Българска академия на науките
Институт по органична химия с Център по фитохимия

БОРЯНА СТОЙКОВА ТРУШЕВА

ХИМИЧЕН СЪСТАВ И БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ПРОПОЛИС ОТ РАЗЛИЧНИ ГЕОГРАФСКИ РАЙОНИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за получаване на образователната и научна степен "доктор"

Научна специалност 01.05.10. "Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества"

Научен ръководител:
ст. н. с. I ст. дхн Вася Банкова

Научен консултант:
н. с. I ст. д-р Милена Попова

София, 2006

СПЕЦИАЛИЗИРАН НАУЧЕН СЪВЕТ
ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ И ОРГАНИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ ПРИ ВАК

БОРЯНА СТОЙКОВА ТРУШЕВА

ХИМИЧЕН СЪСТАВ И БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ПРОПОЛИС ОТ РАЗЛИЧНИ ГЕОГРАФСКИ РАЙОНИ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за получаване на образователната и научна степен "доктор"

Научна специалност 01.05.10. "Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества"

Научен ръководител:
ст. н. с. I ст. дхн Вася Банкова

Научен консултант:
н.с. I ст. д-р Милена Попова

Рецензенти:
ст. н. с. I ст. дхн Иванка Костова
доц. д-р Герасим Китанов

София, 2006

Изследванията на дисертационния труд са извършени в Института по органична химия с Център по фитохимия при БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Колоквиума "Химия на природните вещества" при ИОХ-ЦФ, БАН.

Дисертацията съдържа 117 страници, 18 таблици, 1 фигура, 1схема и 2 приложения. Цитирани са 259 литературни източника на кирилица и латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 02.10. 2006 г. от 14.00 часа в зала "Акад. Б. Куртев" на ИОХ-ЦФ при БАН, кв. "Гео Милев", ул. "Акад. Г. Бончев" бл. 9, на открито заседание на Специализирания научен съвет по органична химия и органични технологии при ВАК.

Материалите по защитата се намират на разположение в канцеларията на ИОХ-ЦФ, БАН – стая 206, ул "Акад. Г. Бончев" бл. 9, София

ВЪВЕДЕНИЕ

От най-далечни времена за лечението на различни заболявания хората са използвали пчелни продукти: мед, прополис, пчелна отрова, пчелен прашец, пчелно млечице и восък. От всички тях прополисът, известен още като пчелен клей, е един от най-ценните и дълго време един от най-загадъчните пчелни продукти. Той е сиво-зелен до жълто-кафяв на цвят и представлява смес от растителни метаболити и пчелен восък. Основната му част се биосинтезира от растенията под формата на смоли, с които те се предпазват от гъбички, бактерии, вируси и при травми. У пчелите се е развила способността да откриват най-ефективните за защита растения, от които събират смолистите секрети, смесват ги с восък и получават този смолообразен продукт, наречен прополис. Пчелните семейства го използват за полиране и заздравяване стените на восъчните килийки или други кухини, които те обитават, за запушване на цепнатини и дупки, за стесняване на входа на кошера през есента и най-вече за защита срещу инфекции и заболявания.

От своя страна човек също съумява да използва прополиса като лечебно и профилактично средство. Действието срещу микроорганизми е основна характеристика на пчелния клей и по тази причина употребата му датира още от Древността. За щастие се е оказало, че прополисът притежава не само антибактериално, противоплесенно и противовирусно действия, но и други полезни биологични свойства: противовъзпалително, антитуморно, хепатопротекторно, имуностимулиращо, противоязвено, антиокислително, местнообезболяващо и пр.

В резултат пчелният клей намира широко приложение в народната медицина, в апитерапията, като съставка на т. нар. биокозметика и здравословни храни, но в официалната медицина все още не може да се наложи като лечебно средство и медикамент въпреки ценните си качества и лечебни свойства. Сериозна пречка за това е сложният, разнороден и променлив химичен състав на прополиса, както и недостатъчните познания за активните му компоненти и тяхната биологична активност.

Поражда се необходимостта от по-задълбочени познания за химичния състав на пчелния клей, което през последните десетилетия го превръща в обект на все по-интензивни и многостранни научни изследвания. Освен това този пчелен продукт е привлекателен и като източник на нови биологичноактивни съединения, тъй като представлява биологичноактивен комплекс от вещества с различна структура и разнообразни свойства. В състава на прополиса е установено наличието предимно на полифеноли, както и сескитерпени, дитерпени, аминокиселини и др. Редица резултати сочат, че лечебният му и профилактичен ефект се дължи не на един отделен компонент, а е резултат от съвместното действие на много на брой компоненти.

От друга страна съставът на прополиса се определя от мястото на неговото събиране, тъй като в различните географски и климатични райони се срещат различни прополисоносни растения. Установяването на химичния състав позволява да се определи произходът на прополиса в различни части на света, т. е. да се посочи "типа" прополис според растителния източник. Познаването на източниците е важно за осигуряване на добри условия за отглеждане на пчелите, с оглед получаване на прополис, богат на биологичноактивни вещества.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е изследване на химичния състав и биологичната активност на прополис от различни географски и климатични райони, от където досега проби не са били обект на задълбочени изследвания и техният състав не е проучен добре. Такова изследване дава възможност за търсене на нови биологичноактивни съединения и е необходима предпоставка за пълноценното използване на пчелния клей като лечебно средство. При това е важно да се установят не само основните компоненти, но и повече второстепенни, тъй като се счита, че действието на прополиса се дължи на синергизъм между много на брой негови компоненти.

Съвременната употреба на прополиса във фармацевтични продукти е в известна степен ограничена, поради липсата на стандартизация на прополиса и недостатъчните познания за активните му компоненти. Причината за това е, че прополисът от различни географски и климатични райони има различен химичен състав и разнообразна биологична активност. Ето защо, за да може да се изгради научнообоснована стандартизация на прополиса и неговите продукти, без каквато е немислимо произвеждането на съвременни фармакологични и козметични препарати, са необходими задълбочени познания както за растителните източници, така и за химичния състав и свързаната с него биологична активност на пчелния клей.

Поставени бяха следните задачи:

1. Химичен скрининг на прополис от райони с умерен, субтропичен и тропичен климат чрез ГХ/МС.
2. Изолиране и идентифициране на индивидуални компоненти.
3. Изследване на биологичната активност на прополисови екстракти и изолирани от тях вещества.

СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

1. Прополис

Обект на изследване са проби прополис от Канада, Италия, Венецуела и Бразилия.

2. Разработване на пробите

Прополисът се разработва по начин, показан на Схема 1*.

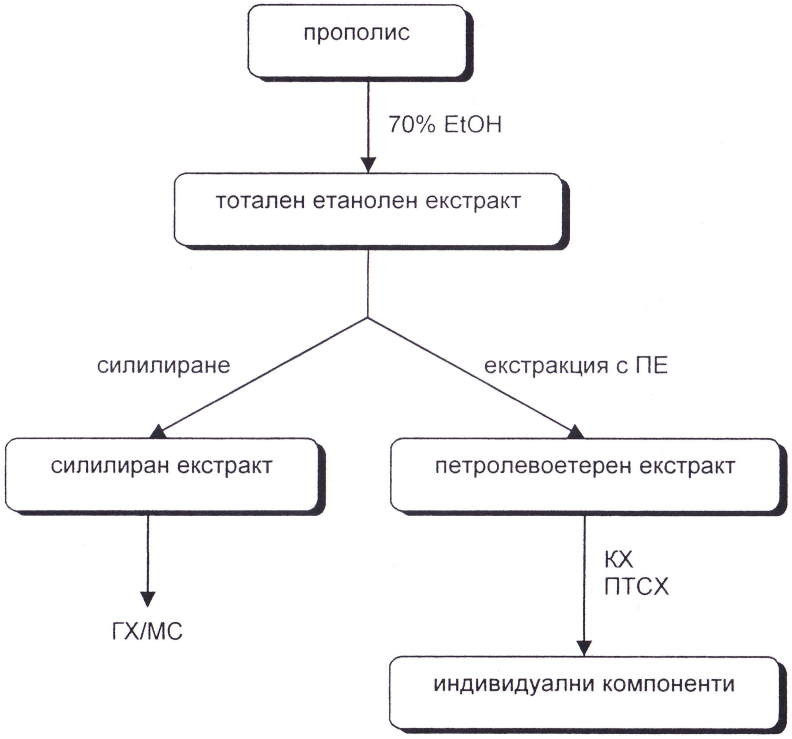


Схема 1

* Номерата на схемите, таблиците и формулите са същите, както в дисертацията.

