

**ОТЧЕТ ПО ПРОЕКТ ЗА НАУЧНО И КАРИЕРНО РАЗВИТИЕ
НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА „МЛАДИ УЧЕНИ И ПОСТДОКТОРАНТИ“ II ЕТАП**

Тема: „Изследване на фитохимичния профил от видове *Inula*: *Inula bifrons* и *Inula salicina*”

Участник:



/химик Виктория Иванова/

Научен ръководител:



/проф. д-р Антоанета Трендафилова/

София, февруари, 2021

Въведение (включва анотация на представения проект, цели, работна програма, предвидени дейности - до 2 стр.)

В наши дни нараства интересът от използване на лечебни растения като източник на естествени биологично активни съединения и антиоксиданти, които са от изключително значение за човешкото здраве. *Inula* е голям род Сложноцветни растения, състоящ се от около 100 вида, разпространени в целия свят и предимно в Европа, Азия, Африка и региона на Средиземно море. Около 25 вида *Inula* са изследвани химически. Характерни основни класове вторични метаболити са сескитерпенови лактони и флавоноиди. Някои видове *Inula* проявяват биологични активности като: антибактериална, хипогликемична, противоязвена, антивирусна, противогъбична, противопаразитна и др. Видовете от този род се използват като традиционни лекарствени продукти в целия свят. Колективът има за цел изследване на химичния състав на видове *Inula* растящи в България и досега има резултати върху 3 вида.

Вторият етап на проекта е продължение на фитохимичните изследвания на представители от род *Inula*. Обекти на проучванията ще бъдат видовете *Inula bifrons* и *Inula salicina*, за които липсва информация за техния химичен състав и биологична активност.

За постигане на изследователската цел в рамките на втория етап от проекта се предвижда изпълнението на следните задачи и дейности:

1. Получаване на екстракти за фитохимични и биологични изследвания. За целта ще се използват сухи надземни части от *Inula bifrons* и *Inula salicina*, събрани от Български естествени находища. Чрез последователна мацерация и ултразвукова екстракция на растителния материал с хлороформ и метанол ще бъдат получени екстракти обогатени на различни типове биологично-активни вещества.

2. Фитохимичен скрининг за определяне на вторични метаболити от хлороформените и метанолните екстракти. Получените екстракти ще бъдат анализирани с помощта на тънкослойна и/или високоефективна тънкослойна хроматография (ТСХ и/или ВЕТСХ) в присъствие на свидетели, изолирани и охарактеризирани преди това в нашата лаборатория с подходящо подобрени подвижни фази и визуализиране с УВ светлина или напръскване със специфични реагенти (сярна киселина, анисалдеhid реагент, NP/PEG и др.)

3. Изолиране на индивидуални съединения. Различни хроматографски техники ще бъдат използвани за тяхното изолиране от съответните екстракти.

4. Структурно охарактеризиране на изолираните съединения. За идентифициране на индивидуалните съединения ще се използват спектрални методи (ЯМР, ИЧ, УВ, МС).

5. Определяне на антиоксидантния потенциал на съответните екстракти, фракции и индивидуални вещества. Ще бъдат използвани спектрофотометрични методи за изследване на антирадикалова активност спрямо DPPH и ABTS радикали. Антиоксидантният потенциал ще бъде отчетен като еквиваленти Тролокс.

6. Обобщение на получените резултати. Получените резултати ще бъдат анализирани с цел търсене на сходство/различие между отделните видове *Inula* (вътревидово или междувидово разнообразие), връзка между химичен състав и биологична активност, оформяне на отчет и научно съобщение.

Резултати и обсъждане (до 10 стр.)

1. Получаване на екстракти за фитохимични и биологични изследвания и фитохимичен скрининг за определяне на вторични метаболити в хлороформните и метанолните екстракти.

В настоящото изследване е използван растителен материал от два вида от род *Inula*: *Inula bifrons* L. и *Inula salicina* L. събран във фаза пълен цъфтеж от естествени находища. Въздушно сухите и смлени надземни части са екстрахирани последователно с хлороформ и метанол при стайна температура в продължение на 24 ч. Получените екстракти са филтрувани и концентрирани на ротационен вакуум изпарител.

ТСХ сравняване в различни подвижни системи на хлороформните екстракти на двата вида и визуализиране на ТСХ петна с конц. H_2SO_4 и последващо нагряване при 120°C в присъствие на стандарти - тритерпенови съединения и β -ситостерол показва сходство по отношение на основните компоненти, както и наличие на други терпеноиди в екстракта от *I. bifrons* L. В ИЧ спектъра на хлороформения екстракт от *Inula bifrons* е налице абсорбционна ивица при 1750 cm^{-1} , докато такава ивица в ИЧ спектъра на хлороформения екстракт от *I. salicina* отсъства. Това е указание за наличие на сескитерпенови лактони с α -метилен- γ -лактонен пръстен в *I. bifrons*.

ТСХ сравняване в различни подвижни системи на метанолните екстракти на двата вида и визуализиране на ТСХ петна с NP реагент (1%-ен 2-аминоетил естер на дифенилборна киселина в метанол) в присъствие на хлорогенова, 1,5-, 3,5-, 4,5- и 3,4-дикафеоилхинови киселини показва сходство по отношение на основните компоненти, но разлика в тяхното количество.

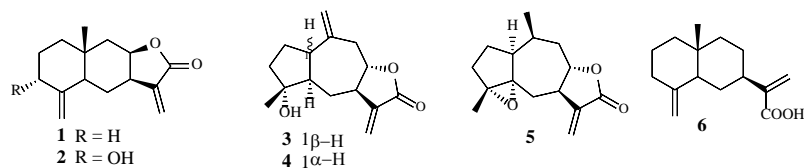
2. Изолиране и структурно охарактеризиране на индивидуални съединения.

