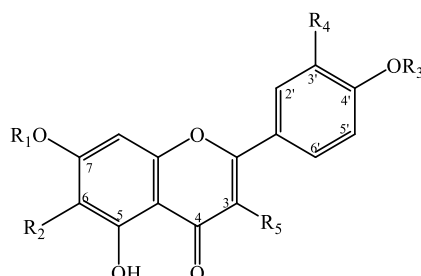
При хроматографското разделяне на хлороформения екстракт, получен от надземни части на *Inula aschersoniana* Janka var. *aschersoniana* са получени фракции, съдържащи свободни тритерпенови алкохоли, техни ацетати и дълговерижни естери (ТСХ контрол). Последните са подложени на хидролиза в алкална среда и последващо метилиране на отделените киселини. ГХ-МС на получените алкохоли и метиловите естери, както и на фракциите, съдържащи свободни алкохоли и техни ацетати, позволи идентифицирането на 13 тритерпеноида от β - и α -амиринов, тараксастеролов и ψ -тараксастеролов тип (**154**, **159**, **160**, **175**, **177-185**) (Фиг. 5) въз основа на тяхната характерна мас-спектрална фрагментация (Таблица 5). Така например, мас-спектрите на β - и α -амирин (**177** и **178**) се характеризират с базов пик при m/z 218 и пикове при m/z 189 и 203 с различна интензивност: пикът при m/z 203 е два пъти по-интензивен от този при m/z 189 при β -амирин (**177**), докато при α -амирин (**178**) двата пика са с почти еднакъв интензитет. В мас-спектрите на тараксастерол (**179**) и ψ -тараксастерол (**180**) се наблюдават много интензивни йони при m/z 207 (80 и 85 %, съответно) и m/z 189 (100%). Интензитетът на йоните при m/z 218 и m/z 203 е значително по-нисък в сравнение с тези на β - и α -амирин. В спектрите на ацетатите **154**, **159**, **181** и **182** е налице молекулен йон при m/z 468, пик при m/z 408, съответстващ на елиминиране на оцетна киселина $[M-60]^+$ и характеристичните йони за съответните тритерпенови скелетни типове.

3.3. Флавоноиди и техни гликозиди

ТСХ на метанолните екстракти от *I. britannica*, *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* var. *aschersoniana* показва наличие на флавоноиди при проявяване на хроматограмата с NP специфичен реагент и УВ визуализиране при 365 nm. При тези условия флавоноидите флуоресцират в различни нюанси на жълто и оранжево.

След хроматографско разделяне на метанолния екстракт на *I. britannica* и допълнително пречистване от фракциите, съдържащи флавоноиди са изолирани 3 вещества.

Те са идентифицирани като лутеолин (**99**), кверцетин (**113**) и лутеолин-7-О-глюкозид (**187**) (Фиг. 6) въз основа на техните спектрални отнасяния (УВ в метанол и в присъствие на отместващи реагенти и ЯМР), както и чрез ТСХ сравняване с автентични свидетели в няколко различни системи.



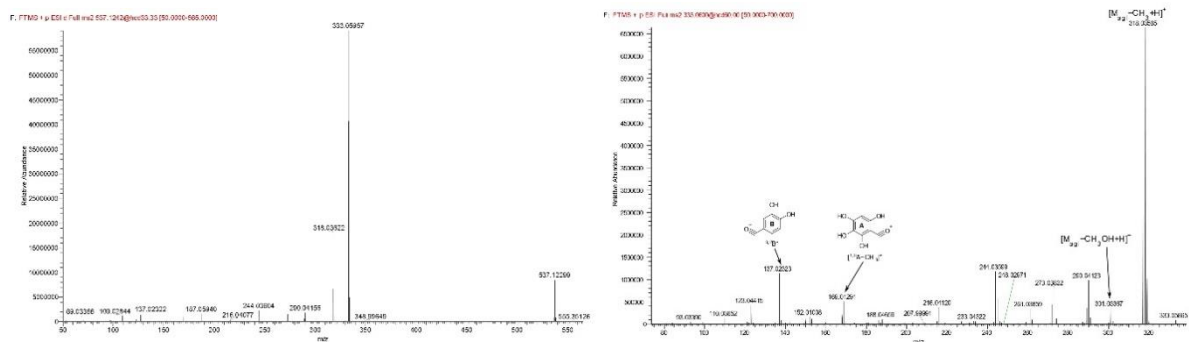
	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅
99	H	H	H	OH	H
100	H	OCH ₃	H	OH	H
102	Glc	OCH ₃	H	OH	H
104	H	H	CH ₃	OH	H
105	H	OCH ₃	H	H	H
111	H	H	H	H	H
113	H	H	H	OH	OH
128	Glc	OCH ₃	H	OH	OH
187	Glc	H	H	OH	H
188	H	OH	CH ₃	H	H
189	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H
190	Glc	OCH ₃	H	H	H
191	CH ₃	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
192	6''-OAc-Glc	OCH ₃	H	OH	OH

Фиг. 6. Флавоноиди във видове *Inula*

При разработване на метанолния екстракт от *I. oculus-christi* са изолирани 8 индивидуални съединения, идентифицирани като познатите лутеолин (**99**), непетин (**100**), непитрин (**102**), хиспидулин (**105**), апигенин (**111**), лутеолин-7-О-глюкозид (**187**), скутелареин-4'-метилов етер (**188**), яцеозидин (**189**) и хиспидулин-7-О-глюкозид (**190**).

От най-полярната фракция, получена при хроматографско разделяне на хлороформения екстракт от *I. aschersoniana* var. *aschersoniana* е изолиран познатият флавоноид хризоспленол С (**191**), а от метанолния екстракт още 9 флавоноида. Осем от тях са идентифицирани като познатите лутеолин (**99**), непетин (**100**), непитрин (**102**), хризоеириол (**104**), хиспидулин (**105**), апигенин (**111**), патулитрин (**128**) и лутеолин-7-О-глюкозид (**187**) (Фиг. 6).

Патулетин-7-О-(6''-О-ацетил)-β-D-глюкопиранозид (192): УВ спектърът на **192** в МеОН съдържа характерни за флавоноли абсорбционни ивици при 259.0 (зона II) и 370.0 (зона I) nm. Батохромното отместване на последната с 71 nm при добавяне на AlCl₃, с 59 nm при добавяне на AlCl₃/HCl и с 25 nm в присъствие NaOAc/H₃BO₃ е указание, че **192** е флавонол с ОН група при С-5 и орто-дихидрокси система в пръстен В.



Фиг. 7. Мас-спектрални характеристики на съединение **192**

HRESIMS спектрите на **192** в отрицателен и положителен режим показват депротониран $[M-H]^-$ и протониран $[M+H]^+$ молекулен пик, съответно при m/z 535.10961 и 537.12321, съответстващи на съединение с молекулна формула C₂₄H₂₄O₁₄. Базовият пик при m/z 333.0597 $[M_{agl}+H]^+$ в MS/MS спектъра (Фиг. 7), получен при елиминиране на 204 Da, показва присъствие на хексоза (162 Da) и ацетилна група (42 Da) свързани към флавоноиден агликон с молекулна формула C₁₆H₁₂O₈. Псевдо-MS³ спектърът (Фиг. 7) на перкурсорния йон, дължащ се на агликоновата част на **192** съдържа фрагментни йони при m/z 318.0357 и 301.0337 вследствие на загуба на 15 Da (CH₃) и 32 Da (CH₃OH), които са характерни за метоксифлаволи. Освен тях се наблюдават и $[A-CH_3]^+$ и B⁺ фрагментни йони, съответно при m/z 169.0129 и 137.0232, които определят **192** условно като патулетиново производно.

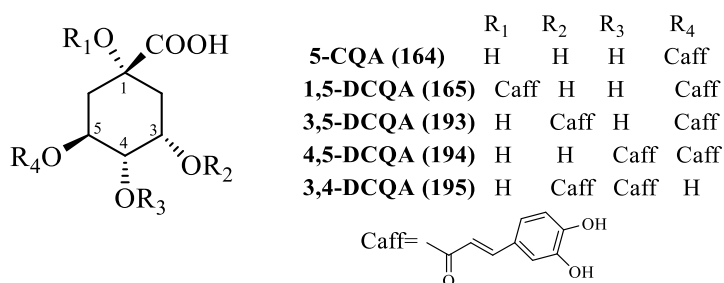
¹H ЯМР спектралните данни (Таблица 6) на **192** са много близки да тези на познатия патулитрин (**128**), а именно сигнали, характерни за агликоновата и β-D-глюкопиранозната части. Наблюдава се обаче допълнителен сигнал при δ 2.01, характерен за ацетилна група. Нейното място при С-6'' е определено въз основа на наблюдаваните парамагнитни отмествания на Н-6a'' и Н-6b'' (δ_H 4.47 и 4.21, съответно) от глюкозидната част. HMBC взаимодействията Н-1'' (δ_H 5.08)/С-7 (δ_C 155.7), ОСН₃ (δ_H 3.89)/С-6 (δ_C 131.8) и Н-6'' (δ_H 4.21)/СОСН₃ (δ_C 171.9) определят мястото на глюкозидната част при С-7, на метоксилната група при С-6 и на ацетилната група при С-6'', а NOE взаимодействието между Н-1'' и Н-8 (δ_H 6.84) потвърждава мястото на глюкопиранозната част при С-7. Следователно, съединение **192** е патулетин-7-О-(6''-ацетил) глюकोпиранозид и е ново природно съединение.