За структурно охарактеризиране на индивидуалните компоненти са използвани комбинации от спектрални методи УВ, МС, ^{1}Н-ЯМР, ^{13}С-ЯМР, ЯЕО, DEPT, HMQC, HMBC.

3. Изследване на химичния състав на прополис от различни географски райони чрез ГХ/МС

За предварителен анализ на химичния състав прополисовите проби бяха подложени на ГХ/МС изследване след силилиране. Този анализ позволява да се извърши дерепликация и да се установи съдържанието на нови компоненти, чието изолиране и идентифициране би представлявало интерес.

Поради невъзможността някои компоненти да бъдат идентифицирани само с МС, на базата на тяхната МС фрагментация и време на задържане е посочен само структурният им тип.

3.1. ГХ/МС анализ на прополис от Канада

Смолистите секрети от тополовите дървета са основният източник на пчелен клей в умерената зона, като данните от химичния анализ показват ясното предпочитание на пчелите към видове *Populus*, спадащи към секция *Aigeiros*. Прополисът от северните райони на умерената зона, където не се срещат тополи от тази секция, произхожда от други видове тополи. Затова е изследван съставът на прополис от два различни района в Канада, където поради студения климат не растат тополи от секция *Aigeiros*. Химичният състав на етанолните екстракти на две проби (Виктория и Ричмънд) е анализиран чрез ГХ/МС след силилиране. Получените резултати показват значителни различия в химичния им профил (Таблица 3).

Таблица 3. Химичен състав (%) на силилирани тотални етанолни екстракти на прополис от Канада (ГХ/МС данни).

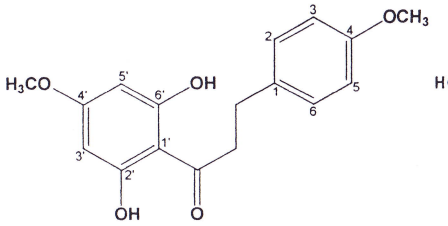
Компонент	% от общия йонен ток	
	Виктория	Ричмънд
Ароматни киселини	**20**	**42**
Бензоена киселина	2	10
Дихидроксиканелена киселина	<1	<1
Z-Канелена киселина	<1	-
E-Канелена киселина	10	9
3-Фенил-3-хидроксипропанова киселина	1	-
Метоксифенилпропанова киселина	1	-
4-Хидроксибензоена киселина	1	-
Z-*p*-Кумарова киселина	-	1
E-*p*-Кумарова киселина (**1**)	3	19
Кафеена киселина (**2**)	-	1
Ферулова киселина (**3**)	1	3
Други ароматни съединения	**18**	**<1**
Бензилов алкохол	<1	<1
4-Хидроксибензалдехид	<1	-
Хидрохинон	1	-
Цинамилов алкохол	<1	<1
p-Хидроксиацетофенон	17	-
Мастни киселини	**<1**	**1**
Олеинова киселина	-	1
Стеаринова киселина	-	<1
Палмитинова киселина	<1	-
Естери	**16**	**9**
Бензил бензоат	2	<1
Бензил метоксибензоат	5	-
Бензил хидроксибензоат	5	-
Бензил дихидроксибензоат	5	-
Бензил Z-*p*-кумарат	<1	<1
Бензил E-*p*-кумарат	1	5
Фенетил *p*-кумарат	-	1
Бензил ферулат	1	2
Бензил кафеат (**9**)	<1	<1
Фенетил кафеат (**10**)	-	<1
Цинамил кафеат	<1	-
Флавоноиди	**1**	**8**
Галангин (**5**)	<1	2
Пиноцембрин (**6**)	<1	2
Пинобанксин (**7**)	<1	1
Пинобанксин-3-О-ацетат (**8**)	-	1
Сакуранетин	-	1

Компонент	% от общия йонен ток	
	Виктория	Ричмънд
Изосакуранетин	-	<1
Алпинон	-	<1
Пиностробин халкон	<1	-
Дихидрохалкони	**7**	**-**
2',6'-Дихидрокси-4`-метоксидихидрохалкон	2	-
2',4',6'-Трихидроксидихидрохалкон	1	-
2',6'-Дихидрокси-4,4'-диметоксидихидрохалкон[a] (**72**)	2	-
2',4',6'-Трихидрокси-4-метоксидихидрохалкон[a] (**73**)	1	-
2',6',4-Трихидрокси-4'-метоксидихидрохалкон[a] (**74**)	1	-
Други	**20**	**28**
Глицерол	-	1
Хексози	8	27
Сескитерпени	12	<1

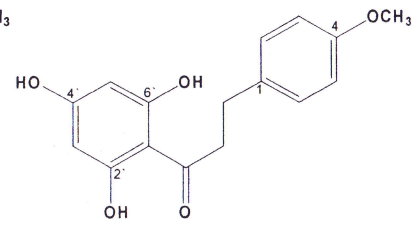
*Данните от таблицата, изразени в проценти, отговарят на площите на съответните пикове спрямо тоталния йонен ток. Те не съответстват на количествения състав на пробата, тъй като корекционните коефициенти, отразяващи отклонението на истинската концентрация от получената с помощта на детектора, за различните вещества са различни.

[a]Компоненти, нови за прополиса

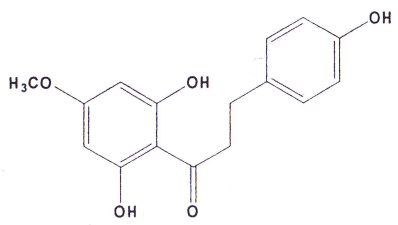
В пробата от Виктория основен компонент е *p*-хидроксиацетофенон заедно с бензилхидроксибензоат, канелена киселина, бензилметоксибензоат и дихидрохалкони. Въз основа на сравнение с автентични МС са идентифицирани три, нови за прополис дихидрохалкона: 2',6'-дихидрокси-4,4'-диметоксидихидрохалкон (**72**), 2',4',6'-трихидрокси-4-метоксидихидрохалкон (**73**) и 2',6',4-трихидрокси-4'-метоксидихидрохалкон (**74**).



72



73



74

Дихидрохалконите са откривани рядко в прополис, при това в ниски концентрации. Характерни са за смолистите пъпки на тополи от секция *Tacamahaca* и следователно това е вероятният източник на пробата. Два вида тополи от тази секция са широко разпространени в Канада: *P. trichocarpa* Torr. et Gray и *P. balsamifera* L. Установено е, че основни компоненти в смолистите секрети на *P. trichocarpa* са *p*-хидроксиацетофенон, бензилхидроксибензоат, канелена киселина и трите дихидрохалкона **72**, **73** и **74**. Тези съединения са основни и в проба Виктория, което определя *P. trichocarpa* като неин растителен източник.

Прополисът от района на Ричмънд се характеризира с високо процентно съдържание на *p*-кумарова и канелена киселина, като ацетофенони и дихидрохалкони напълно отсъстват. Както се очакваше, в пробата липсват и типичните за смолистите пъпки на *Aigeiros* компоненти: серията от пинобанксин-3-О-алканоати и производни на кафеената киселина. Високото съдържание на канелена и *p*-кумарова киселини, съчетано с ниското процентно съдържание на флавоноиди е характерно за тополи от секция *Leuce*, субсекция *Trepidae*. Представител на тази секция, който е най-вероятният растителен източник на

прополис от район Ричмънд, Канада е *P. tremuloides*, широко разпространен в този район.