На разработване бяха подложени хлороформните екстракти от *I. bifrons* и *I. salicina*, поради наблюдаваните по-съществени разлики в техния химичен състав. За целта, екстрактите бяха подложени на хроматографско фракциониране чрез колонна хроматография върху силикагел със смес от хексан-етилацетат с нарастваща полярност и последващо рехроматографиране чрез КХ и/или ПТСХ на подбрани фракции доведе до изолиране на индивидуалните съединения. За определяне на структурата на изолираните

съединения са използвани спектрални методи (ЯМР, ИЧ, УВ, МС), както и химични трансформации (хидролиза и метилиране).

2.1. Изолиране и идентифициране на сескитерпенови лактони и сескитерпеноиди от *I. bifrons*.

В ИЧ спектрите на пет съединения **1-5** (Фиг. 1) се наблюдава абсорбционна ивица при 1750 cm^{-1} , което е указание за наличие на α -метилен- γ -лактонен пръстен. Това се потвърждава и от техните ^1H ЯМР спектри (Таблица 1), в които се наблюдават сигнали в по-слабо поле δ 6.07-6.24 (H-13) и δ 5.43-5.62 (H-13'). Налице е също и сигнал за характерния карбинолен протон от лактонния пръстен при δ 3.99-4.46 (H-8). Стойностите на константите на спин-спиново взаимодействие $J_{7,8}$, $J_{7,13}$ и $J_{7,13'}$ определят *цис*-свързването на лактонния пръстен в съединения **1-2** и *транс*-свързването му в съединения **3-5**.



Фиг. 1. Сескитерпенови лактони и сескитерпеноиди в *I. bifrons*

^1H ЯМР спектрални данни на **1** и **2** (Таблица 1) са сходни и съответстват на сескитерпенови лактони с ейдесманов скелет (δ 0.76/0.78 s, H-14) и $\Delta^{4,15}$ - двойна връзка (δ 4.39/4.46 d и 4.73/4.93 d, H-15 и H-15'). В ^1H ЯМР спектъра на лактона **2** се наблюдава допълнителен сигнал при δ 4.26, характерен за протон геминален на хидроксилна група. Мястото на последната при C-3 следва от COSY експеримента, а относителната стереохимия при този хирален център е определена от стойностите на константите на спин-спиново взаимодействие, както и от NOESY експеримента. Спектралните данни на съединения **1** и **2** съвпадат с литературните данни за **изоалантолактон** (Klochkov et al., 2006) и **изотелекин** (Herz et al., 1968), съответно.

^1H ЯМР спектралните данни на **3** и **4** (Таблица 1) са много близки, което е указание, че те са от един и същи скелетен тип. Прави впечатление разликата в химичното отместване на H-1 сигнала, както и в сигналите за екзометиленовите протони H-14 и H-

14'. Сигналят Н-1 се явява при 2.10 ppm, а Н-14 и Н-14' – при δ 4.91 и 5.03 в спектъра на съединение **3**, докато в спектъра на съединение **4** – Н-1 сигналят отместен в по-слабо поле при δ 3.05, а Н-14 и Н-14' сигналите са препокрити при δ 5.04. Следователно, двата лактона са изомери. Относителната стереохимия в структурата на лактоните **3** и **4** е определена от стойностите на константите на спин-спиново взаимодействие и от NOESY спектъра. Така, NOESY корелацията Н-1/Н-15 и Н-1/Н-8 в спектъра на **3** показва тяхната *syn*- β -ориентация, т.е. β -Н-1. NOESY взаимодействията Н-1/Н-5 и Н-5/Н-7 в спектъра на **4** определят α -разположението на тези протони. Сравняването на наличните данни с литературни показана, че съединение **3** е **инувисколид** (Mossa et al., 1997; Zdero et al., 1987), а лактонът **4** е **1-епи-инувисколид** (Rustaiyan et al., 1987).

Таблица 1. ^1H ЯМР данни на съединения **1-6** в CDCl_3 (мултиплетност, J в Hz).