Таблица 6. ^1H и ^{13}C ЯМР данни на **192** в CD_3OD

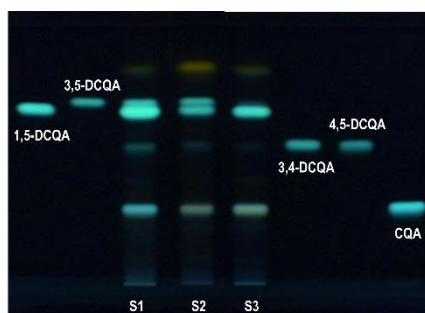
Място	δ_{H}	δ_{C}	Място	δ_{H}	δ_{C}
2	-	145.0	1'	-	122.2
3	-	137.2	2'	7.76 d (2.0)	114.8
4	-	176.9	3'	-	144.6
5	-	153.3	4'	-	147.8
6	-	131.8	5'	6.88 d (8.2)	116.5
7	-	155.7	6'	7.66 dd (2.0, 8.2)	121.8
8	6.84 s	95.6	1''	5.08 d (7.5)	102.1
9		151.8	2''	3.55 t (7.5)	74.9
10		105.4	3''	3.51 t (7.5)	78.2
OCH_3	3.89 s	61.8	4''	3.38 t (7.5)	71.8
$\underline{\text{COCH}}_3$	-	171.9	5''	3.78 td (7.5, 2.0)	75.9
COCH_3	2.01 s	21.1	6''	a) 4.47 dd (2.0, 12.0) b) 4.21 dd (7.5, 12.0)	65.1

3.4. Фенолни киселини

От метанолните екстракти на *I. oculus-christi* и *I. britannica* са изолирани 3 съединения със сходни ЯМР данни и УВ отнасяния (флуоресциращи в синьо при 365 нм) и идентифицирани като хлорогенова киселина (**164**), 1,5- и 3,5-дикафеоилхинови киселини (**165** и **193**) (Фиг. 8).



Фиг. 8. Структура на фенолните киселини **164**, **165** и **193-195**



Фиг. 9. ВЕТСХ (Толуен/ EtOAc / HCOOH / H_2O , 5:25:100:10:10) сравняване на метанолни екстракти на видове *Inula*

ТСХ на метанолните екстракти от *I. aschersoniana* var. *aschersoniana* (S1), *I. oculus-christi* (S2) и *I. britannica* (S3) (Фиг. 9) в присъствие на автентични стандарти: хлорогенова киселина (164), 1,5-, 3,5-, 4,5- и 3,4-дикафеоилхинови киселини (165, 193-195) потвърди присъствието на описаните по-горе съединения, както и на другите два позиционни изомера 194 и 195. ТСХ петна, съответстващи на петте киселини флуоресцират в синьо преди и след проявяване на хроматограмата с NP реагент и визуализиране при 365 nm.

4. Сравняване на химичния състав на изследваните видове *Inula*

4.1. *Inula britannica*

При фитохимичното изследване на *Inula britannica* са изолирани 5 сескитерпенови лактона, принадлежащи към 3 скелетни типа: псевдогуайанов (британин, 55), гуайанов (гайлардин и 11,13-дихидроинуинолид В, 43 и 44) и ейдесманов (пулшелин С и ивалин, 1 и 3).

С изключение на ивалин (3), останалите съединения са докладвани като компоненти на вида от находище в Сърбия. Направеният литературен преглед за съдържание на сескитерпенови лактони в *I. britannica* показва, че видът е богат на този клас съединения като се наблюдават съществени различия в зависимост от произхода на изследваните таксони – азиатски или европейски. Прави впечатление, че *I. britannica* от азиатски произход продуцира лактони със секоейдесманов и секогуайанов скелет. Такива скелетни типове не са открити в изследваната българска проба, както и в тази от руски произход. От друга страна, в проба от сръбско находище са изолирани 3 секоейдесманолида и един секогуайанолид, но бицикличните лактони са преобладаващи. На базата на получените досега резултати, може да се обобщи, че азиатските произходи на *I. britannica* се характеризират с преобладаващо съдържание на секогуайанолиди и секоейдесманолиди, докато в европейските доминират бицикличните скелетни типове лактони. Необходими са изследвания и на други европейски популации на вида, за да се потвърди или отхвърли тази хипотеза.

Наред със сескитерпеновите лактони от изследваната проба на *I. britannica* са изолирани и 3 тритерпеноида – палмитинови естери на 16 β -хидроксилупеол (152), 16 β -хидрокси- β -амирин (175) и фарадиол (176). Досега само 16 β -хидроксилупеол-3-О-палмитат (152) е откриван в *I. britannica* от турски произход, докато другите две съединения се изолират за първи път от този вид, но са намирани по-рано във видове от сем. Asteraceae - *Achillea alexandriregis* и *Calendula officinalis* и др. В изследвания вид е установено

присъствието и на β -ситостерол (**186**) и β -амирин (**177**), вещества срещани в почти всички видове от сем. Asteraceae.

Намерените в метанолния екстракт лутеолин (**99**) и кверцетин (**113**) са съобщавани като компоненти в *I. britannica*, докато лутеолин-7-О-глюкозид (**187**) и 1,5-дикафеоилхиновата киселина (**165**) се откриват за първи път в изследвания вид.

4.2. *Inula oculus-christi*

При фитохимичното изследване на хлороформния екстракт на *I. oculus-christi* са изолирани 7 сескитерпенови лактона с гуайанов (**43, 167-169**) и ейдесманов (**1, 2** и **170**) въглероден скелет. Литературната справка показва, че гуайанолидите доминират в екстрактите от *I. oculus-christi*, а гайлардин (**43**) е основен компонент, намерен в популации с различен географски произход. Пулшелин С (**1**) е установен в проба с произход Иран, а пулшелин Е (**2**) - в проба от Черна Гора. Лактоните **167-170** са нови природни съединения, които са биогенетично свързани и могат да се разглеждат като производни на гайлардин (**43**) и пулшелин Е (**2**). Тритерпеноидите 16 β -хидрокси-лупеол-3-О-палмитат (**152**), маниладиол-3 β -палмитат (**175**) и фарадиол палмитат (**176**) и β -ситостерол (**186**) се намират за първи път в изследвания вид. Тези данни, както и идентифицираните 4 нови природни съединения обогатяват познанията за терпеновия профил на *I. oculus-christi* и биха били от значение за хемосистематиката на рода.

Всички флавоноиди (**99, 100, 102, 105, 111, 188-190**), изолирани от метанолния екстракт на *I. oculus-christi* са флаволи, различаващи се по броя и вида на заместителите (H, OH или OMe) в пръстен В, както и при С-6 в пръстен А. С изключение на хиспидулин (**105**), всички изолирани флавоноиди се откриват за първи път в *I. oculus-christi*. Също така трябва да се отбележи, че освен яцеозидин (**189**), всички останалите 7 съединения са намирани преди това в различни видове *Inula*, като например *I. britannica*, *I. japonica*, *I. helenium*, *I. salsoides*, *I. viscosa*, *I. germanica* и др. Изолираните хлорогенова (**164**) и 3,5-дикафеоилхинова (**193**) киселини се откриват за първи път в изследвания вид. Тяхното присъствие обаче не е изненадващо, защото моно- и дикафеоилхиновите киселини са широко разпространени в сем. Asteraceae, включително и при видовете *Inula* (*I. viscosa*, *I. britannica*, *I. helenium* и др.).

4.3. *Inula aschersoniana* var. *aschersoniana*

От надземните части на *Inula aschersoniana* var. *aschersoniana* са изолирани 3 сескитерпенови лактона - инусониолид (**71**), партенолид (**83**) и диепоксикостунолид (**84**),

които са намирани и преди това в същия вид. ИнусониOLID (71) се съобщава също и в близко родствената *I. verbascifolia* subsp. *methanea* от гръцки произход.

Идентифицирани са и четири нови сескитерпеноида от псевдогуайанов тип. Два от тях са 3-ангелоилокси и 3-сенециоилокси производни на дамсиновата киселина (171 и 172). От направения литературен преглед може да се каже, че киселини с псевдогуайанов скелет не са откривани досега във видове от род *Inula*. Има данни за ейдесманови сескитерпенови киселини. Другите две съединения, наречени ашерсониян А и В (173 и 174) са 3-ангелоилови и 3-сенециоилови естери на един и същ агликон. Характерно за него е присъствието на циклопропенонов пръстен вместо С-7-изопропилна група. Литературната справка показва, че описаните 4 нови вещества са едно сериозно допълнение към химията на природните вещества, тъй като досега са известни само 6 природни съединения с циклопропенонов пръстен. Четири от тях са сескитерпенови производни: 1 ейдесман и 3 еремофилана, намирани съответно в *I. lineariifolia* и *Telekia speciosa*, а останалите две са киселини (алутаценова киселина А и В), изолирани от гъби.