3.2. ГХ/МС анализ на прополис от Сицилия, Италия

За прополис от страни със субтропичен климат е установен различен и по-сложен химичен състав от този на прополис от умерената зона. С цел изясняване влиянието на климата и съответните растителни източници върху химичния състав на прополис от страни с предимно преходен климат е изследван прополис от района на Сицилия, Италия.

Проведено е ГХ/МС определяне на химичния състав на етанолния екстракт от пробата след силилиране, при което са идентифицирани 21 компонента. Резултатите са представени в Таблица 4.

Таблица 4. Химичен състав (%) на силилиран тотален етанолен екстракт на прополис от района на Сицилия, Италия (ГХ/МС данни).

Компонент	% от общия йонен ток
Алкохоли	**1**
Бензилов алкохол	<1
Глицерол	1
Еритрол	<1
Киселини	**2**
Бензоена киселина	1
Янтарна киселина	<1
Палмитинова киселина	1
Естери	**1**
Пентенилкафеат	<1
Пинобанксинацетат (**8**)	1
Монотерпени	**<1**
Тимол	<1
Дитерпени	**55**
Пимарова киселина (**98**)	1
Изопимарова киселина	1
Комунова киселина (**75**)	11
Хидроксидитерпенова киселина, M=466, (RT=28.4)	12

Компонент	% от общия йонен ток
Хидроксидитерпенова киселина, M=464, (RT=28.9)	29
Маноол (**99**)	1
Флавоноиди	**1**
Галангин (**5**)	<1
Пиноцембрин (**6**)	<1
Захари	**7**
Ксилитол	<1
Глюкофураноза	<1
Глюкоза	<1
Хексози	7

RT - време на задържане, мин.

M - молекулна маса на силилиран компонент

Установен е химичен състав, различен от този на изследваните досега европейски проби прополис. Идентифицирани са дитерпенови киселини, характерни за тропическия пчелен клей, а именно пимарова киселина (**98**) и хидроксикиселини от кауренов тип. Поради липса на референтни спектри в базата данни последните не са окончателно идентифицирани.

Наличието на дитерпенови киселини като основни компоненти в пробата е указание, че прополисът от Сицилия не принадлежи към „тополовия" тип прополис и неговият основен растителен източник остава засега неизвестен.

3.3. ГХ/МС анализ на прополис от Венецуела

Венецуелският пчелен клей е тропически тип прополис, а разнообразието в състава на тропическия прополис е изключително голямо поради богатата и разнообразна тропическа флора. Досега за състава на прополис от Венецуела съществуват само данни от ВЕТХ/МС-анализ. Това ни насочи към изследване на три проби от различни райони на Венецуела (V-1, V-2, V-3), чиито състав първоначално е анализиран чрез ГХ/МС (след силилиране). Резултатите са представени в Таблица 5.

Таблица 5. Химичен състав (%) на силилирани тотални етанолни екстракти от прополис от Венецуела (ГХ/МС данни).

Компонент	% от общия йонен ток на проба		
	V-1	V-2	V-3
Мастни киселини	**1**	**3**	**9**
Олеинова киселина	1	1	1
Стеаринова киселина	-	2	6
Палмитинова киселина	-	-	1
Икозанова киселина	-	-	1
Дитерпени	**19**	**16**	**26**
Дитерпенов алкохол, M=362, (RT=23.1)	18	16	26
Дитерпенова киселина, M=466, (RT=28.1)	1	-	-
Тритерпени	**13**	**13**	**8**
β-Амирин	5	6	2
α-Амирин	4	-	-
Лупеол	1	-	-
Тритерпен, M=498, (RT=37.7)	-	2	2
Тритерпен, M=498, (RT=38.2)	-	2	1
Тритерпен M=498, (RT=38.5)	-	2	1
Метилов естер на тритерпенова киселина, M=674, (RT=40.2)	3	1	2
Бензофенони	**14**	**22**	**20**
Прополон А	3	3	2
Бензофенон, M=362, (RT=23.6)	-	-	3
Бензофенон, M=438, (RT=36.4)	7	5	6
Бензофенон, M=538, (RT=37.1)	-	-	1
Бензофенон, M=452, (RT=37.3)	-	1	1
Бензофенон, M=506, (RT=40.1)	2	10	6
Бензофенон, M=526, (RT=40.5)	2	-	-
Бензофенон, M=506, (RT=41.1)	-	3	1
Захари	**2**	**4**	**1**
Глюкоза	1	2	1
Пентоза, (RT=15.9)	1	-	-
Захари	-	2	-
Други	**4**	**4**	**3**
Бензоена киселина	1	1	1
Етилолеат	-	1	1
Глицерол	3	2	1

RT - време на задържане, мин.

M - молекулна маса на силилиран компонент

Установено е, че трите проби са с много близък химичен състав. Всичките съдържат пренилирани производни на бензофенона, ди- и тритерпени. Поради липсата на референтни спектри, както и факта, че ГХ/МС не е особено подходящ метод за анализ на пренилирани бензофенони, те не са окончателно идентифицирани. Причината е високото им молекулно тегло и специфичната за всеки отделен представител фрагментация. Указание за присъствието на пренилирани бензофенони в пробите обаче е наличието в МС на характерни пикове при m/z 69 и 105, съответстващи на изопренилов и бензоилов остатък.

Данните от ГХ/МС анализ на химичния състав на венецуелските проби прополис показват, че основен източник са смолистите секрети на цветовете на видове *Clusia*, широко разпространени във Венецуела. Доказателство за това е високото процентно съдържание на пренилирани бензофенони, които са характерни компоненти за смолистите секрети на видове *Clusia*. Но наличието и на други основни компоненти, напр. дитерпени, които не влизат в състава на секрети от *Clusia* са указание, че в тези райони на Венецуела съществуват и други неизвестни засега растителни източници на прополис.

3.4. ГХ/МС анализ на червен прополис от Бразилия

Интересът към бразилския прополис, който също е тропически тип, е още по-голям тъй като Бразилия е една от основните производителки и износителки на прополис в света.

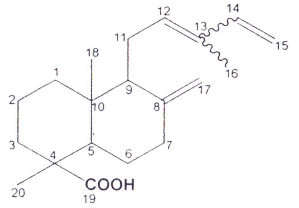
Ние започнахме изследването на червен прополис от Бразилия, за химичния състав на който досега няма данни. Първоначално етанолният екстракт на пробата е подложен на ГХ/МС изследване (след силилиране). Резултатите показват много необичаен химичен състав. Данните не са достатъчно информативни за определяне на химичен профил и са различни от данните за състава на всички изследвани досега бразилски проби прополис. С малки изключения ние не можахме да идентифицираме отделни компоненти само въз основа на ГХ/МС данни. Това ни мотивира да продължим с по-задълбочено изследване и разработване на пробата с оглед изолиране и идентифициране на индивидуални компоненти.

4. Изолиране и идентифициране на индивидуални компоненти

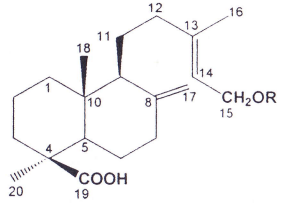
4.1. Компоненти на прополис от Сицилия, Италия

Във връзка с установената антибактериална активност и ГХ/МС резултати започнахме детайлно разработване на проба от Сицилия с цел изолиране и идентифициране на индивидуални компоненти.

От петролевоетерния екстракт чрез последователно използване на КХ и ПТСХ върху силикагел са изолирани четири дитерпена от лабданов тип. От тях три дитерпенови киселини, чиято структура е определена посредством данни от МС, ^{1}Н-ЯМР- и ^{13}С-ЯМР спектри, а стереохимията чрез специфичен ъгъл на оптично въртене. Спектралните им данни съвпадат с публикуваните в литературата за комунова киселина (**75**), изокупресова киселина (**77**) и ацетилизокупресова киселина (**78**).