| Н | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|
| 1 | 1.20 (m)* | 1.30 (m)* | 2.10 (ddd, 5.9, 10.5, 10.5) | 3.05 (ddd, 9.0, 9.0, 10.5) | 2.52 (brd, 8.9) | 2.24 (m) |
| 1' | 1.54 (m)* | 1.68 (m)* | - | - | - | 1.94 (m) |
| 2 | 1.53 (m)* | 1.78 (m)* | 1.96 (m) | 1.90 (m) | 1.74 (m)* | 1.58 (m) |
| 2' | 1.20 (m)* | 1.78 (m)* | 1.70 (m) | 1.75 (m) | 1.65 (m)* | 1.52 (m) |
| 3 | 1.90 (ddd, 5.2, 12.2, 12.2) | 4.26 (brt, 2.8) | 1.93 (m) | 1.80 (m) | 1.83 (m) | 1.59 (m) |
| 3' | 2.25 (br ddd, 3.8, 3.8, 12.2) | - | 1.62 (m) | 1.83 (m) | 1.68 (m)* | 1.34 (m) |
| 5 | 1.80 (dd, 1.7, 13.1) | 2.38 (br dd, 2.2, 12.8) | 1.71 (m) | 2.18 (m) | - | 1.82 (dd, 1.9, 12.2) |
| 6 | 1.68 (ddd, 1.7, 7.1, 13.1) | 1.68 (m) * | 2.20 (ddd, 2.7, 3.7, 13.3) | 2.01 (m) | 2.02 (dd, 1.9, 14.5) | 1.59 (m) |
| 6' | 1.38 (m) | 1.30 (m) * | 1.20 (m) | 1.08 (m) | 1.90 (dd, 11.5, 14.5) | 1.20 (m) |
| 7 | 2.94 (m) | 2.95 (m) | 2.65 (m) | 2.58 (m) | 2.93 (m) | 2.46 (m) |
| 8 | 4.46 (ddd, 1.7, 4.9, 4.9) | 4.44 (ddd, 4.7, 4.7, 1.7) | 4.27 (ddd, 6.0, 9.3, 10.6) | 4.15 (ddd, 3.8, 9.7, 12.2) | 3.99 (ddd, 3.8, 9.7, 12.2) | 1.61 (m) |
| 8' | - | - | - | - | - | 1.46 (m) |
| 9 | | 2.15 (dd, 1.7, 15.5) | 3.18 (brdd, 6.0, 15.5) | 3.00 (dd, 3.8, 13.1) | 2.23 (ddd, 3.8, 3.8, 12.9) | 1.49 (m) |
| 9' | 1.45 (dd, 4.9, 15.5) | 1.50 (dd, 4.7, 15.5) | 2.50 (dd, 10.6, 15.5) | 2.22 (dd, 9.7, 13.1) | 1.77 (m)* | 1.25 (m) |
| 13 | 6.08 (d, 1.0) | 6.07 (d, 1.1) | 6.18 (d, 3.5) | 6.18 (d, 3.3) | 6.16 (d, 3.4) | 6.24 (brs) |
| 13' | 5.56 (d, 1.0) | 5.53 (d, 1.1) | 5.48 (d, 3.5) | 5.48 (d, 3.2) | 5.43 (d, 3.2) | 5.62 (brs) |
| 14 | 0.78 (s) | 0.75 (s) | 5.03 (brs) | 5.04 (brs) | 0.88 (d, 7.4) | 0.67 (s) |
| 14' | - | - | 4.91 (brs) | 5.04 (brs) | - | - |
| 15 | 4.39 (d, 1.5) | 4.46 (d) | 1.14 (s) | 1.13 (s) | 1.35 (s) | 4.34 (brd, 1.7) |
| 15' | 4.73 (d, 1.5) | 4.93 (d) | - | - | - | 4.64 (brd, 1.7) |

*- припокриващи се сигнали

^1H ЯМР данните на съединение **5** (Таблица 1) са много близки до тези на лактоните **3** и **4**, т.е. принадлежат към един и същ скелетен тип. Липсват обаче сигналите за втора

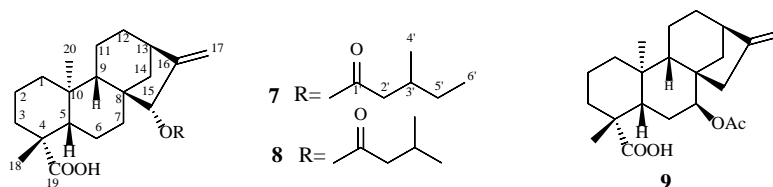
екзометиленова група, както и сигналът за H-5. Вместо това са налице дублет при δ 0.88 за вторична метилна група и синглет при δ 1.35, характерен за третична метилна група, геминална на кислородна функция. COSY, HSQC и HMBC експериментите позволиха приписването на всички сигнали в съединение **5**. Относителната стереохимия следва от NOESY експеримента, в който взаимодействието H-1/H-7 определя α -разположението на тези протони, а H-14/H-15 и H-14/H-8 – тяхната β -ориентация. Спектралните данни на съединение **5** съвпадат с литературните данни за **4,5-епокси-10 α ,14 α H-1-епи-инувисколид** (Momen-Roknabadi et al., 2008).

^1H ЯМР спектралните данни на **6** (Таблица 1) са много близки до тези на лактона **1**, но липсва характерния сигнал за карбинолен протон от лактонната функция. В ^{13}C ЯМР спектъра се наблюдава сигнал за въглерод от карбонилна група при δ 171.9. HMBC взаимодействията на последния с H-7, H-13 и H-13' определят присъствието на COOH група при C-12. Сравняването на спектралните данни с литературни позволи идентифицирането му като познатото съединение **костова киселина (6)** (Sofou et al., 2017).

Всички изолирани сескитерпенови съединения **1-6** се съобщават за първи път в изследвания вид. Литературната справка показва също, че тези съединения са намирани и в други видове *Inula* - *I. helenium*, *I. racemosa*, *I. viscosa* и др. (Seca et al., 2015, 2014)

2.2. Изолиране и идентифициране на дитерпенови киселини от *I. bifrons*

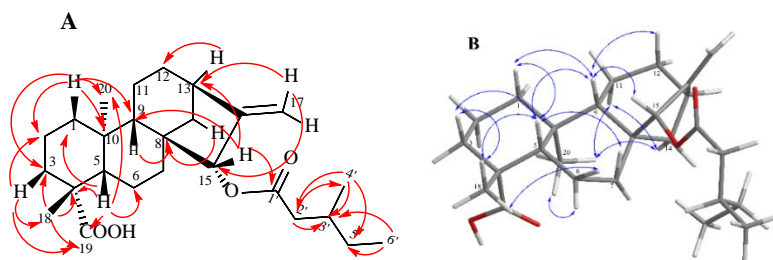
Съединение **7** (Фиг. 2) е изолирано като безцветно маслообразно вещество с ъгъл на въртене $[\alpha]_D^{20} -52^\circ$ ($c=0.4$, CHCl_3). HRESIMS показва $[\text{M}-\text{H}]^-$ с m/z 415.28574, съответстващ на съединение с молекулна формула $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_4$.