Inula aschersoniana var. *aschersoniana* е субендемичен вид, разпространен на Балканския полуостров и данните за неговия химичен състав са твърде оскъдни. Следователно, тритерпеноидите от β - и α -амиринов, тараксастеролов и ψ -тараксастеролов тип (154, 159, 160, 175, 177-185) – алкохоли и техните ацетати и палмитати са нови за изследвания вид и обогатяват познанията за терпеновия профил на *I. aschersoniana*.

Изолирани са също 10 флавоноида: 7 флавона – лутеолин (99), непетин (100), непитрин (102), хиспидулин (105), хризоериол (104), апигенин (111) и лутеолин-7-О-глюкозид (187), както и 3 флавонола – хризоспленол С (191), патулетин-7-О-глюкозид (128) и патулетин-7-О-(6“-О-ацетил)- β -D-глюкопиранозид (192). В литературата липсват данни за съдържание на флавоноиди в *I. aschersoniana*, така че всички тези съединения са нови за изследвания вид, а патулетин-7-О-(6“-О-ацетил)- β -D-глюкопиранозид (192) е ново природно съединение. Струва си да се отбележи, че ацилирани 6”-изобутирил, 6”-(2-метилбутирил) и 6”-изовалерил глюкозиди на патулетин са намирани също и в *I. britannica*.

4.4. Хемотаксономични изводи

Таксономичната класификация на род *Inula* дълги години е била спорна и все още е предмет на дискусии. Първоначално родът е бил разделен на четири секции на базата на основни морфологични белези - *Enula*, *Corvisartia*, *Dittrichia* и *Limbarda*. Последните две секции днес са общоприети като независими родове *Dittrichia* и *Limbarda*. *I. helenium* е единственият представител на секция *Corvisartia*, а в секция *Enula* са включени всички европейски представители на рода, в това число и видовете, обект на дисертационния труд.

Неотдавна са проведени кариологични, морфологични и ДНК анализи на европейски представители на рода с оглед да бъде хвърлена светлина върху таксономията на рода. Съгласно получените данни, *I. britannica*, *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* принадлежат към един и същ клейд, но към различни близкородствени подгрупи. Полиплоидите *I. britannica* и *I. oculus-christi* формират едната подгрупа, а диплоидът *I. aschersoniana* е включен в друга подгрупа, заедно с *I. verbascifolia*. В подкрепа на това разделение са и получените от нас резултати за съдържание на сескитерпенови лактони в тези видове. Изолираните общо 13 сескитерпенови лактона се различават както по скелетния тип, така и по начина на свързване на лактонния пръстен. В *I. britannica* са намерени гуайанолиди, псевдогуайанолиди и ейдесманолиди, а в *I. oculus-christi* - гуайанолиди и ейдесманолиди. Характерна особеност за всички тях е, че са с 12,8- свързан лактонен пръстен. За разлика от тях, *I. aschersoniana* продуцира 12,6-олиди с гермакранов и 4,5-секо-гуайнов скелет, т.е. резултатите са в подкрепа на обединението на *I. britannica* и *I. oculus-christi* в една подгрупа и отделянето на *I. aschersoniana* в друга подгрупа.

По отношение на намерените тритерпеноиди също се наблюдава сходство и различие. В *I. britannica* и *I. oculus-christi* са намерени палмитинови естери на 16 β -хидроксилни производни на лупеол (**152**), β -амирин (**175**) и ψ -таракастерол (**176**), докато в *I. aschersoniana* преобладават палмитиновите естери и ацетати на β - и α -амирин, таракастерол и ψ -таракастерол. В *I. aschersoniana* не се регистрирани тритерпеноиди от лупанов тип. Въпреки че резултатите за тритерпеноидите са твърде оскъдни за по-категорични заключения, те също подкрепят принадлежността на трите вида към две подгрупи *I. britannica* / *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana*.

Получените резултати за флавоноидите, за разлика от терпеноидите, не позволяват изводи в същата посока, т.е. принадлежността им към предложените две подгрупи. В трите изследвани вида са намерени общо 14 флавоноида, от които 10 флавона и 4 флавонола. Наблюдават се следните особености: *I. oculus-christi* съдържа само флавони, докато в *I. aschersoniana* и *I. britannica* са намерени както флавони, така и флавоноли. Преобладават флавоноидите със заместител при С-6, което е в съгласие с публикуваните досега данни за съдържание на флавоноиди в род *Inula*, т.е. те могат да се приемат като хемотаксономична характеристика на ниво род. По-нататък, лутеолин (**99**) е намерен и в трите вида, а непетин (**100**), непитрин (**102**), хиспидулин (**105**) и апигенин (**111**) са общи за *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana*, както и за *I. britannica* с друг произход, което би могло да се приеме като потвърждение за близкородствените връзки на трите вида и съответно принадлежността им към един и същ клейд.

Мястото на *I. britannica* в една подгрупа с *I. oculus-christi* на база на лактонен профил или в един клейд с *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* на база на флавоноиден профил е условно, тъй като са налице данни за съществуването на хемотипове за този вид по отношение на двата типа вещества, което не позволява той да бъде позициониран еднозначно. За разлика от *I. britannica*, за другите два вида *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* няма данни за наличие на хемотипове. Това би могло да означава, че *I. britannica* е еволюционно най-млад.

Направените заключения за хемотаксономичната връзка между изследваните таксони са доста предварителни предвид малкото данни за химичния профил на трите вида. Естествено необходими са още много фитохимични и генетични изследвания на тези и други видове *Inula*, които да подпомогнат изясняването на класификацията в този род, която досега е базирана главно на морфологични белези.

5. Сравнителен качествен и количествен анализ на екстракти на *I. britannica*, събрана от различни находища в България

Сравнението на наличните досега резултати за химичния състав на *I. britannica* с различен произход (Китай, Сърбия и България) показва значително вътревидово разнообразие по отношение на сескитерпеновите лактони, описани по горе в 3.1. От друга страна е известно, че съдържанието на фенолни съединения варира в зависимост от екологичните условия. Всичко това провокира идеята за сравнително изследване на вторични метаболити в британски оман (*I. britannica*) от български популации с оглед изследване на вътревидовото разнообразие и определяне на перспективни популации, богати на целеви компоненти.

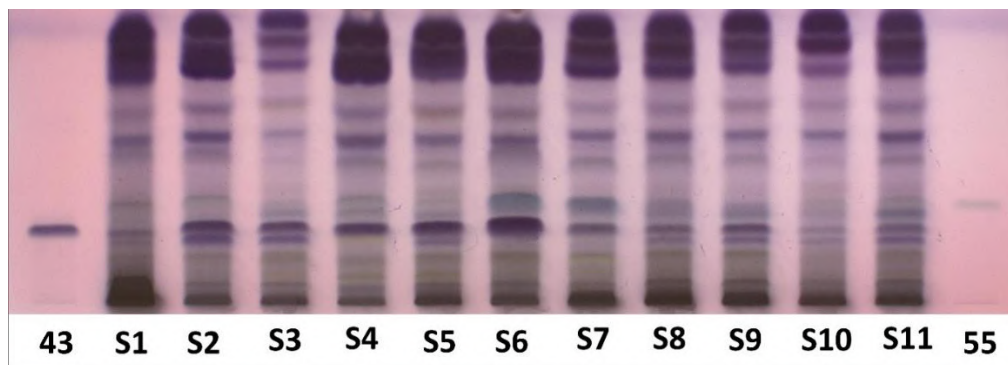


Фиг. 10. Местообитания на изследваните проби от *Inula britannica*

Използвани са сухи надземни части от *I. britannica*, събрани от 11 различни естествени находища (Фиг. 10). Чрез последователна ултразвукова екстракция на растителния материал с хлороформ и метанол са получени обогатени на различни типове биологично-активни вещества екстракти: хлороформени, съдържащи главно сескитерпенови лактони и други терпеноиди, и метанолни екстракти, съдържащи фенолни съединения (фенолни киселини и флавоноиди), които са подложени на качествен и количествен анализ.

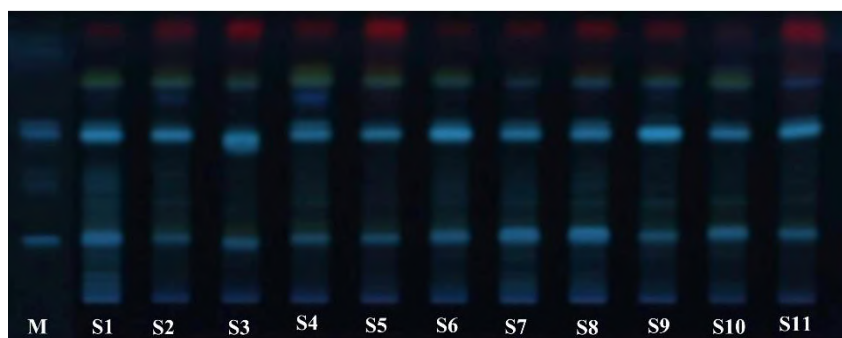
5.1. Качествен анализ на хлороформени и метанолни екстракти

За качествено сравняване на хлороформените и метанолните екстракти е използвана високоефективна тънкослойна хроматография (ВЕТСХ). Сескитерпеновите лактони гайлардин (**43**) и британин (**55**) (описани в част **3.1**) са използвани като стандарти за анализ на хлороформените екстракти, а хлорогенова (**164**), 1,5-, 3,5-, 4,5- и 3,4- дикафеоилхинови (**165, 193-195**) киселини (описани в част **3.4**) като стандарти за анализ на метанолните екстракти. Визуализирането на хроматографските петна е осъществено чрез напръскване с анисалдеhid реагент и нагриване при 120 °C за 5 мин (терпеноиди) и напръскване с NP реагент, последващо нагриване при 105 °C за 5 мин (фенолни съединения) и наблюдаване под УВ светлина (254 и 365 nm).