75



R

77. H

78. CH_3CO

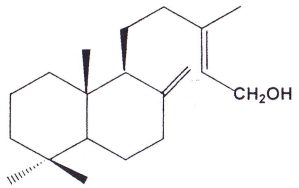
Комунова (**75**), изокупресова (**77**) и ацетилизокупресова (**78**) киселини досега са били изолирани само от бразилски прополис и за първи път се изолират от европейски пчелен клей.

Лабд-8(17),13Е-диен-15-ол (76). Спектрите на съединение **76** са близки до тези на съединение **77**. В ^{1}Н-ЯМР спектър на **76** обаче се наблюдава един допълнителен сигнал за протони от метилова група. Във ^{13}С-ЯМР спектър на

същото съединение липсва сигналът при δ 183.5, което е доказателство за отсъствието на карбонилна група в молекулата.

Измереният специфичен ъгъл на оптично въртене е +10.3°.

Данните от ^{1}H-, ^{13}C- и DEPT спектрите на съединение **76** съответстват на тези, публикувани в литературата за лабд-8(17),13E-диен-15-ол.



76

Дитерпеновият алкохол (**76**) е изолиран от водното растение *Ruppia maritima*, но с отрицателен специфичен ъгъл на оптично въртене. Изолираното от нас вещество **76** показва положителен специфичен ъгъл на оптично въртене и следователно принадлежи към нормалната серия лабдани с показаната във формула **(76)** стереохимия.

Досега съединение **76** е било познато само като синтетичен продукт и за първи път се изолира като природно.

Изолираните дитерпенови киселини **75**, **77** и **78** са откривани досега само в бразилски прополис и предполагаемият им растителен източник са видове *Araucaria*. Тяхното присъствие обаче в европейска проба, произхождаща от изцяло различна екосистема, където не растат видове *Araucaria*, е много изненадващо. Известно е, че комуновата, изокупресовата и ацетилизокупресовата киселини са компоненти, типични за смолистите секрети на различни представители от сем. *Cupressaceae*, към което се отнася и род *Araucaria*. В Средиземноморския район широко разпространени са много кипарисови видове, напр. *Cupressus sempervirens* (италиански кипарис) и *Juniperus phoeniciana* (финикийска хвойна), които растат в Сицилия. Някой от тях вероятно е растителният източник на изследваната проба, но все още не е установено и остава обект на бъдещи изследвания.

4.2. Компоненти на прополис от Венецуела

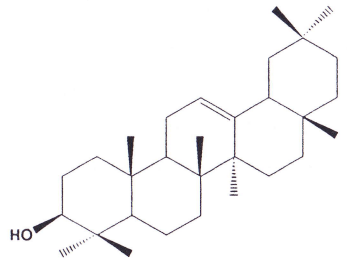
Чрез сравнение на резултати от ТСХ и ГХ/МС анализ на тоталните етанолни екстракти на три проби прополис от различни райони на Венецуела е установено, че имат сходен химичен състав. Липсата на литературни данни за състава и биологичната активност на венецуелския прополис е причина да започнем разработването на пробите V-1, V-2 и V-3 с цел изолиране и идентифициране на индивидуални компоненти. Допълнителна мотивация за по-задълбоченото изследване на посочените проби прополис дадоха и недостатъчно информативните данни от ГХ/МС за съдържащите се в пробите пренилирани бензофенони, за които отдавна е известно, че са биологичноактивни съединения.

4.2.1. Изследване на компоненти от проба V-2

От петролевоетерния екстракт на проба V-2 чрез последователно използване на КХ и ПТСХ са изолирани един тритерпенов алкохол и четири бензофенона, два от които образуват неразделима смес. Структурата на компонентите е определена чрез спектрални методи:

β-Амирин (81). МС на съединение **81** е характерен за тритерпенови алкохоли. Молекулният йон е с m/z 426 и е с ниска интензивност. Базовият пик е с m/z 218.

След ГХ сравнение на съединение **81** (след ацетилиране) с автентична проба, компонентът е идентифициран като β-амирин.



81

(-) Скробикулатон А (79) и (-) скробикулатон В (80). Съединения **79** и **80** са изолирани в смес. Опитът да бъдат разделени чрез ПТСХ бе неуспешен, въпреки значителната разлика в техните R_f-стойности. Спонтанно протича равновесна реакция на превръщането им едно в друго, като равновесието се установява много бързо. Първоначалните предположения бяха за съществуване на кето-енолна тавтомерия, но при опитите двете вещества да бъдат метилирани и ацетилирани с цел прекратяване на взаимното им превръщане, реакции не протекоха. Очевидно равновесието се дължи на друг химичен процес и по тази причина двата компонента са идентифицирани в смес .

В МС на сместа молекулният йон е с m/z 500, а базовият пик с m/z 105, като последният е указание за наличие на бензоилен остатък в молекулата.

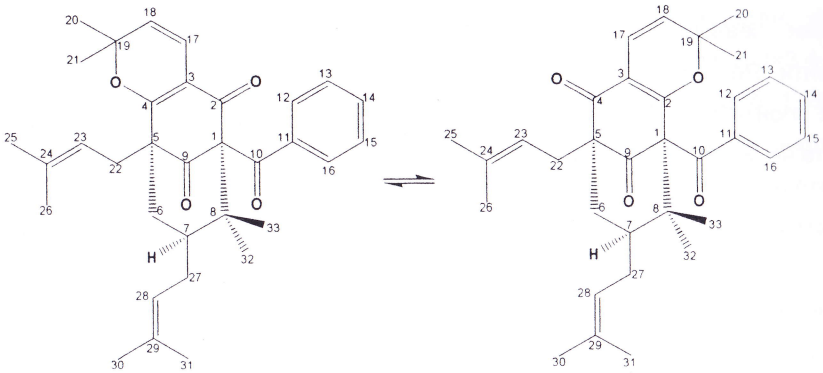
В ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР спектри почти всички сигнали са удвоени, което е указание, че двете съединения са близки по структура изомери. Наблюдават се сигнали за общо 16 метилови групи, осем от които са свързани с sp^2 въглеродни атоми. Това заедно с наличието на мултиплет за четири протона в ^{1}H-ЯМР спектър при δ 5.0 е указание, че всяка от молекулите в сместа съдържа по два пренилни остатъка. В областта на олефиновите протони при δ 5.21, 5.39, 6.44 и 6.47 се наблюдават четири дублета всеки за по един протон с J=10 Hz, съответстващи на протони от две *цис*-двойни връзки, по една във всяка молекула. В областта на ароматните протони в същия спектър присъстват и сигнали за две монозаместени ароматни ядра.

Във ^{13}C-ЯМР спектър в областта δ 189-207 се наблюдават сигнали за общо шест карбонилни въглеродни атома.

Измереният специфичен ъгъл на оптично въртене на сместа от **79** и **80** е -45.6°.

Подробният анализ на спектрите показва, че двата изомера са полиизопренилирани бензофенони, които не съдържат хидроксилна група. Трябва да се отбележи, че структурата на първите идентифицирани съединения от типа на пренилираните бензофенони е установена с помощта на рентгеноструктурен анализ и едва след това е било извършено и отнасяне на сигналите в ЯМР спектрите. Сравнението на нашите резултати с вече

публикувани в литературата спектрални данни (МС, ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР) за (+) скробикулатон А и (+) скробикулатон В потвърждава, че изолираните съединения са смес от (-) скробикулатон А (**79**) и (-) скробикулатон В (**80**) в равновесно съотношение 2:1.