Фиг. 2. Дитерпенови киселини в *I. bifrons*

В ^1H , ^{13}C ЯМР (Таблица 2) и HSQC спектри се наблюдават 26 въглеродни сигнала приписани за 4 метилови (2 синглета, дублет и триплет), 11 метиленови, 5 метинови и 6

кватернерни въглерода. Двата кватернерни въглерода при 183.0 и 173.4 са идентифицирани съответно като карбонилен от карбоксилна киселина и естер. Синглетите при δ_H 5.08 и 5.07, въглеродният сигнал при δ_C 109.9 и сигналът за кватернерен въглерод при δ_C 155.6 съответстват на екзометиленова група. Начинът на свързване в молекулата е определен от далечните C/H взаимодействия (Фиг. 3). НМВС корелацията на метилната група при C-18 (δ_H 1.23), H-3 (δ_H 1.01) и H-5 (δ_H 1.09) със сигнала δ_C 183.0 (C-19) определят мястото на карбоксилната група при C-4. НМВС корелацията на метилната група при δ_H 0.95 (H-20) с C-1 (δ_C 40.5), C-5 (δ_C 56.5), C-9 (δ_C 52.8) и C-10 (δ_C 39.8) определя нейното място при C-10. Сигналът при δ_H 5.27 съответства на метинов протон, геминален на естерна група, а неговото място при C-15 следва от COSY взаимодействието на H-15 с екзометиленовия протон при C-17 (δ_H 5.07 и 5.08). НМВС корелацията на H-15 с C-9 (δ_C 52.8), C-13 (δ_C 42.5), C-14 (δ_C 37.2) и карбонилния C-1' (δ_C 173.4) потвърждават позицията H-15 и присъствието на ацилокси групата.



Фиг. 3. По-важни НМВС (А) и NOE (В) взаимодействия в структурата на **7**

Относителната стереохимия е определена от наблюдаваните NOE взаимодействия (Фиг. 3). NOE корелациите H-5/H-9, H-5/H-1 (δ_H 0.83), H-5/H-3 (δ_H 1.01), H-5/H-7 (δ_H 1.24), H-5/H-18, H-18/H-3 (δ_H 1.01), H-18/H-6 (δ_H 1.86), H-9/H-1 (δ_H 0.83), H-9/H-12 (δ_H 1.49) и H-9/H-15 определят β -ориентацията им в *ент*-каурановия скелет, т.е. α -ориентация за ацилокси групата при C-15. В допълнение, NOE взаимодействията на H-20 с H-14 (δ_H 1.96), H-11 (δ_H 1.62) и H-6 (δ_H 1.76) показва, че са те са α -ориентирани. Следователно, съединение **7** е ацилокси производно на *ент*-15 α -хидрокси-каур-16-ен-19-ова киселина. (Bruno-Colmenarez and de Delgado, 2011). Естерната група е определена като 3-метилпентаноилокси (3-метилвалероилокси) от характерните сигнали в 1H ЯМР и ^{13}C ЯМР спектър, COSY и НМВС експериментите (Фиг. 3). По този начин съединение **7** е определено като ново природно съединение и е наименувано като ***ент*-15 α -(3-**

метилпентаноилокси)-каур-16-ен-19-ова киселина. Направената литературна справка показва, че има само няколко изолирани съединения с 3-метилпентаноилокси групи от естествени източници – 3 ереморфилана от *S. praecox* (Bohlmann and Zedero, 1976), оплопаново производно от *L. narynesis* (Gao et al., 2006), 1,10-секо-ейдесманолид от *I. britannica* (Fischedick et al., 2013), 3 лабданови дитерпени от *C. villosum* (Zdero and Bohlmann, 1988) и дитерпенов гликозид от *V. titecaensis* (Bohlmann et al., 1984).

¹H ЯМР и ¹³C ЯМР спектрални данни на съединение **8** (Таблица 2) са много близки до тези на **7**, но се различават по сигналите на естерния заместител. В спектрите на **8** се съдържат сигнали характерни за 3-метилбутаноилокси група. Сравняването на спектралните данни на съединение **8** с литературни позволи идентифицирането му като **ент-15-(3-метилбутаноилокси)-каур-16-ен-19-ова киселина** (Velikova et al., 2000).

Таблица 2. ¹H и ¹³C ЯМР данни на съединения **7-9** в CDCl₃ (*J* в Hz).