Фиг. 11. ВЕТСХ (Хл/Ац, 10:1) на хлороформени екстракти от *I. britannica* със свидетели гайлардин (**43**) и британин (**55**)

Както се вижда от Фиг. 11, хлороформените екстракти на пробите, събрани от различни находища имат сходен качествен профил, но се наблюдават съществени количествени различия по отношение на сескитерпеновите лактони **43** и **55**. Най-бедни на тези два лактона изглеждат проби **S1** и **S10**, събрани от района на гр. Берковица и с. Брежани, съответно, а най-богата е тази от района на с. Ъглен (проба **S6**). В ТСХ зоната (R_f 0.8 – 1.0) се наблюдават петна, съответстващи на тритерпеновите палмитати **152**, **175** и **176**, които присъстват във всички проби.

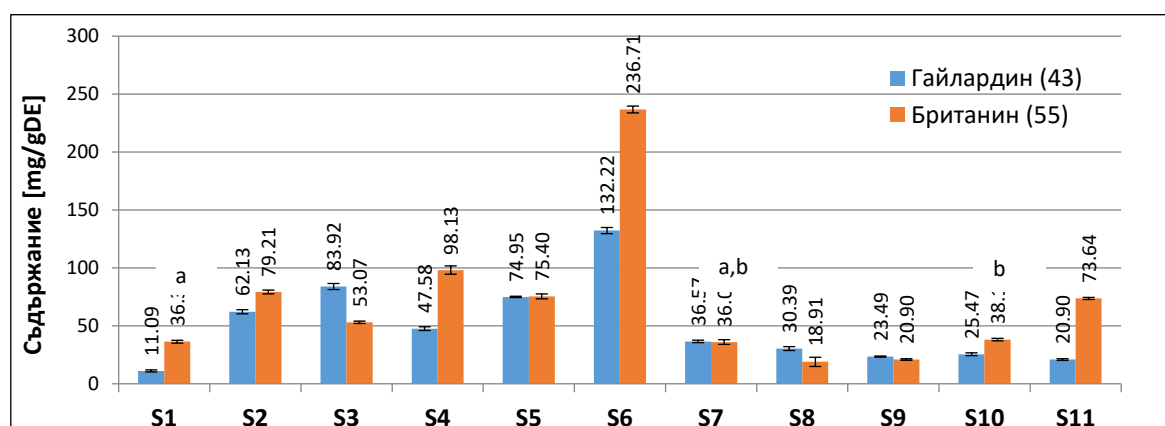


Фиг. 12. ВЕТСХ (Толуен/EtOAc/HCOOH/H₂O, 5:25:100:10) на метанолните екстракти от *I. britannica* (S1- S11) с моделна смес (M, R_f 0.23 (164), 0.42 (194), 0.44 (195), 0.58 (165) и 0.62 (193))

Както се вижда от Фиг. 12, метанолните екстракти имат сходен качествен профил по отношение на моно- и дикафеоилови естери на хиновата киселина. Хлорогеновата (R_f 0.23) и 1,5-дикафеоилхиновата (R_f 0.58) киселини са основни компоненти във всички проби, докато количеството на другите три позиционни изомера (4,5-, 3,4-, и 3,5- дикафеоилхинова киселини) е значително по-ниско.

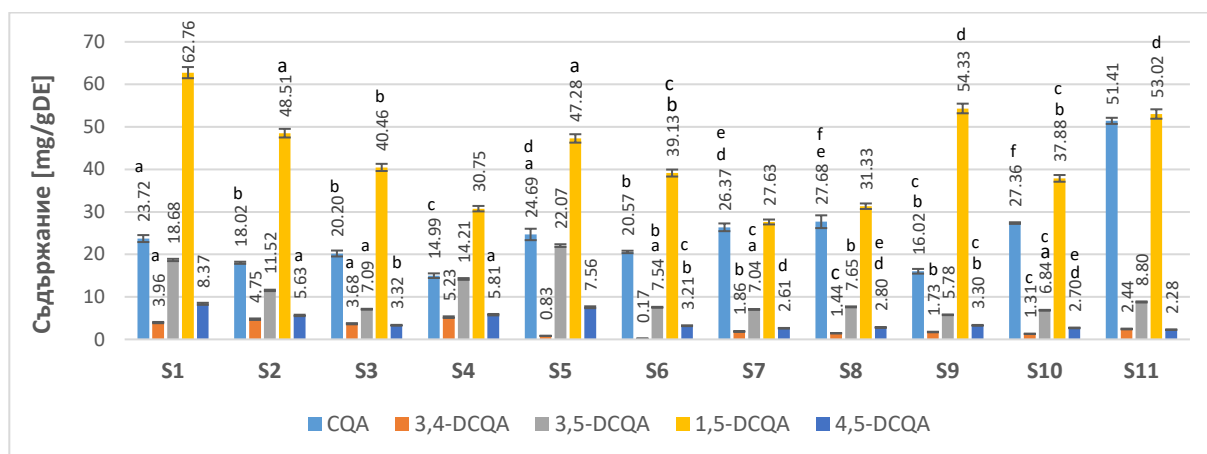
5.2. Количествен анализ на хлороформени и метанолни екстракти

Газ-хроматографията се използва успешно за количествено определяне на сескитерпенови лактони в различни екстракти като *Inula helenium*, *Arnica montana* и др. Този метод е използван и в настоящите изследвания за определяне съдържанието на основните сескитерпенови лактони в хлороформените екстракти от британски оман. За построяване на стандартните прави са използвани разтвори от гайлардин (43) и британин (55) в хлороформ с различна концентрация.



Фиг. 13. Съдържание на гайлардин (43) и британин (55) (mg/gDE) в хлороформените екстракти на *I. britannica* от различни находища (стойности с един и същ индекс са статистически неразличими, $p > 0.05$)

Както се вижда от Фиг. 13, съдържанието на двата лактона варира в широки граници в изследваните проби - от 11.1 до 132.2 mg/gDE за гайлардин (**43**) и от 18.9 до 236.7 mg/gDE за британин (**55**). Проба **S6** (с. Ъглен) е най-богата на изследваните лактони, а именно количеството на **43** е 132.2 ± 2.7 mg/gDE, а това на **55** е 236.7 ± 2.9 mg/gDE. Най-бедни на сескитерпенови лактони са проби **S1** (Берковица), **S8** (с. Краище) и **S9** (с. Бели мел). В тези проби общото съдържание на двата лактона не надвишава 50 mg/gDE. Прави впечатление и различното съотношение на двата лактона в изследваните проби. Така например, в проби **S1** (Берковица), **S4** (с. Ветрен), **S6** (с. Ъглен) и **S11** (Славянка) съдържанието на британин (**55**) надвишава дву- и трикратно това на гайлардин (**43**), в проби **S3** (с. Г. Брестница) и **S8** (с. Краище, Западни Родопи) количеството на гайлардин е по-високо от това на британин, докато в проби **S2** (с. Г. Геново), **S5** (Влахина), **S7** (Червена стена), **S9** (с. Бели мел) и **S10** (с. Брежани) съдържанието на двата лактона е почти еднакво. Получените резултати корелират с резултатите от ВЕТСХ сравняване на хлороформните екстракти, съгласно които най-богата на сескитерпенови лактони е проба **S6** от района на с. Ъглен.



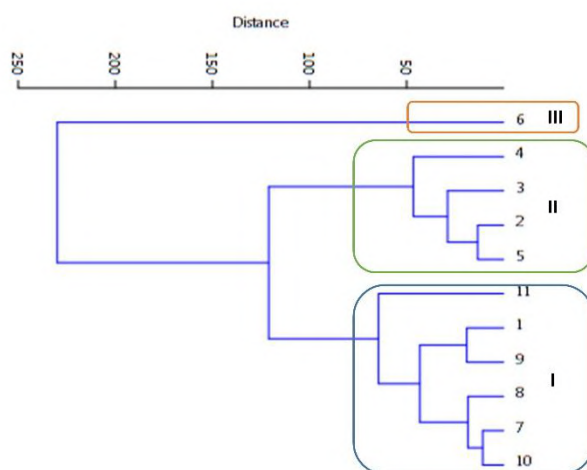
Фиг. 14. Съдържание на хлорогенова, 1,5-, 3,4-, 4,5- и 3,5-дикафеоилхинови киселини (mg/gDE) в метанолни екстракти от *I. britannica* от различни находища (стойности с един и същ индекс са статистически неразличими, $p > 0.05$)

ВЕТХ е използвана за количествено определяне на хлорогенова и изомерните дикафеоилови естери на хиновата киселина в метанолните екстракти на *I. britannica* от различни естествени находища. За построяване на калибровъчните криви е използвана моделна смес от хлорогенова, 4,5-, 3,4-, 1,5- и 3,5- дикафеоилхинова киселини в метанол с различни концентрации. Получените резултати, представени на Фиг. 14 показват, че количеството на хлорогеновата киселина (5-CQA) варира от 14.99 ± 0.54 (**S4**, с. Ветрен)) до 51.41 ± 0.72 mg/gDE (**S11**, Славянка). Сред дикафеоиловите естери на хиновата киселина, най-високо е съдържанието на 1,5-DCQA (27.63 ± 0.58 - 62.76 ± 1.31 mg/gDE), следвана от 3,5-

DCQA (5.78 ± 0.08 - 18.68 ± 0.27 mg/gDE), 4,5-DCQA (2.28 ± 0.07 - 8.37 ± 0.24 mg/gDE) и 3,4-DCQA (0.17 ± 0.01 - 5.23 ± 0.19 mg/gDE). Установено е, че проба **S1** (Берковица) е най-богата на 1,5- и 4,5-DCQA, проба **S5** (Влахина) на 3,5-DCQA, а проба **S4** (с. Ветрен) на 3,4-DCQA.