79 **80**

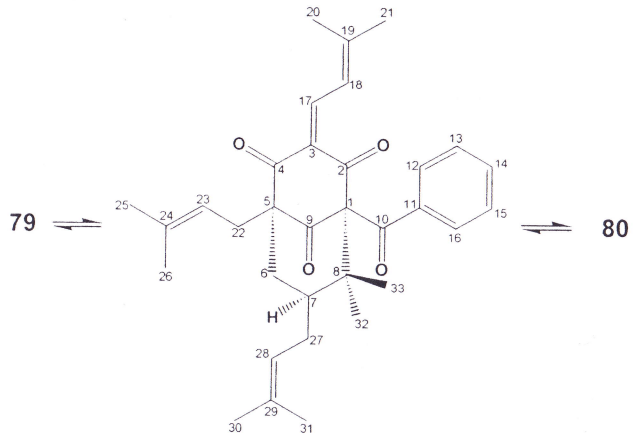
Най-съществената разлика в спектралните данни на двата компонента е резултат от магнитната анизотропия на бензеновото ядро при скробикулатон В (**80**) - протоните от едната метилова група в пирановия пръстен са силно екранирани (δ 0.59), което е указание за посоката на затваряне на пирановия пръстен в молекулата.

Наскоро от бразилското растение *Clusia scrobiculata* също в неразделима смес са изолирани енантиомерите на **79** и **80** съответно (+) скробикулатон А и (+) скробикулатон В. До публикуването на статията (статия №2 от раздел „Публикации във връзка с дисертационната работа") поради невъзможността да бъде измерен $[\alpha]_D$, стереохимията на **79** и **80** е определена изцяло въз основа на пълното съвпадение на всички спектрални данни с тези в литературата, поради което съединения **79** и **80** са описани като (+) скробикулатон А и (+) скробикулатон В, както е в литературата. След публикуването обаче е измерен специфичен ъгъл на оптично въртене -45.6° (c=0.21). Фактът, че по абсолютна стойност той е твърде близък до този измерен от Porto и съавтори (+44.7° при c=0.19) ни дава основание да смятаме,

че съединения **79** и **80** са енантиомери на изолираните от тези автори (+) скробикулатон А и (+) скробикулатон В.

Изолираните от нас (-) скробикулатон А (**79**) и (-) скробикулатон В (**80**) са новооткрити съединения.

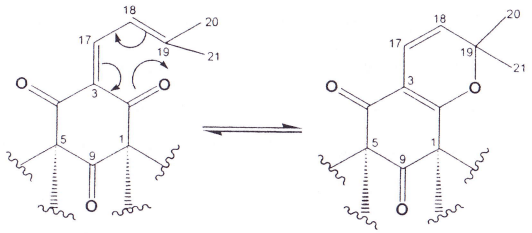
След идентифицирането на двата региоизомера се установи на какво се дължи невъзможността те да бъдат изолирани като индивидуални компоненти. Реакцията на превръщането им един в друг е електроциклена и протича спонтанно с междинното образуване на хинон-метиден интермедиат **79`**, който не може да бъде изолиран.



79 ⇌ **80**

79`

Осъществява се вътрешномолекулна Дилс-Алдерова прегрупировка, описана от Crombie и съавтори за съединения, близки по структура до **79** и **80**.

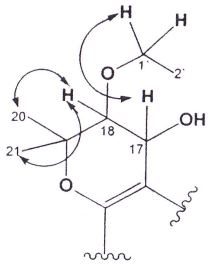


18-Етилокси-17-хидрокси-17,18-дихидроскробикулатон А (82). МС на съединение **82** е сходен с този на сместа от (-) скробикулатони А и В, като молекулният йон е с m/z 562 и отново присъства пик с m/z 105.

^{1}Н-ЯМР спектър наподобява този на скробикулатон А (**79**), следователно съединение **82** е от същия структурен тип. Разликата е, че отсъстват сигнали за олефиновите протони от пирановия пръстен, а се наблюдават два дублета за по един протон, при δ 4.02 и 5.03 с J=3.4 Hz, съответстващи на метинови протони, съседни на О-атоми. При δ 1.13 се наблюдава триплет за три протона, а при δ 3.59 и 3.67 два дублета от квартети с J=7 Hz и J=9 Hz, всеки за по един протон, което е указание за наличието на етилокси група. Липсата на други сигнали в тази област както и масата на молекулния йон показват, че другият заместител е ОН-група.

Във ^{13}С-ЯМР спектър също отсъстват сигналите за sp^2 въглеродните атоми от пирановия пръстен. Вместо тях се наблюдават два сигнала при δ 76.5 и 98.9 и сигналите за допълнителната етилокси група при δ 64.9 и 15.9. От това следва, че в молекулата на съединение **82** има дихидропиранов пръстен със заместители хидроксилна и етилокси група при хидрираната двойна връзка. Останалите сигнали са аналогични на тези във ^{13}С-ЯМР спектър на скробикулатон А.

За да се определят местата на заместителите в дихидропирановия пръстен са проведени ЯЕО - експерименти. Наблюдават се пространствени взаимодействия между Н-18 (δ 4.02) и протоните Н-20 (δ 1.19) и Н-21 (δ 1.21), както и ЯЕО между протоните от метиленовата група на етилокси остатъка (δ 3.59 и 3.67) и Н-17 (δ 5.03) (Фиг. 1), което е указание, че етилокси групата е при С-18. Този извод се подкрепя от пространствената близост на тези протони, наблюдавана при построяване на Драйдинг-модели.

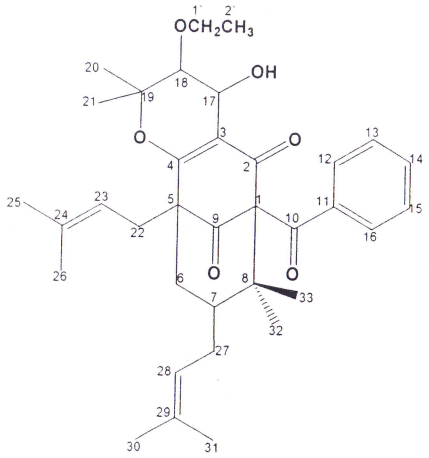


Фиг. 1. ЯЕО-корелации в **82**

Въз основа на представените спектрални данни стереохимията на молекулата не може да бъде определена. От наблюдаващия се ЯЕО между H-17 (δ 5.03) и H-1' (δ 3.59 и 3.67) и липсата на ЯЕО-взаимодействие между H-17 и H-18 може да се направи само заключението, че заместителите при C-17 и C-18 са разположени *транс* спрямо равнината на дихидропирановия пръстен (Фиг. 1).

Измереният специфичен ъгъл на оптично въртене е -56.4°.

След анализ на спектралните данни (1D, 2D ЯМР и МС), както и на ЯЕО взаимодействията съединение **82** е идентифицирано като 18-етилокси-17-хидрокси-17,18-дихидроскробикулатон А.



82

Компонентът **82** е новооткрито съединение.

18-етилокси-17-хидрокси-17,18-дихидроскробикулатон В (83).

Молекулният йон в МС на съединение **83** е с m/z 562 и отново присъства пик с m/z 105.

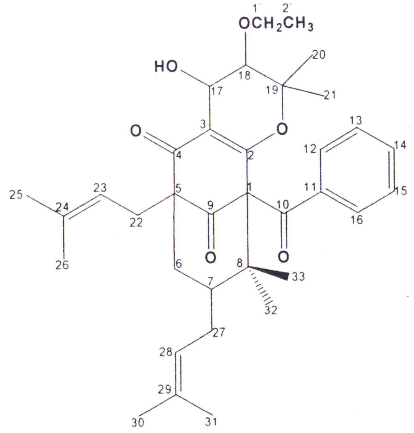
ЯМР-спектрите на съединение **83** (^{1}H-ЯМР, ^{13}C-ЯМР, DEPT, HMQC, HMBC) са сходни с тези на съединение **82**. Единствената разлика е в химичните отмествания на някои сигнали. Във ^{13}C-ЯМР спектър сигналът за C-2 е отместен в по-силно поле при δ 174.8, защото е четвъртичен, а този за C-4-в по-слабо поле при δ 190.4, защото е карбонилен, в сравнение със същите във ^{13}C-ЯМР спектър на **82**.