| № | 7 | | 8 | | 9 |
|----|---|----------------|-------------------------------|----------------|--|
| | δ _H | δ _C | δ _H | δ _C | δ _H |
| 1 | 1.88 (m)* 0.83 (ddd, 3.5, 12.6, 12.6) | 40.5 | 1.81(m) 0.79 | | 1.82 (m) 0.82 (m) |
| 2 | 1.86 (m)* 1.43 (m)* | 19.0 | 1.78 (m)* 1.36 (m)* | | 1.79(m) 1.39 (m) |
| 3 | 2.16 (brd, 12.6) 1.01 (ddd, 3.5, 12.6, 12.6) | 37.7 | 2.09 (brd, 13.2) 0.94 (m) | | 2.10 (brd, 13.4) 0.98 (td, 4.4, 13.3, 13.3) |
| 4 | - | 43.6 | - | | - |
| 5 | 1.09 (dd, 2.0, 12.0) | 56.5 | 1.03 (dd, 2.1,12.2) | | 1.47 (dd, 7.7, 15.2) |
| 6 | 1.86 (m)* 1.76 (dddd, 3.3, 12.0, 12.0, 12.0) | 20.8 | 1.78 (m)* 1.69 (m) | | 2.03 (m) 2.08 (m) |
| 7 | 1.64 (m)* 1.24 (m) | 34.8 | 1.56 (m)* 1.17 (m) | | 4.75 (s) - |
| 8 | - | 47.4 | - | | - |
| 9 | 1.21 (dd, 2.5, 7.2) | 52.8 | 1.14 (dd, 1.2, 5.9) | | 1.38 (dd, 2.7, 5.5) |
| 10 | - | 39.8 | - | | - |
| 11 | 1.62 (m)* 1.53 (m) | 18.4 | 1.56 (m)* 1.46 (m) | | 1.57 (m)* 1.52 (m) |
| 12 | 1.61 (m)* 1.49 (m) | 32.7 | 1.55 (m)* 1.43 (m) | | 1.57 (m)* 1.41 (m)* |
| 13 | 2.81 (brs) | 42.5 | 2.71 (brs) | | 2.61 (brs) |
| 14 | 1.96 (brd, 12.0) 1.43 (m)* | 37.2 | 1.89 (brd, 11.8) 1.36 (m)* | | 1.82 (dd, 2.2, 10.5) 1.23 (m) |
| 15 | 5.27 (brs) | 82.7 | 5.20 (s) | | - |
| 16 | - | 155.6 | - | | - |
| 17 | 5.07 (brs) 5.08 (brs) | 109.9 | 5.00 (brs) 5.01 (brs) | | 4.74 (brs) 4.69 (s) |
| 18 | 1.23 (s) | 28.7 | 1.16 (s) | | 1.08 (s) |
| 19 | - | 183.0 | - | | - |
| 20 | 0.95 (s) | 15.8 | 0.87 (s) | | 0.89 (s) |
| 1' | - | 173.4 | | | |
| 2' | 2.33 (dd, 6.0, 14.8) 2.11 (dd, 8.3, 14.8) | 41.9 | 2.26 m (2H) | | 2.01 |
| 3' | 1.90 (m) | 31.8 | 1.90 m | | |
| 4' | 1.36 (m)/1.25 (m) | 29.3 | 0.90 d (7.0)* | | |
| 5' | 0.89 (t, 7.2) | 11.3 | 0.90 d (7.0)* | | |
| 6' | 0.94 (d, 6.7) | 19.3 | | | |

*- припокриващи се сигнали

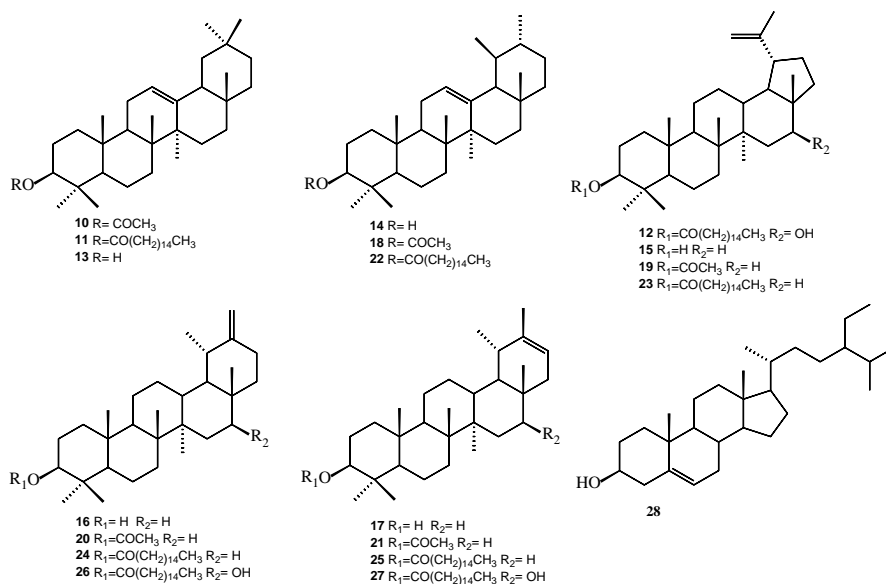
^1H ЯМР и ^{13}C ЯМР спектралните данни на съединение **9** (Таблица 2) са много близки до тези на **7** и **8** показващи, че то е от същия скелетен тип, а именно *ент*-кауранов. В спектрите са налице сигнали за ацетатна естерна група, а наблюдаваните малки различия в сигналите на някои протони определят нейното място при C-7. Това бе потвърдено и от проведените HMBC и NOESY експерименти. Сравняването на спектралните данни с литературни позволи идентифицирането на дитерпеновата киселина **9** като **7 β -ацетоксидент-кауран-16-ен-19-ова киселина** (Fraga et al., 2012).

Литературната справка показва, че дитерпеновите съединения **7-9** се намират за първи път в представители на род *Inula*. Досега, има само няколко съобщения за съдържание на дитерпеноиди в четири вида *Inula* - *I. nervosa* (Yan et al., 2011), *I. cappa* (Wu et al., 2010), *I. japonica* (Ding et al., n.d.; Qin et al., 2009; Yu et al., 2019) и *I. britannica* (Yu Shao et al., 1996). Намерените в *I. japonica* и *I. britannica* дитерпеноиди са също с *ент*-кауранов въглероден скелет, но се различават по природата и мястото на заместителите, а именно те са производни на 17-хидрокси-16 α -*ент*-кауран-19-овата киселина. Изглежда, че дитерпеноидите с *ент*-кауранов скелет са характерни за видовете от род *Inula*. Още повече, *I. bifrons*, *I. britannica* и *I. japonica* принадлежат към секция *Enula*, докато *I. nervosa* и *I. cappa* са представители на секция *Duhaldea* (Anderberg, 1991). Бъдещи позадълбочени фитохимични изследвания са необходими, за да се потвърди или отхвърли тази хипотеза.