В научната литература има само няколко публикации за съдържание на 5-CQA и DCQA изомери в *I. britannica*, но е трудно да бъде сравнено тяхното количество, тъй като данните се отнасят до тяхното изолиране, LC/MS и ТСХ регистриране. В изследване на 33 проби на *I. britannica* от Китай средното съдържание на 5-CQA (**164**) в цветовете, стебла и надземни части е съответно 323, 146 и 302 $\mu\text{g/gDM}$.

Накрая, за изследване на вътревидовото разнообразие сред 11-те популации на *I. britannica* е използван клъстерен анализ, в който са включени количествата на анализирани по-горе сескитерпенови лактони, хлорогенова и дикафеоилхинови киселини. Както се вижда от Фиг. 15, изследваните проби могат да се групират в 3 основни клъстера (**I – III**). Клъстер **I** включва проби **S1** и **S7-S11**, в които съдържанието на британин и гайлардин е най-ниско, а това на фенолните киселини е сравнително високо. Клъстер **II** включва проби **S2-S5**, в които има значително количество както на сескитерпенови лактони, така и на моно- и дикафеоилови естери на хиновата киселина. Клъстер **III**, заема най-отдалечена позиция и се състои само от проба **S6**, в която съдържанието на сескитерпеновите лактони **43** и **55** е изключително високо.



Фиг. 15. Дендрограма, получена от клъстерния анализ (Ward's method, Euclidean distance) на количествата на индивидуалните съединения в проби от *I. britannica*

Резултатите от сравнителното изследване на вторични метаболити в *I. britannica* от български популации определят тези от районите на Берковица (**S1**), Славянка (**S11**) и с. Ъглен (**S6**) като перспективни популации, богати на целеви компоненти – фенолни съединения или сескитерпенови лактони.

6. Количествено определяне на фенолни съединения в екстракти на видове *Inula* и оценка на техния антиоксидантен потенциал

Известно е, че свободните радикали и реактивните кислородни видове са основната причина за различни хронични и дегенеративни заболявания, свързани с оксидативен стрес като захарен диабет, възпаление, рак, хипертония, атеросклероза, сърдечно-съдови и невродегенеративни заболявания. Напоследък растенията и растителните антиоксиданти (витамини, флавоноиди и фенолни киселини) получават все по-голямо внимание, тъй като те играят важна роля като превантивни средства срещу заболявания, причинени от оксидативния стрес с дългосрочни физиологични ползи без вредни странични ефекти. Фенолните съединения и флавоноидите допринасят за цялостния антиоксидантен потенциал на растенията, така че хлороформените и метанолните екстракти от листата и цветовете на *I. britannica*, *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* var. *aschersoniana* са анализирани за тяхното общо съдържание на фенолни съединения и флавоноиди. Общото съдържание на фенолни съединения (ТФС) в екстрактите е определено с помощта на Folin-Ciocalteu метод и е представено като милиграми еквивалент на галовата киселина в 1 грам екстракт (mgGAE/gE). Общото съдържание на флавоноиди (ТФЛС) в метанолните екстракти е определено по метода описан от Zhishen и е представено като милиграми еквивалент на катехин в 1 грам екстракт (mgCE/gE).

Както се вижда от Таблица 7, метанолните екстракти на изследваните видове са значително по-богати на ТФС от съответните хлороформени екстракти. Най-богат на фенолни съединения е метанолният екстракт от цветовете на *I. aschersoniana* var. *aschersoniana* (103.10 ± 0.92 mgGAE/gDE), следван от метанолните екстракти от листа и цветовете на *I. britannica* и *I. oculus-christi*. Прави впечатление, че при последните два вида ТФС в метанолните екстракти от цветовете и листа е приблизително еднакво (Таблица 7). Аналогично, метанолните екстракти са по-богати на флавоноиди (ТФЛС) в сравнение със съответните хлороформени екстракти. Като цяло, в цветовете на изследваните видове е регистрирано по-високо ТФЛС. Изключение прави хлороформеният екстракт от листа на *I. britannica*, в който ТФЛС надвишава това в цветовете (9.03 ± 1.25 vs 6.86 ± 0.36 mgCE/gDE). Най-голямо ТФЛС е отчетено в метанолния екстракт от цветовете на *I. oculus-christi* (42.63 ± 0.75 mgCE/gDE).

Изследвана е способността на метанолните и хлороформените екстракти (1 мг/мл) да улавят свободните DPPH радикали и ABTS йон-радикали, а техният антиоксидантен потенциал е представен в еквиваленти Тролокс (Таблица 7). За целта са използвани спектрофотометрични методи, описани в литературата.

Таблица 7. ТФС, ТФлС и DPPH и ABTS антиоксидантен потенциал в екстракти от *Inula*

Вид	Раст. част	Екстракт	ТФС [mgGAE/gDE]	ТФлС [mgCE/gDE]	DPPH [mMTrolox/gDE]	ABTS [mMTrolox/gE]
<i>I. britannica</i>	листа	CHCl ₃	12.46±1.01	9.03±1.25 ^{a,b}	0.023±0.001 ^a	0.062±0.018 ^{a-d}
	цветове	CHCl ₃	7.36±1.12	6.86±0.36 ^{a,c}	0.041±0.001 ^b	0.077±0.016 ^{a,e-g}
	листа	CH ₃ OH	71.91±5.51 ^{a,b,c}	9.20±0.47 ^b	0.428±0.022	0.404±0.134 ^{h-j}
	цветове	CH ₃ OH	79.41±3.72	19.94±1.23	0.376±0.005	0.403±0.068 ^h
<i>I. oculus-christi</i>	листа	CHCl ₃	5.48±0.62	4.9±0.16	0.076±0.002	0.105±0.003
	цветове	CHCl ₃	18.31±1.63	16.08±2.06	0.023±0.001 ^a	0.056±0.003 ^{b,e}
	листа	CH ₃ OH	66.95±1.13 ^a	19.12±1.34	0.981±0.003	0.470±0.009
	цветове	CH ₃ OH	68.34±0.66 ^b	42.63±0.75	1.167±0.007	0.582±0.010 ⁱ
<i>I. aschersoniana</i> var. <i>aschersoniana</i>	листа	CHCl ₃	10.41±0.50	2.97±0.17	0.007±0.002	0.052±0.002 ^{c,f}
	цветове	CHCl ₃	19.55±0.77	6.35±0.67 ^c	0.045±0.003 ^b	0.079±0.003 ^{d,g}
	листа	CH ₃ OH	70.72±0.96 ^c	23.95±0.8	0.498±0.024	0.304±0.009
	цветове	CH ₃ OH	103.10±0.92	36.71±0.31	1.418±0.018	0.554±0.008 ^j

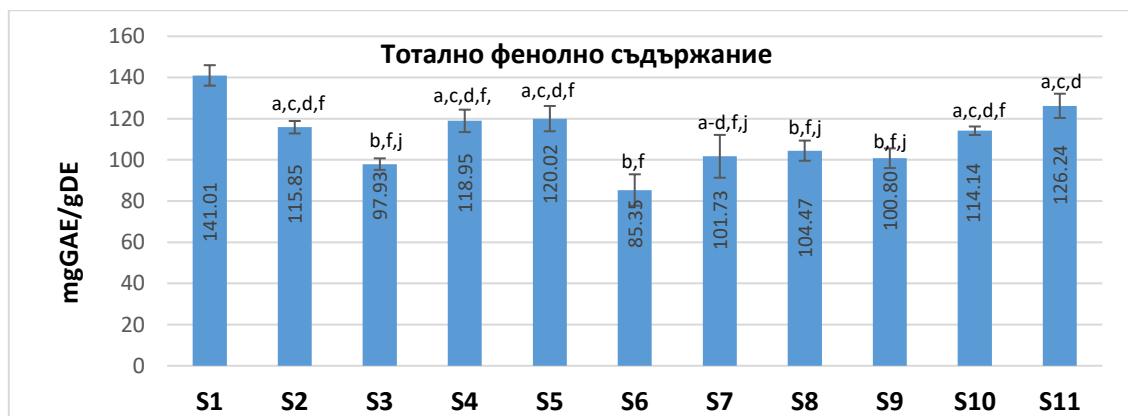
* Стойности с един и същ индекс в съответните колони са статистически неразличими, $p > 0.05$