В ^{1}H-ЯМР на съединение **83** сигналът за протоните на едната метилова група в дихидропирановия пръстен е отместен в по-силно поле при δ 0.83, което е указание за посоката на затваряне на пръстена, обратна на тази в **82**.

При ЯЕО - експеримента се наблюдават аналогични на **82** пространствени взаимодействия.

Измереният специфичен ъгъл на оптично въртене е 0°.

След подробен анализ на МС, 1D и 2D ЯМР спектрите (HMQC, HMBC и ЯЕО) на съединение **83**, както и сравнение с данните за съединение **82** и скробикулатон В, съединение **83** е идентифицирано като 18-етилокси-17-хидрокси-17,18-дихидроскробикулатон В.



83

Съединение **83** досега не е описано в литературата.

Засега растителният източник на прополис в тропическите гори на Венецуела остава неизвестен, но компонентите **79, 80, 82** и **83** могат да послужат като хемотаксономичен маркер при определяне на основния прополисоносен вид в тези райони.

4.2.2. Изследване на компоненти от проба V-1

От метилирания петролевоетерен екстракт на проба V-1 чрез последователно използване на КХ и ПТСХ са изолирани съединения **79**, **80**, **82**, **83**, останали непроменени и още един бензофенон (-) 2-О-метилнеморозон **(84)**. Структурата им е определена посредством спектрални методи.

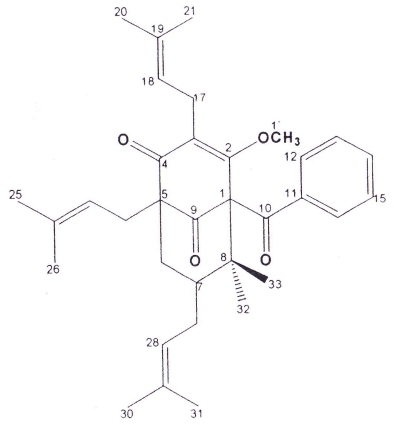
(-) 2-О-Метилнеморозон (84). ^{1}Н-ЯМР спектър на **84** е сходен с този на съединения **79** и **80**, но липсват сигналите за олефиновите протони от пирановия пръстен. Вместо тях присъства мултиплет при δ 4.92 за един протон, който заедно с наличието на два дублета от дублети, всеки за по един протон при δ 3.18 и 3.24 е указание за наличие на още един пренилен остатък в молекулата. Наблюдава се и синглет за три протона при δ 3.39, съответстващ на метоксилна група.

Във ^{13}С-ЯМР спектър присъстват сигнали за общо 34 С-атоми, три от които карбонилни при δ 193.1, 197.1 и 207.9.

Мястото на метоксилната група е определено при С-2 от наблюдаваното далечно взаимодействие в HMBC спектъра на **84** между Н' (δ 3.39) и С-2 (δ 170.0).

Измереният специфичен ъгъл на оптично въртене е -110.8°.

Въз основа на тези спектрални данни и сравнението им с публикуваните в литературата съединение **84** е идентифицирано като (-) 2-О-метилнеморозон.



84

Съединение **84** е артефакт, получен в резултат на метилирането на пробата, но показва наличието на неморозон в изследвания прополис. Това е първото съобщение за изолиране от природен продукт на съединение със скелета на неморозон (**54**) с отрицателен специфичен ъгъл на оптично въртене. Вече познатите природни съединения неморозон и неговите метоксилни производни са с положителен ъгъл на оптично въртене. Те са характерни компоненти на смолистите секрети по цветовете на *Clusia rosea*, растителният източник на кубинския червен прополис, в който неморозон е един от основните компоненти. Растителният източник на проба V-1 обаче очевидно е друг и засега остава неизвестен.

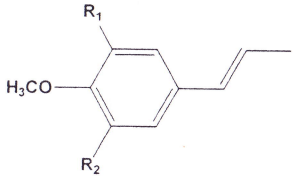
4.3. Компоненти на бразилски червен прополис

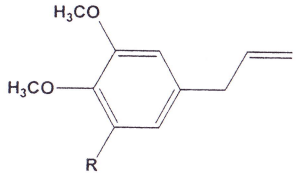
Досега в Бразилия са известни 12 типа прополис. От тях най-добре проучен е т. нар. "зелен прополис". Известно е, че червеният прополис (наименованието произлиза от червения цвят на пробата) е характерен за Куба и Венецуела и досега няма данни за химичния състав на бразилски червен прополис. Данните от ГХ/МС сочат за наличие на компоненти, различни от тези на всички изследвани досега проби прополис. Всичко това ни насочи към

изследване и разработване именно на такава проба пчелен клей - червен прополис от Бразилия, която се отнася към един нов тип бразилски прополис.

Петролевоетерният екстракт на пробата е подложен на разделяне чрез КХ. След допълнително пречистване чрез ПТСХ върху силикагел са изолирани две терпенови смеси, една смес от пренилираните бензофенони ксанточимол и гутиферон Е, както и четири индивидуални съединения. Структурата им е определена чрез спектрални методи (ГХ/МС и/или ЯМР).

Смес от производни на фенилпропена. След направения ГХ/МС анализ на сместа и последващо МС сравнение с автентични проби съединенията са идентифицирани като *транс*-анетол **(85)**, метилевгенол **(86)**, *транс*-метилизоевгенол **(87)**, елемицин **(88)** и *транс*-изоелемицин **(89)**.



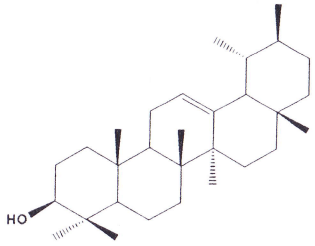


	R_1	R_2
85.	H	H
87.	OCH_3	H
89.	OCH_3	OCH_3

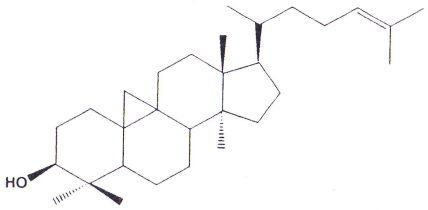
	R
86.	H
88.	OCH_3

Смес от тритерпенови алкохоли. В МС на всеки от тях молекулният йон е с m/z 426.

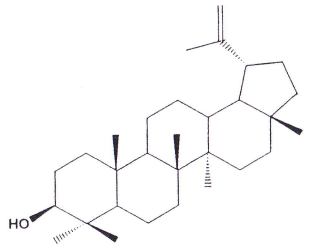
След сравнение с библиотечни МС и с автентична проба съединенията в тази смес са идентифицирани като **β-амирин (81)** (точка 4.2.1.), **α-амирин (92)**, **циклоартенол (93)** и **лупеол (94)**.



92



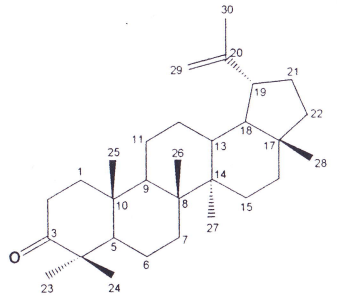
93



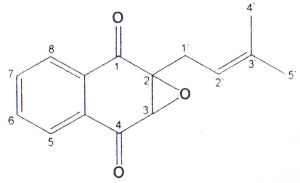
94

Тритерпеновите алкохоли са характерни за бразилския прополис.

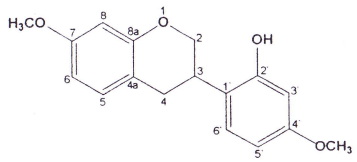
Останалите изолирани компоненти са един тритерпенов кетон, един нафтохинон, един изофлавоноид, един птерокарпан и смес от два пренилирани бензофенона. Структурата им е определена посредством данни от МС, ^{1}H-ЯМР, ^{13}C-ЯМР и HMBC спектри. Спектралните им данни съвпадат с публикуваните в литературата за 20(29)-лупен-3-он (**90**), 2,3-епокси-2-(3-метил-2-бутенил)-1,4-нафталендион (**91**), *рац* - изосативан (**61**), (6aS, 11aS) - медикарпин (**95**) и смес от ксанточимол (**96**) и гутиферон Е (**97**).