2.3. Изолране и идентифициране на тритерпеноиди и стероли от *I. bifrons* и *I. salicina*

От хлороформения екстракт на *I. bifrons* са изолирани тритерпеноидите **β -амирин-3-О-ацетат (10)**, **β -амирин-3-О-палмитат (11)** и **16 β -хидрокси-лупеол-3-О-палмитат (12)**. Тяхната структура бе потвърдена чрез ТСХ сравняване с автентични свидетели, както и чрез сравняване на техните ЯМР и мас-спектрални данни с литературни (Feleke and Brehane, 2005; Kundakovic et al., 2004). При хроматографското разделяне на хлороформения екстракт от *I. salicina* са получени фракции, съдържащи свободни тритерпенови алкохоли, техни ацетати и дълговерижни естери. ТСХ сравняване на тези фракции върху силикагел импрегниран с р-р на AgNO_3 показва присъствие на повече от едно съединение. Фракцията, съдържаща естери с дълговерижни киселини е подложена 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 следните тритерпеноиди в *I. salicina* - β - и α -амирин (**13** и **14**), лупеол (**15**), тараксастерол (**16**), ψ -тараксастерол (**17**), както и техните ацетати (**10**, **18-21**) и палмитати (**11**, **22-25**). В екстракта присъстват и следните 16-хидрокси производни на лупеол (**12**), тараксастерол (арнидиол-3-О-палмитат, **26**), ψ -тараксастерол (фарадиол-3-О-палмитат, **27**). В изследваните екстракти е установено също и присъствието на β -ситостерол **28**, чрез ТСХ сравняване с автентични свидетели, както и чрез ГХ-МС на фракцията, съдържаща съединението. Структурите на съединения **10-28** са представени на Фиг. 4.

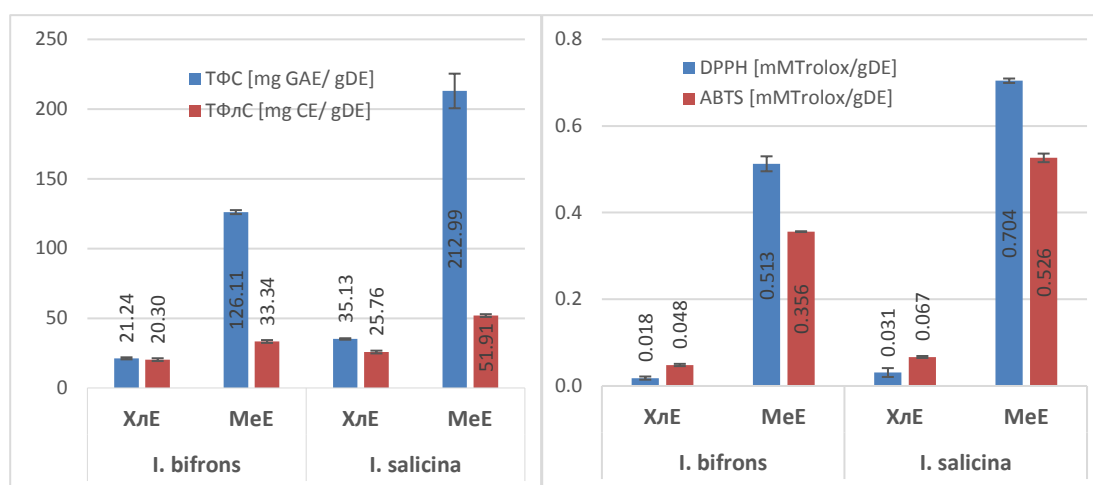


Фиг. 4. Тритерпеноиди и стероли в *I. bifrons* и *I. salicina*

3. Количествено определяне на фенолни съединения в екстракти на *I. bifrons* и *I. salicina* и оценка на техният антиоксидантен потенциал

Известно е, че фенолните съединения и флавоноидите допринасят за цялостния антиоксидантен потенциал на растенията, така че в хлороформните и метанолните екстракти от надземни части на *I. bifrons* и *I. salicina* са определени общото съдържание на фенолни съединения и флавоноиди. Общото съдържание на фенолни съединения в екстрактите е определено с помощта на Folin- Ciocalteu метода (Miliauskas et al., 2004) и е представено като милиграми еквивалент на галовата киселина в 1 г екстракт (mgGAE/gDE). Общото съдържание на флавоноиди в екстрактите е определено по метода

описан от Zhishen (Zhishen et al., 1999) и е представено като милиграми еквивалент на катехин в 1 г екстракт (mgCE/gDE). Получените резултати са представени на Фиг. 5. Количеството на фенолни съединения варира от 21.24 ± 0.73 mg GAE/g DE до 212.99 ± 12.40 mg GAE/g DE, а това на флавоноидни съединения - от 20.30 ± 0.02 mg CE/g DE до 51.91 ± 0.80 mg CE/g DE. Метанолните екстракти на двата вида са по-богати на фенолни съединения и флавоноиди, докато съдържанието на тези два класа съединения в хлороформените екстракти е значително по-малко. Екстрактите от *I. salicina* са по-богати на фенолни съединения и флавоноиди в сравнение с тези от *I. bifrons*.