Изследвана е способността на метанолните и хлороформените екстракти (1 мг/мл) да улавят свободните DPPH радикали и ABTS йон-радикали, а техният антиоксидантен потенциал е представен в еквиваленти Тролокс (Таблица 7). За целта са използвани спектрофотометрични методи, описани в литературата. От Таблица 7 се вижда, че метанолните екстракти (листа и цветове) проявяват по-висока антиоксидантна активност в сравнение с хлороформените екстракти. Най-добра активност спрямо DPPH[•] и ABTS^{•+} проявяват метанолните екстракти от цветове на *I. aschersoniana* (1.418±0.018 и 0.554±0.008 mMTrolox/gDE, съответно) и *I. oculus-christi* (1.167±0.007 и 0.582±0.010 mMTrolox/gDE, съответно), а най-слаба - хлороформеният екстракт от листа на *I. aschersoniana* (0.007±0.002 и 0.052±0.002 mMTrolox/gDE, съответно). Различните нива на антиоксидантна активност, получени от двата анализа, вероятно се дължат на разликата в способността на антиоксидантните съединения в екстрактите да улавят свободните ABTS и DPPH радикали в *in vitro* системи. Изчислен е корелационният коефициент на Pearson за влиянието на ТФС и ТФлС върху антиоксидантния потенциал на изследваните екстракти спрямо DPPH[•] и

ABTS^{•+} и е установена много добра корелация между ТФС/DPPH ($r = 0.85$), ТФС/ABTS ($r = 0.93$), ТФлС/DPPH ($r = 0.88$) и ТФлС/ABTS ($r = 0.83$).

7. Количествено определяне на фенолни съединения в метанолни екстракти на *I. britannica*, събрана от различни находища в България и оценка на техния антиоксидантен потенциал

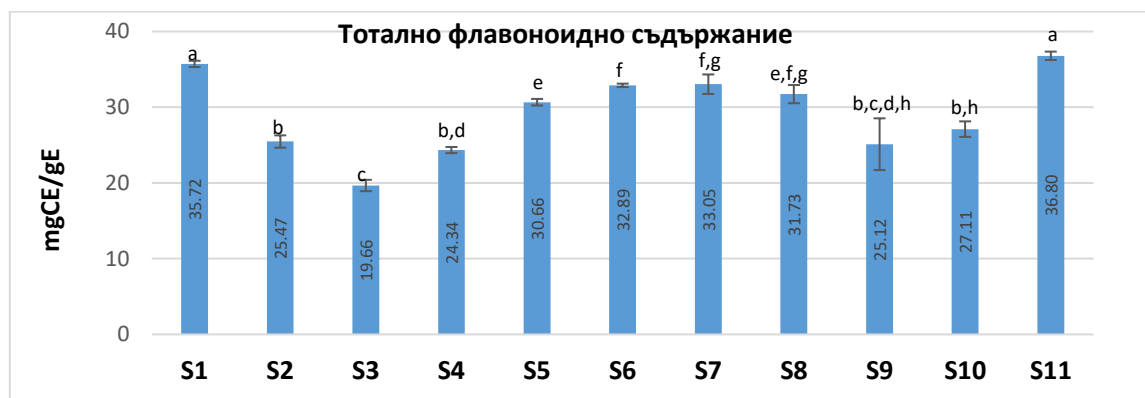
Изследвано е тоталното фенолно и флавоноидно съдържание на метанолни екстракти от надземни части на 11 вида *I. britannica* чрез спектрофотометрични методи. Количеството на фенолни съединения варира от 85.35 ± 7.64 mg GAE/gDE (S6, с. Ъглен) до 141.01 ± 4.97 mgGAE/gDE (S1, Берковица) (Фиг. 16). Проведеният ANOVA анализ показва, че стойностите за ТФС в изследваните 11 проби са статистически различни при ниво на достоверност 95%. Въпреки това, стойностите на ТФС в проби S2, S4, S5, S7 и S10, както и тези в проби S3, S7 и S9 не са статистически различни ($p > 0.05$, t-test). Следователно, формират се две основни групи в зависимост от количеството на фенолните съединения: в първата група, включваща пробите S1, S2, S4, S5, S10 и S11 ТФС е повече от 110 mg GAE/g DE, а във втората (S3, S6, S8, и S9) - по-малко от 110 mg GAE/g DE. Проба S7 заема междинно положение.



Фиг. 16. Тотално фенолно съдържание на метанолни екстракти от различни находища на *I. britannica* (стойности с един и същ индекс са статистически неразличими, $p > 0.05$)

Общото съдържание на моно- и дикафеоилови естери на хиновата киселина изчислено като сума от количествата на индивидуалните съединения определени чрез ВЕТХ следва в общи линии общото фенолно съдържание (ТФС), измерено спектрофотометрично по метода на Folin-Ciocalteu. Изчисленият коефициент на Pearson (r) е 0.79. Наблюдаваните по-високи стойности при спектрофотометричния метод вероятно се дължат на присъствието на други съединения в екстракта, които реагират с реагента на Folin-Ciocalteu.

От данните представени на Фиг. 17 се вижда, че с най-високо съдържание на флавоноиди са пробите **S1** (Берковица) и **S11** (Славянка), съответно с 35.72 ± 0.42 и 36.80 ± 0.56 mg CE/gDE. Проба **S3** е най-бедна на флавоноиди (19.66 ± 0.75 mg CE/gDE). В пробите **S5**, **S6**, **S7** и **S8** ТФЛС е > 30 mg CE/gDE, докато в пробите **S2**, **S4**, **S9** и **S10** то е по-малко от 30 mg CE/gDE.

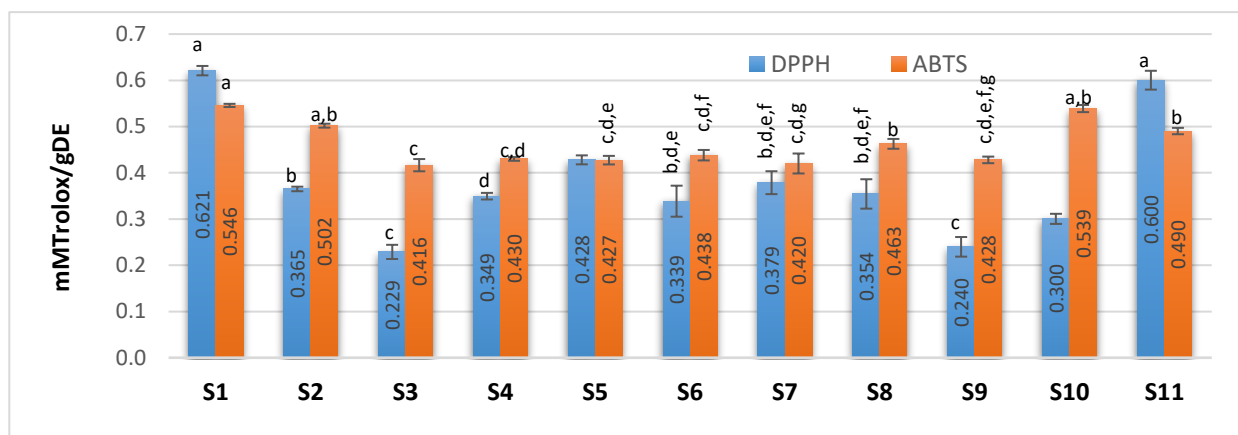


Фиг. 17. Общо флавоноидно съдържание на метанолни екстракти от различни находища на *I. britannica* (стойности с един и същ индекс са статистически неразличими, $p > 0.05$)

Както се вижда от данните представени на Фиг. 16 и 17, пробите **S1** (Берковица) и **S11** (Славянка) са с най-високо съдържание на двата класа съединения - фенолни и флавоноиди. Също така, количеството на ТФС и ТФЛС в 11-те проби от *I. britannica* е по-високо от това, намерено в метанолния екстракт на цветовете на *I. britannica* от друга българска популация, описана по-горе. При сравняване с литературни данни е установено, че ТФС и ТФЛС в изследваните български популации на вида е по-ниско от това във водния екстракт на *I. britannica* var. *chinensis* (318.10 и 335.87 mgCE/gDE) от южнокорейски произход. В друго проучване е установено, че водният екстракт от Южна Корея е по-богат на ТФС в сравнение с етанолния екстракт (50.8 спрямо 42.1 mgGAE/g). Обратно, флавоноидите доминират в етанолния екстракт 225.7 mgQE/g, докато във водния екстракт количеството е 51.6 mgQE/g.