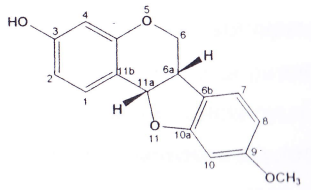
90



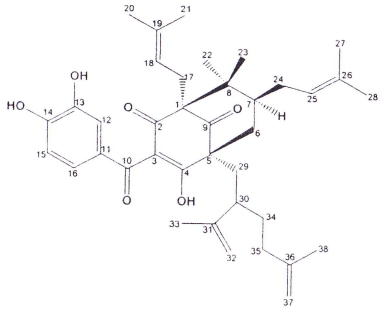
91



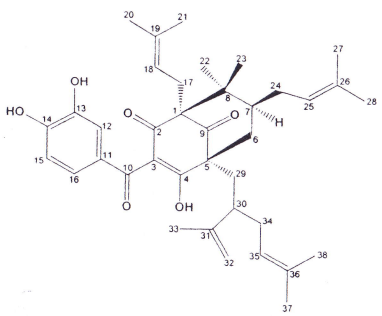
61



95



96



97

Съединения **61**, **95**, **96** и **97** наскоро се изолират за първи път от кубински червен прополис. Съединенията **85** - **90** се откриват за първи път в прополис, а съединение **91** се изолира за първи път от природен източник.

Изолирането и идентифицирането на някои от компонентите на изследвания червен прополис още веднъж потвърждава факта за много необичайния му и силно разнороден химичен състав и с основание изследваният прополис може да бъде причислен към един нов тип – т. нар. бразилски червен прополис.

5. Биологична активност на прополис

Прополисът е естествената защита на кошера срещу инфекции, поради което е обект на разнопосочни биологични изследвания. Определянето на биологичната активност и познаването на отговорните за нея компоненти е от значение за търсенето на нови биологично активни вещества, както и за стандартизацията на прополиса, основаваща се на тяхното количествено определяне.

Получените в хода на настоящата работа резултати ни дават възможност да сравним химичния състав на прополис с различен географски произход, както и да посочим някои негови растителни източници. С оглед изясняване на въпроса влияят ли разликите в химичния състав върху

биологичната активност, както и за определяне на активността на някои от изолираните съединения, бе необходимо провеждане и на биологични тестове. На тези биологични тестове са подложени тоталните 70% етанолни и петролевоетерните екстракти, както и някои от изолираните компоненти.

Проведени са тестове за определяне на цитотоксичното действие, антибактериалната, противогъбичната и антирадикаловата активност на прополиса.

5.1. Антимикробна активност на прополисови екстракти и изолирани от тях компоненти

Изследванията за антимикробна активност са свързани с определяне активността на прополиса спрямо *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

Candida albicans е най-масовият причинител на хронични кандидози в човешкия организъм. Обикновено тази гъбичка участва в патогенезата на различни заболявания в синергизъм с бактериите, намиращи се в микрофлората, най-често със *Staphylococcus aureus*. По тази причина антикандидните агенти е желателно да инхибират също и растежа на тази бактерия.

По тази причина част от прополисовите екстракти и изолираните съединения са предоставени за определяне на противогъбичната и антибактериалната им активности срещу тези микроорганизми и срещу *Escherichia coli* в Институт по микробиология, БАН.

Изследванията са проведени по агар-дифузионния метод и никоя от тестваните проби не показа активност спрямо грам-отрицателната *E. coli*. На някои е определена и минимална инхибираща концентрация (МИК).

Съгласно получените резултати тестваните екстракти не проявяват активност спрямо *C. albicans,* но етанолният екстракт на I-3 потиска развитието на *S. aureus*. Действието на италианския прополис вероятно се дължи на наличието на дитерпенови киселини, за които е известно, че притежават добра антибактериална активност. Доказателство за това са много високите стойности

за диаметъра на зоната на инхибиране (31±1) на изолираните от проба I-3 дитерпенови киселини: изокупресова (**77**) и ацетилизокупресова (**78**), които проявяват много силна антибактериална активност.

Единственият компонент, който проявява изключително добра противогъбична активност спрямо *C. albicans* е изолираният от бразилския червен прополис птерокарпан **95**, който потиска и развитието на *S. aureus*. Това се очаква, тъй като по начало птерокарпаните влизат в състава на т. нар. фитоалексини, които растенията биосинтезират за защита срещу инфекции и механични наранявания. Вероятно това вещество обуславя и антибактериалната активност на петролевоетерния екстракт на бразилския прополис, за която също така допринасят и пренилираните бензофенони ксанточимол и гутиферон Е.

Поради сходството в химичния състав от трите проби венецуелски прополис е тествана само една и резултатите са доста противоречиви. Стойността на МИК на етанолния и петролевоетерния екстракти е указание за наличие на умерено висока антибактериална активност. От друга страна диаметърът на зоната на инхибиране и за двата екстракта е 0, което е указание за липса на такава активност. Предполага се, че причина за последното е невъзможността сравнително големите молекули на пренилираните бензофенони да дифундират в хранителната среда, в която се развиват бактериите.

5.2. Антирадикалова активност на прополисови екстракти и изолирани от тях компоненти

През последните години усилията на много учени са насочени към по-задълбоченото изследване и овладяване на оксидантния стрес, тъй като той е в основата на голям брой социално значими заболявания. Причинители на оксидантния стрес са свободните радикали, които предизвикват клетъчното разграждане и стареене. Веществата, способни да неутрализират тези силно активни агенти, се наричат „гасители" на свободни радикали. В литературата

вече има много съобщения, че такива свойства притежават различни прополисови екстракти и техни компоненти.

Това ни насочи към изследване на антирадикаловата активност на част от получените екстракти и изолирани от тях съединения по метод, описан от Nenadis и съавтори. Същността на метода се състои в измерване абсорбцията на чист разтвор на свободен радикал DPPH· и сравняване с абсорбцията на същия разтвор, към който е добавено и тестваното вещество. В присъствието на вещества, притежаващи изследваната активност, абсорбцията следва да намалява. При една и съща концентрация дадено вещество има толкова по-висока антирадикалова активност, колкото по-голямо намаление на абсорбцията предизвиква. Задължително се използва положителна контрола.

От изследваните екстракти много добра активност, съизмерима с тази на кафеената киселина, показват етанолните екстракти от канадския и венецуелския прополис.

Най-вероятно отговорни за антирадикаловата активност на канадските проби са съдържащите се в тях фенолни компоненти. В проба Ричмънд това са флавоноиди и фенолни киселини, а в проба Виктория освен тези съединения се съдържат и флавоноиди с отворена верига - дихидрохалкони, които са известни гасители на свободни радикали.

Въпреки сходния си химичен състав етанолните екстракти на V-1, V-2 и V-3 показват различна степен на инхибиране на DPPH . Това вероятно се дължи на различното количествено съотношение на съдържащите се в тях вещества. Липсата на антирадикалова активност на сместа от съединения **79** и **80**, съдържаща се и в трите проби е указание, че те нямат принос към много добрата активност на екстрактите. За съжаление малките количества от **82** и **83** не позволиха те да бъдат тествани.

От изследваните индивидуални компоненти антирадикалова активност показва само сместа от пренилираните бензофенони **96** и **97**, изолирана от петролевоетерния екстракт на бразилския прополис, който като цяло е практически неактивен.

5.3. Цитотоксична активност на прополисови екстракти и изолирани от тях компоненти

Цитотоксичното действие на пчелния клей се определя чрез опити за определяне на токсичността му спрямо ларви на *Artemia salina*. Това е често използван метод за предварителен скрининг, тъй като ларвите са чувствителни към вещества с цитотоксично действие. За оценка на активността се използва броят умрели ларви при различни концентрации на веществата и посредством компютърна програма се изчислява средната летална концентрация. Този метод може да служи като първоначален тест , преди изпитанията върху клетъчни линии и в in vivo системи.