Фиг. 5. Общо фенолно и флавоноидно съдържание (ляво) и антиоксидантен потенциал (дясно) на екстракти от *I. bifrons* и *I. salicina*

Изследвана е способността на метанолните и хлороформените екстракти да улавят свободните DPPH радикали и ABTS йон-радикали, а техният антиоксидантен потенциал е представен в mM Тролокс еквиваленти на грам сух екстракт (mM Trolox/g DE) (Фиг. 5). За целта са използвани спектрофотометрични методи описани в литературата (Thairong et al., 2006). Антиоксидантния капацитет на изследваните екстракти, измерен по метода DPPH варира от 0.018 ± 0.003 до 0.704 ± 0.005 mMTE/gDE. От фиг. 5 се вижда, че метанолният екстракт от *I. salicina* има най-висока радикал-поглъщаща активност, а най-ниска – хлороформеният екстракт от *I. bifrons*. Антиоксидантния капацитет на изследваните екстракти, измерен по метода на ABTS варира от 0.048 ± 0.002 до 0.526 ± 0.002 mM TE/g DE. Най-висока радикал-поглъщаща активност отново има пробата

от *I. salicina*. Присъствието на хлорогенова киселина, 1,5-, 3,5-, 4,5- и 3,4-дикафеоилхинови киселини в метанолните екстракти, доказано чрез ТСХ, вероятно допринася за по-добрия антиоксидантен потенциал на тези екстракти.

Изводи/Обобщение

1. За първи път е изследван фитохимичният състав на *Inula bifrons* и *I. salicina* от български произход.

2. От хлороформения екстракт получен от надземните части на *I. bifrons* са изолирани и идентифицирани 13 съединения: пет сескитерпенови лактона, ейдесманова киселина, три дитерпенови киселини, три тритерпеноида и β -ситостерол. Всички съединения се откриват за първи път в изследвания вид, а едно от тях *ent*-15 α -(3-метилпентаноилокси)-кау-16-ен-19-ова киселина е новооткрито природно съединение.

3. За разлика от сескитерпеновите лактони, които са характерни компоненти за видовете от род *Inula*, присъствието на дитерпенови съединения е необичайно. Досега дитерпеноиди са намирани само в четири вида от род *Inula*: *I. nervosa*, *I. cappa*, *I. japonica* и *I. britannica*. Прави впечатление, че *I. japonica*, *I. britannica* и *I. bifrons*, които принадлежат към секция *Enula*, продуцират дитерпенови киселини от *ent*-кауранов тип, за разлика от *I. nervosa* и *I. cappa* от секция *Duhaldea*, продуциращи неоклероданови и абиеатанови дитерпеноиди. Бъдещи по-задълбочени фитохимични изследвания са необходими, за да се потвърди или отхвърли тази хипотеза.

4. В хлороформения екстракт получен от надземни части на *I. salicina* е установено наличието на тритерпенови съединения. ГХ-МС на фракции, съдържащи този тип съединения позволи идентифицирането на 15 тритерпеноида от α - и β -амиринов, лупеолов, тараксастеролов и ψ -тараксастеролов тип – алкохоли, техни 3-О-ацетати и 3-О-палмитати, както и на 16-хидроксилупеол-3-О-палмитат, арнидиол-3-О-палмитат и фарадиол-3-О-палмитат. Всички съединения се откриват за първи път в изследвания вид.

5. Най-високо съдържание на тотални фенолни съединения и флавоноиди е намерено в метанолен екстракт от *I. salicina*, а най-ниско - в хлороформения екстракт от *I. bifrons*.

6. Установено е, че метанолните екстракти получени от надземни части на *I. salicina* и *I. bifrons* притежават по-добър антиоксидантен потенциал спрямо DPPH \bullet и ABTS \bullet^{+} от

съответните хлороформни екстракти. Получените резултати корелират с общото фенолно и флавоноидно съдържание на тези екстракти. Присъствието на хлорогенова киселина, 1,5-, 3,5-, 4,5- и 3,4-дикафеоилхинови киселини в метанолните екстракти, доказано чрез ТСХ сравняване със стандарти, вероятно допринася за по-добрия антиоксидантен потенциал на тези екстракти.

7. Получените резултати показват както прилика, така и съществена разлика във фитохимичния профил на двата изследвани вида. Обща характеристика за *I. salicina* и *I. bifrons* е присъствието на пентациклични тритерпеноиди. Разликата се състои в това, че *I. bifrons* съдържа сескитерпенови лактони и дитерпенови киселини, каквито съединения не са намерени в *I. salicina*.

Публикации и участия на научни форуми

1. 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 (D) 168-173.

http://bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_52_Special_D_2020/BCC-52-D-2020-168-173-Trendafilova-B28.pdf

2. Ivanova, V., Todorova, M., Aneva, I., Nedialkov, P., Trendafilova, A., 2020. A new *ent-kaur-16-en-19-oic* acid from the aerial parts of *Inula bifrons*, Biochemical Systematics and Ecology, 93, 104141 <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104141> Q3