Изследван е също антиоксидантният потенциал на метанолните екстракти на вида от различни находища чрез способността им да улавят DPPH[•] и ABTS^{•+} и получените резултати са изразени като mM Trolox еквиваленти на грам сухи екстракти (mM Trolox/gDE, Фиг. 18). Антиоксидантният капацитет на изследваните екстракти, измерен по метода DPPH варира от 0.229 ± 0.015 до 0.620 ± 0.001 mM Trolox/gDE. Пробите **S1** (Берковица) и **S11** (Славянка) имат най-висока радикал-улавяща активност, а най-ниска активност - проба **S3** (с. Г. Брестница). Получените резултати корелират с общото фенолно и флавоноидно съдържание в тези проби. Това бе потвърдено и от изчисления коефициент на корелация Pearson ($r = 0.72$ и $r = 0.80$, съответно), съгласно който флавоноидите имат по-голям принос

към антиоксидантната активност на изследваните екстракти. По-високата DPPH активност на проба **S6** (с. Ъглен) спрямо проба **S3** (с. Г. Брестница) вероятно се дължи на по-голямото количество на флавоноиди в проба **S6** (с. Ъглен).



Фиг. 18. Антиоксидантен потенциал на метанолни екстракти от *I. britannica* (стойности с един и същ индекс са статистически неразличими, $p > 0.05$)

Антиоксидантният капацитет на изследваните екстракти, измерен по метода ABTS (Фиг. 18) варира между 0.420 ± 0.010 и 0.550 ± 0.003 mMTrolox /gDE. Най-висока радикал-улавяща активност имат пробите **S1** и **S10**, докато пробите **S3** – **S9** проявяват аналогична активност. Наблюдавана е добра корелация между активност спрямо ABTS^{•+} и ТФС (коефициент на Pearson $r = 0.64$) и слаба корелация с ТФЛС ($r = 0.34$).

Изводи

1. Фитохимичното изследване на три вида *Inula*, растящи в България: *Inula britannica* L. (британски оман), *I. oculus-christi* L. (скален оман) и *I. aschersoniana* Janka var. *aschersoniana* (ашерсониев оман) позволи идентифицирането на общо 52 природни съединения – сескитерпеноиди, тритерпеноиди и стероли, флавоноиди и фенолни киселини.

2. В хлороформните екстракти са намерени общо 13 сескитерпенови лактона и 4 сескитерпеноида, принадлежащи към 5 различни скелетни типа: гуайанов, псевдогуайанов, ейдесманов, гермакранов и 4,5-секо-гуайанов. Установено е, че 8 от тях са нови природни съединения, чиято структура и относителна стереохимия е доказана чрез спектрални методи.

3. Бицикличните сескитерпенови лактони (гуайанолиди, псевдогуайанолиди и ейдесманолиди), изолирани от *I. britannica* отличават българската популация от тези с азиатски произход, продуциращи главно секогуайанолиди и секоейдесманолиди и я определят като нов хемотип.

4. Установено е, че *I. oculus-christi* продуцира лактони от един и същ скелетен тип – гуайанолиди и ейдесманолиди, независимо от произхода си, а гайлардин (43) е основен компонент във всички таксони, изследвани досега. Получените от нас резултати обогатяват познанията за лактонния профил на вида с 4 нови природни съединения и са от значение за хемосистематиката на рода.

5. Наред с познатите три сескитерпенови лактона в *I. aschersoniana* Janka var. *aschersoniana* са идентифицирани и 4 нови природни вещества с псевдогуайанов скелет – 2 киселини и 2 съединения с циклопропенов пръстен. Последните две са едно сериозно допълнение към химията на природните вещества, тъй като досега са известни само 6 природни съединения с циклопропенов пръстен, а киселините с псевдогуайанов скелет са нови за род *Inula*.

6. В хлороформните екстракти от *I. britannica* и *I. oculus-christi* са намерени също и палмитинови естери на 16 β -хидроксилупеол, 16 β -хидрокси- β -амирин и фарадиол. Тези съединения се откриват за първи път в *I. oculus-christi*, а 16 β -хидрокси- β -амирин-3-О-палмитат и фарадиол-3-О-палмитат са нови за *I. britannica*.

7. За първи път е изследван тритерпеновият състав на *I. aschersoniana* Janka var. *aschersoniana*. С помощта на ГХ-МС в хлороформния екстракт са идентифицирани 13 тритерпеноида от β - и α -амиринов, таракастеролов и ψ -таракастеролов тип – алкохоли и техни ацетати и палмитати.

8. От метанолните екстракти на *I. britannica*, *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* Janka var. *aschersoniana* са изолирани и идентифицирани общо 14 флавоноида - 10 флавона и 4

флавонола. Един от тях, патулетин-7-О-(6''-ацетил) глюкопиранозид е новооткрито природно съединение, а яцеозидин се съобщава за първи път в род *Inula*. С изключение на хиспидулин, всички флавоноиди, намерени в *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* var. *aschersoniana* са нови за изследваните видове и обогатяват познанията за съдържание на флавоноиди в род *Inula*.

9. Установено е, че *I. oculus-christi* съдържа само флаволи за разлика от другите два вида, в които са намерени и флавоноли. В *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* Janka var. *aschersoniana* доминират С-6 заместените съединения. Наблюдаваните различия във флавоноидния профил по отношение на заместителите при С-3 и/или С-6 дават основание да се изрази хипотеза, че този тип съединения могат да хвърлят допълнителна светлина върху таксономията на род *Inula*.

10. ТСХ сравняване на метанолните екстракти от *I. britannica*, *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* Janka var. *aschersoniana* показва еднакъв качествен състав по отношение на фенолните киселини - хлорогенова киселина, 1,5-, 3,5-, 3,4- и 4,5- дикафеоилхинови киселини.

11. Сравнителното изследване на вторични метаболити в *I. britannica* от 11 български популации показва сходство в качествения състав на хлороформените и метанолните екстракти по отношение на сескитерпеновите лактони (гайлардин и британин), моно- и дикафеоиловите естери на хиновата киселина, но разлика в тяхното количество. Въз основа на получените резултати са определени перспективни популации, богати на целеви компоненти – фенолни съединения (Берковица (S1) и Славянка (S11)) или сескитерпенови лактони (Ъглен (S6)).

12. Наблюдавана е много добра корелация между тоталното фенолно и флавоноидно съдържание на метанолните и хлороформените екстракти от листа и цветове на трите изследвани вида *Inula* и тяхната способност да улавят свободните DPPH• и ABTS•+. Подобна зависимост е наблюдавана и при изследване на антиоксидантния капацитет на метанолните екстракти от надземни части на *I. britannica* от 11 български находища.

Приноси

1. За първи път е проведено детайлно фитохимично изследване три вида от род *Inula*, растящи в България - *I. britannica*, *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* var. *aschersoniana* като са получени нови данни за химичния състав на изследваните видове.

2. Списъкът на природните химични съединения е разширен с 9 нови вещества – 4 сескитерпенови лактона, 4 псевдогуайанови сескитерпеноида и 1 флавоноиден ацилглюкозид.

3. Новите съединения ашерсониапон-А и ашерсониапон-В са едно сериозно допълнение към химията на природните вещества, тъй като досега са известни само 6 природни съединения с циклопропенонов пръстен.

4. Установен е нов хемотип на *I. britannica*, продуциращ бициклични сескитерпенови лактони.

5. Сходствата и различията, установени в терпеноидния и флавоноидния състав на *I. britannica*, *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* var. *aschersoniana* могат да бъдат от значение за хемосистематиката на рода.

6. Получени са нови данни за антиоксидантния потенциал на екстракти от листа и цветовете на *I. britannica*, *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* var. *aschersoniana*, както и на екстракти от надземни части на *I. britannica* от 11 български находища. Намерена е много добра корелация между тяхното тотално фенолно и флавоноидно съдържание и способността им да улавят свободните DPPH• и ABTS•⁺.

7. Сравнителният фитохимичен анализ на 11 популации *I. britannica* доведе до подборана перспективни популации, богати на целеви компоненти - сескитерпенови лактони и фенолни съединения на базата на количествата на британин и гайлардин, хлорогенова, 3,5-, 1,5-, 4,5- и 3,4- дикафеоилхинови киселини.

Списък с научни публикации по темата на дисертацията

1. Trendafilova, A., Todorova, M., **Genova, V.**, Shestakova, P., Dimitrov, D., Jadranin, M., Milosavljevic, S., 2014. New pseudoguaiane derivatives from *Inula aschersoniana* Janka var. *aschersoniana*, Natural Product Communications, 9, 1123-1124. **Q2**
2. **Ivanova, V.**, Trendafilova, A., Todorova, M., Danova, K., Dimitrov, D., 2017. Phytochemical Profile of *Inula britannica* from Bulgaria, Natural Product Communications, 12 (2), 153-154. **Q2**
3. Trendafilova, A., **Ivanova, V.**, Todorova, M., Aneva, I. 2017. New sesquiterpene lactones from *Inula oculus-christi* L, Phytochemistry Letters, 21, 221-225. **Q1**
4. Trendafilova, A., Todorova, M., **Ivanova, V.**, Aneva, I. 2017. Phenolic constituents and antioxidant capacity of *Inula oculus-christi* from Bulgaria. Bulgarian Chemical Communications 49, Special Issue D, 176-180. **Q4**
5. **Ivanova, V.**, Todorova, M., Rangelov, M., Aneva, I., Trendafilova, A., 2020. Phenolic content and antioxidant capacity of *Inula britannica* from different habitats in Bulgaria, Bulgarian Chemical Communications, 52, 168-173. **Q4**
6. **Ivanova, V.**, Todorova, M., Nedialkov, P., Trendafilova, A., 2021. A New Flavonol Acylglucoside From *Inula aschersoniana* Janka Var. *aschersoniana*, Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences., 74, 4, 514-520. **Q2**

Списък на забелязани цитати върху публикациите, включени в дисертацията

Trendafilova, A., Todorova, M., **Genova, V.**, Shestakova, P., Dimitrov, D., Jadranin, M., Milosavljevic, S., 2014. New pseudoguaiane derivatives from *Inula aschersoniana* Janka var. *aschersoniana*, Natural Product Communications, 9, 1123-1124.