Най-добра цитотоксичност показват етанолните екстракти от венецуелските проби V-1 и V-2. Вероятно тази активност се дължи на съдържащите се в тях пренилирани бензофенони, които са известни с антитуморните си свойства. Умерено цитотоксично действие има петролевоетерният екстракт на италианския прополис, от който е изолирано съединение **76**, проявяващо най-силна цитотоксичност от всички тествани екстракти и компоненти.

Получените резултати от проведените биологични тестове още веднъж потвърждават вече установения факт, че прополисът притежава много ценни фармакологични свойства, независимо от различния си географски произход и химичен състав.

Обобщение на резултатите

1. Изследван е химичният състав и са установени растителните източници на "тополов" тип прополис от райони, извън ареала на разпространение на черната топола *Populus nigra*:
   - **1.1.** В канадски прополис от Ричмънд чрез ГХ/МС са идентифицирани *p*-кумарова и канелена киселини, техни естери и някои флавоноиди, доказващи, че растителният източник на пчелен клей в този район е *Populus tremuloides*.
   - **1.2.** В канадски прополис от Виктория чрез ГХ/МС са идентифицирани *p*-хидроксиацетофенон, канелена киселина и дихидрохалкони. Три от дихидрохалконите са нови за прополиса. Като растителен източник е посочен *Populus trichocarpa*.
2. Изследван е химичният състав на прополис от субтропичен район (южна Италия), в който чрез ГХ/МС са идентифицирани дитерпенови киселини, компоненти, намирани досега само в тропичен прополис. От пробата са изолирани и идентифицирани 4 индивидуални съединения. От тях:
   - Един дитерпенов алкохол от лабданов тип се изолира за първи път от природен източник.
   - Три дитерпенови киселини от лабданов тип се изолират за първи път от европейски прополис.
3. Изследван е химичният състав на венецуелски прополис и е показано, че характерни компоненти са пренилираните бензофенони. Изолирани и идентифицирани са 6 компонента. От тях:
   - Четири пренилирани бензофенони са новооткрити съединения.
   - Един пренилиран бензофенон се изолира за първи път от природен източник.
4. За първи път е изследван бразилски червен прополис, от който са изолирани и идентифицирани 15 индивидуални съединения. От тях:
   - Един нафтохинон се изолира за първи път от природен източник.
   - Един тритерпенов кетон е нов за прополиса.

- Един изофлавоноид и един птерокарпан се изолират за първи път от бразилски прополис.

5. Установена е антибактериална и противогъбична активност на прополисови екстракти и изолирани от тях компоненти. Лабдановите киселини и птерокарпанът притежават висок инхибиращ ефект спрямо *S. aureus*, а птерокарпанът и спрямо *C. albicans*.
6. Установена е антирадикалова активност на прополисови екстракти и изолирани от тях компоненти. Гасители на свободни радикали от индивидуалните съединения са пренилираните бензофенони, изолирани от бразилския прополис.
7. Установена е цитотоксична активност на прополисови екстракти и изолирани от тях съединения чрез опити с ларви на *A. salina*. Най-висока активност има изолираният от италианския прополис дитерпенов алкохол от лабданов тип.

Публикации във връзка с дисертационната работа

1. Boryana Trusheva, Milena Popova, Vassya Bankova, Iva Tsvetkova, Christo Naydenski, Ana Gloria Sabatini, "A New Type of European Propolis, Containing Bioactive Labdanes", *Rivista Italiana Eppos* 36, 3-7 (2003)
2. Boryana Trusheva, Milena Popova, Christo Naydenski, Iva Tsvetkova, Jose Gregorio Rodriguez, Vassya Bankova, "New Polyisoprenylated Benzophenones From Venezuelan Propolis", *Fitoterapia* **75**, 683-689 (2004).
3. Boryana Trusheva, Milena Popova, Vesela Kortenska, Iskra Totseva, Jose Gregorio Rodriguez, Vassya Bankova, "Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis From Venezuela", *Oxidation Communications* **28**(2), 490-496 (2005).
4. Roumen Christov, Boryana Trusheva, Milena Popova, Vassya Bankova, Michel Bertrand, "Chemical Composition of Propolis From Canada, Its Antiradical Activity and Plant Origin", *Natural Product Research* **19**(7), 673-678 (2005).
5. Boryana Trusheva, Milena Popova, Vassya Bankova, Svetlana Simova, Maria Cristina Marcucci, Patricia Laguna Miorin, Flavia da Rocha Pasin, Iva Tsvetkova, "Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis", *eCAM* **3**(2), 249-254 (2006).

Забелязани цитати:

Статия 2:

1. S. A. Khanum, S. Shashikanth, S. Umesha, R. Kavitha, "Synthesis and Antimicrobial Study of Novel Heterocyclic Compounds From hydroxybenzophenones", *European Journal of Medicinal Chemistry* **40** (11), 1156-1162 (2005).

2. M. Abe, M. Nakada, "New construction of the bicyclo[3.3.1]nonane system via Lewis acid promoted regioselective ring-opening reaction of the tricyclo[4.4.0.05,7]dec-2-ene derivative", *Tetrahedron Letters* **47** (36), 6347-6351 (2006).

Статия 4:

1. H. Menezes, Propolis: A Review of The Recent Studies of its Pharmacological Properties, Arq. Inst. Biol., São Paulo **72**(3), 405-411 (2005).

2. S. Ngouela, B. N. Lenta, D. T. Noungoue, J. Ngoupayo, F. F. Boyom, E. Tsamo, J. Gut, J. D. Connoly, "Anti-plasmodial and Antioxidant Activities of Constituents of The Seed Shells of Symphonia globulifera Linn f.", *Phytochemistry* **67** (3), 302-306 (2006).

Участия в конференции с материали от дисертацията

1. Б. Трушева, М. Попова, В. Банкова, „Химичен състав и биологична активност на прополис от района на Сицилия", Юбилейна научна конференция с международно участие по случай 50-годишнината на ХТМУ, София, 4-5 юни 2003, V.P.1., постер.

2. V. Kortenska, B. Trusheva, M. Popova, I. Totseva, J. G. Rodrigues, V. Bankova, "Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis from Venezuela", 3rd Euro Fed Lipid Congress and Expo: Oils, Fats and Lipids in a Changing World, Edinburgh, 5-8 September 2004, ANOX 11, poster.

3. Б. Трушева, М. Попова, В. Банкова, „Химичен състав и биологична активност на прополис от Венецуела", Пета национална конференция по химия, София, 29 септември – 1 октомври 2004, 12.П.1., постер.

4. Б. Трушева, М. Попова, Св. Симова, В. Банкова, „Химичен състав и биологична активност на червен прополис от Бразилия", Национална научна сесия по химия за студенти и докторанти, София, 18-20 май 2005, доклад.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на кирилица:

ВЕТХ – високоефективна течна хроматография
ГХ - газова хроматография
ГХ/МС – газова хроматография/мас спектрометрия
КХ – колонна хроматография
МС – мас спектрометрия, мас спектър, мас спектрална
ПТСХ – препаративна тънкослойна хроматография
ТСХ - тънкослойна хроматография
УВ – ултравиолетов
ЯЕО – ядрен ефект на Оверхаузер
ЯМР – ядрен магнитен резонанс
ДЕЕ – диетилов етер
ЕМК – етилметилкетон
ПЕ – петролев етер

Съкращения на латиница:

DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) – метод за определяне мултиплетност на хетероатоми чрез пренос на поляризация
HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) – двумерна хетероядрена корелация през една връзка
HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) – двумерна хетероядрена корелация през повече от една връзка
RT – време на задържане
LC_{50} – средна летална концентрация
DPPH· – дифенилпикрилхидразил радикал
CAPE – фенетилов естер на кафеената киселина