В.Иванова

Дата: 03. 02. 2021

Изготвил: ...Виктория Иванова

Приложение 1: Използвана литература

- Anderberg, A.A., 1991. Taxonomy and phylogeny of the tribe Inuleae (Asteraceae). *Plant Syst. Evol.* 176, 75–123. <https://doi.org/10.1007/BF00937947>
- Bohlmann, F., Zedero, C., 1976. Natürlich vorkommende Terpen-Derivate, LVI: Neue Furanoeremophilane aus mexikanischen Senecio-Arten. *Chem. Ber.* 109, 819–825. <https://doi.org/10.1002/cber.19761090304>
- Bohlmann, F., Zedero, C., King, R.M., Robinson, H., 1984. Epoxycannabinolide und Diterpene mit neuem Kohlenstoffgerüst aus *Villanova titicaensis*. *Liebigs Ann. der Chemie* 1984, 250–258. <https://doi.org/10.1002/jlac.198419840207>
- Bruno-Colmenarez, V., de Delgado, D., 2011. *Avances en Química*. redalyc.org 6, 16–20.
- Ding, L., Wang, K., Wang, H., materials, W.T.-... medicinal, 2016, undefined, n.d. Chemical Constituents of *Inula japonica*. europepmc.org.
- Feleke, S., Brehane, A., 2005. Triterpene compounds from the latex of *Ficus sur* I. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 19, 307–310. <https://doi.org/10.4314/bcse.v19i2.21137>
- Fischedick, J.T., Pesic, M., Podolski-Renic, A., Bankovic, J., De Vos, R.C.H., Perić, M., Todorović, S., Tanic, N., 2013. Cytotoxic activity of sesquiterpene lactones from *Inula britannica* on human cancer cell lines. *Phytochem. Lett.* 6, 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.02.006>
- Fraga, B.M., Bressa, C., González-Vallejo, V., González, P., Guillermo, R., 2012. Biotransformation of ent-kaur-16-ene and ent-trachylobane 7 β -acetoxy derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*). *Phytochemistry* 81, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.05.024>
- Gao, X., Lin, C.-J., Xie, W.-D., Shen, T., Jia, Z.-J., 2006. New Oplopane-Type Sesquiterpenes from *Ligularia narynensis*. *Helv. Chim. Acta* 89, 1387–1394. <https://doi.org/10.1002/hlca.200690138>
- Herz, W.H., Subramaniam, P.S., Geissman, T.A., 1968. 3-Episotelekin from *Gaillardia aristata* Pursh. and the structure of farinosin. *J. Org. Chem.* 33, 3743–3749. <https://doi.org/10.1021/jo01274a013>
- Klochkov, S.G., Afanaseva, S. V., Pushin, A.N., 2006. Acidic isomerization of alantolactone derivatives. *Chem. Nat. Compd.* 42, 400–406. <https://doi.org/10.1007/s10600-006-0166-7>
- Kundakovic, T., Fokialakis, N., Magiatis, P., Kovacevic, N., Chinou, I., 2004. Triterpenic derivatives of *Achillea alexandri-regis* Bornm. & Rudski. *Chem. Pharm. Bull.* 52, 1462–1465. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.1462>
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007>
- Momen-Roknabadi, N., Gohari, A.R., Monsef-Esfahani, H.R., Attar, F., Hajiaghvaei, R., Saeidnia, S., Jamalifar, H., Kamalinia, G., Shahverdi, A.R., 2008. Antifungal and antibacterial activities of *Pentstemon divaricatus* and its active constituent. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 63, 649–652. <https://doi.org/10.1515/znc-2008-9-1006>
- Mossa, J.S., El-Ferally, F.S., Muhammad, I., Zaw, K., Mbwapo, Z.H., Pezzuto, J.M., Fong, H.H.S., 1997. Sesquiterpene lactones and thymol esters from *Vicicia pentstemon*. *J. Nat. Prod.* 60, 550–555. <https://doi.org/10.1021/np960506o>
- Qin, J.J., Zhu, J.X., Zhang, W.D., Zhu, Y., Fu, J.J., Liu, X.H., Jin, H.Z., 2009. A new ent-kaurane type diterpenoid glycoside from *Inula japonica* Thunb. *Arch. Pharm. Res.* 32, 1369–1372. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-2004-5>
- Rustaiyan, A., Jakupovic, J., Chau-Thi, T. V., Bohlmann, F., Sadjadi, A., 1987. Further sesquiterpene lactones from

- the genus *Dittrichia*. *Phytochemistry* 26, 2603–2606. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83887-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83887-X)
- Seca, A.M.L., Grigore, A., Pinto, D.C.G.A., Silva, A.M.S., 2014. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses. *J. Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.010>
- Seca, A.M.L., Pinto, D.C.G.A., Silva, A.M.S., 2015. Metabolomic profile of the genus *Inula*. *Chem. Biodivers.* <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400080>
- Sofou, K., Isaakidis, D., Spyros, A., Büttner, A., Giannis, A., Katerinopoulos, H.E., 2017. Use of costic acid, a natural extract from *Dittrichia viscosa*, for the control of *Varroa destructor*, a parasite of the European honey bee. *Beilstein J. Org. Chem.* 13, 952–959. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.96>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19, 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Velikova, M., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., Marcucci, M.C., 2000. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia* 71, 693–696. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00213-6](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00213-6)
- Wu, Z.-J., Shan, L., Lu, M., Shen, Y.-H., Tang, J., Zhang, W.-D., 2010. Chemical constituents from *Inula cappa*. *Chem. Nat. Compd.* 46, 298–300. <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9595-4>
- Yan, L., Cheng, X.R., Zeng, Q., Qin, J.J., Zhang, W.D., Jin, H.Z., 2011. Phytane and neoclerodane diterpenes from the aerial parts of *Inula nervosa* Wall. *Biochem. Syst. Ecol.* 39, 700–703. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.06.001>
- Yu Shao, Nai-Shen Bai, Bing-Nan Zhou, 1996. Kaurane glycosides from *Inula britannica*. *Phytochemistry* 42, 783–786. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00878-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00878-0)
- Yu, Z.-P., Yu, J.-H., Zhang, J.-S., Yu, S.-J., Zhang, H., 2019. Inunicosides A–K, rare polyacylated ent-kaurane diterpenoid glycosides from the flowers of *Inula japonica*. *Tetrahedron* 75, 130732. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.130732>
- Zdero, C., Bohlmann, F., 1988. Macrolide diterpenes and other ent-labdanes from *corymbium villosum*. *Phytochemistry* 27, 227–231. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80620-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80620-4)
- Zdero, C., Bohlmann, F., King, R.M., Robinson, H., 1987. Sesquiterpene lactones from *Bedfordia arborescens*. *Phytochemistry* 26, 1207–1209. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82383-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82383-3)
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)