1. Sun, C.-P., Jia, Z.-L., Huo, X.-K., Tian, X.-G., Feng, L., Wang, C., Zhang, B.-J., Zhao, W.-Y., Ma, X.-C., Medicinal Inula Species: Phytochemistry, Biosynthesis, and Bioactivities, (2021) American Journal of Chinese Medicine, 49 (2), 315-358.

Ivanova, V., Trendafilova, A., Todorova, M., Danova, K., Dimitrov, D., 2017. Phytochemical Profile of *Inula britannica* from Bulgaria, Natural Product Communications, 12 (2), 153-154.

2. Bailly, C., Anticancer targets and signaling pathways activated by britannin and related pseudoguaianolide sesquiterpene lactones, (2021) Biomedicines, 9 (10), 1325.
3. Yang, L., Wang, X., Hou, A., Zhang, J., Wang, S., Man, W., Yu, H., Zheng, S., Wang, Q., Jiang, H., Kuang, H., A review of the botany, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the Flos Inulae, (2021) Journal of Ethnopharmacology, 276, 114125.

4. Ceylan, R., Zengin, G., Mahomoodally, M.F., Sinan, K.I., Ak, G., Jugreet, S., Cakır, O., Ouelbani, R., Paksoy, M.Y., Yılmaz, M.A., Enzyme inhibition and antioxidant functionality of eleven *Inula* species based on chemical components and chemometric insights, (2021) *Biochemical Systematics and Ecology*, 95, 104225.
5. Stanojković, J., Todorović, S., Pećinar, I., Lević, S., Čalić, S., Janošević, D., Leaf glandular trichomes of micropropagated *Inula britannica* – Effect of sucrose on trichome density, distribution and chemical profile, (2021) *Industrial Crops and Products*, 160, 113101.
6. Zheng, S., Li, L., Li, N., Du, Y., Zhang, N., 1, 6-o, o-diacetylbritannilactone from *Inula britannica* induces anti-tumor effect on oral squamous cell carcinoma via miR-1247-3p/LXR α /ABCA1 signaling, (2020) *OncoTargets and Therapy*, 13,11097-11109.
7. Tavares, W.R., Seca, A.M.L., *Inula* L. secondary metabolites against oxidative stress-related human diseases, (2019) *Antioxidants*, 8 (5),122.

Trendafilova, A., **Ivanova, V.**, Todorova, M., Aneva, I. 2017. New sesquiterpene lactones from *Inula oculus-christi* L, *Phytochemistry Letters*, 21, 221-225.

8. Pukhov, S.A., Klochkov, S.G., Afanas'yeva, S.V., Eudesmane sesquiterpene lactones of the genus *Inula* and their biological activity, (2021) *Khimiya Rastitelnogo Syr'ya*, 3,19-38.
9. Kültür, S., Gürdal, B., Sari, A., Melikoğlu, G., Traditional herbal remedies used in kidney diseases in Turkey: An overview, (2021) *Turkish Journal of Botany*, 45 (4), 269-287.
10. Sun, C.-P., Jia, Z.-L., Huo, X.-K., Tian, X.-G., Feng, L., Wang, C., Zhang, B.-J., Zhao, W.-Y., Ma, X.-C., Medicinal *Inula* Species: Phytochemistry, Biosynthesis, and Bioactivities, (2021) *American Journal of Chinese Medicine*, 49 (2), 315-358.
11. Karami, A., Hamzeloo-Moghadam, M., Yami, A., Barzegar, M., Mashati, P., Gharehbaghian, A., Antiproliferative Effect of Gaillardin from *Inula oculus-christi* in Human Leukemic Cells, (2020) *Nutrition and Cancer*, 72 (6), 1043-1056.
12. Karami, A., Hamzeloo-Moghadam, M., Yami, A., Barzegar, M., Mashati, P., Gharehbaghian, A., The Effect of Gaillardin on Proliferation and Apoptosis of Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line (Nalm-6), (2020) *Journal of Medicinal Plants*, 19 (74), 108-117.
13. Das, A., Shakya, A., Ghosh, S.K., Singh, U.P., Bhat, H.R., A review of phytochemical and pharmacological studies of *Inula* species, (2020) *Current Bioactive Compounds*, 16 (5), 557-567.

14. Michalakea, E., Graikou, K., Aligiannis, N., Panoutsopoulos, G., Kalpoutzakis, E., Roussakis, C., Chinou, I., Isolation and structure elucidation of secondary metabolites of two Greek endemic *Inula* species. Biological activities, (2019) Phytochemistry Letters, 31,155-160.
15. Wang, T., Guo, S., Zhang, S., Yue, W., Ho, C.-T., Bai, N., Identification and quantification of seven sesquiterpene lactones in: *Inula britannica* by HPLC-DAD-MS, (2019) Analytical Methods, 11 (13), 1822-1833.

Trendafilova, A., Todorova, M., **Ivanova, V.**, Aneva, I. 2017. Phenolic constituents and antioxidant capacity of *Inula oculus-christi* from Bulgaria. Bulgarian Chemical Communications 49, 176-180.

16. Ceylan, R., Zengin, G., Mahomoodally, M.F., Sinan, K.I., Ak, G., Jugreet, S., Cakir, O., Ouelbani, R., Paksoy, M.Y., Yilmaz, M.A., Enzyme inhibition and antioxidant functionality of eleven *Inula* species based on chemical components and chemometric insights, (2021), Biochemical Systematics and Ecology, 95, 104225.

Списък на участия в научни конференции

1. A. Trendafilova, M. Todorova, **V. Genova**, P. Shestakova, D. Dimitrov, M. Jadranin, S. Milosavljevic, New pseudoguaianes from *Inula aschersoniana* Janka var. *aschersoniana*, International conference on natural products utilization: from plants to pharmacy shelf, 3-6-November 2013, Bansko, Bulgaria.
2. **V. Ivanova**, A. Trendafilova, K. Danova, M. Todorova, D. Dimitrov, Phytochemical study on *Inula britannica* L. of Bulgarian origin, 9th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, 26-29 May 2016, Plovdiv, Bulgaria.
3. **V. Ivanova**, A. Trendafilova, V. Moskova-Doumanova, J. Doumanov, T. Topouzova-Hristova, M. Todorova, Phytochemical, antioxidant, cytotoxic and antitumor screening of different *Inula oculus-christi* extracts from Bulgaria, 9th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, 26-29 May 2016, Plovdiv, Bulgaria.
4. A. Trendafilova, **V. Ivanova**, M. Todorova, I. Aneva, New sesquiterpene lactones from *Inula oculus-christi* L., 3rd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf , 18-21 October 2017, Bansko, Bulgaria.
5. A. Trendafilova, **V. Ivanova**, G. Ozek, S. Yur, T. Ozek, I. Aneva, R. Veleva, T. Topouzova-Hristova, J. Doumanov, M. Todorova, Antioxidant, Cytotoxic, Acetylcholinesterase and Tyrosinase Enzyme Inhibitory Activities of Six *Inula* Species from Bulgaria, 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, 20-24 May 2018, Split, Croatia

6. A. Trendafilova, **V. Ivanova**, M.Todorova, I. Aneva, Biogenetic Relationship between Some *Inula* Species Growing in Bulgaria Based on Their Phytochemical Profile, 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, 20.05.2018 - 24.05.2018, Split, Croatia.

7. **V. Ivanova**, A. Trendafilova, M. Rangelov, M. Todorova, Phenolic constituents and antioxidant capacity of *Inula britannica* from different habitats in Bulgaria, 3rd International Conference on Bio-antioxidants (BIO-ANTIOXIDANTS 2019), 17-21 September 2019, Nessebar, Bulgaria.

БЛАГОДАРНОСТИ

Безкрайно благодаря на научния ми ръководител проф. д-р Антоанета Трендафилова и научния консултант доц. д-р Милка Тодорова за оказаната помощ, съдействие и подкрепа при изработването на дисертационния труд.

Изказвам благодарности на доц. д-р Ина Анева и проф. д-р Димитър Димитров за предоставяне на растителния материал и идентифициране на видовете; доц. д-р Даниела Антонова и доц. д-р Мирослав Рангелов за оказаното съдействие при ГХ и ВЕТХ количествени определяния; гл. ас. д-р Ангел Конакчиев за осъществяване на ГХ-МС анализите; и колегите от ЦЯМРС за осъществяване на ЯМР анализите.

В дисертационния труд са представени резултати, получени от научни изследвания по проект PhytoBalk (р-л доц. К. Данова) на Българо-Швейцарската изследователска програма и МОН, проект ДН09/11 (р-л проф. А. Трендафилова) финансиран от Фонд за научни изследвания, Министерство на образованието и науката (МОН) и Националната изследователска програма „Млади учени и докторанти“ (ДСМ 577/17/08/2018) на МОН.