СПЕЦИАЛИЗИРАН НАУЧЕН СЪВЕТ
по органична химия и органични технологии при ВАК

Антоанета Борисова Трендафилова

СЕСКИТЕРПЕНОВИ ЛАКТОНИ В НЯКОИ БЪЛГАРСКИ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ ОТ СЕМЕЙСТВО ASTERACEAE

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на

Дисертация

за получаване на образователната

и научна степен "доктор"

Научен ръководител:

ст.н.с. II ст. доктор Елена Цанкова

Научен консултант:

н.с. I ст. доктор Милка Тодорова

Рецензенти:

проф. доктор Илия Огнянов

доц. доктор Георги Паланов

София, 1996

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Колоквиума по химия на природните органични вещества при ИОХЦФ - БАН.

Изследванията от дисертационния труд са извършени в ИОХЦФ - БАН.

Данни за дисертацията: съдържа 95 машинописни страници и включва 13 схеми, 14 таблици, 2 фигури и 5 приложения. Библиографската справка обхваща 210 заглавия на кирилица и латиница.

Защитата на дисертацията ще се състои на 10.03.1997 г. от 14^00 часа в аудитория 111 на блок 9 на БАН, кв."Гео Милев", ул. "Акад. Г. Бончев", на разширено заседание на Специализирания научен съвет по органична химия и органични технологии при ВАК.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИОХЦФ при БАН, блок 9, етаж II, София, 1113.

ВЪВЕДЕНИЕ

Семейство Asteraceae включва над 20000 вида, представляващи приблизително 10% от световната флора. Разнообразни са областите на приложение на различните видове: някои са хранителни растения (*Helianthus annus, Lactuca sativa*), други са известни като лечебни растения (*Cnicus benedictus, Matricaria chamomilla*, видове *Artemisia* и *Achillea*), а трети се отглеждат като декоративни растения (видове *Chrysanthemum*). Много видове са обект на билкосъбирането и са намерили място като фармакопейни лекарства (*Cnicus benedictus, Artemisia absinthium*).

Системните химични изследвания на екстрактни вещества от различни видове на семейство Asteraceae са довели до откриването на много нови природни вещества, от които на първо място е голямата група на сескитерпеновите лактони. Досега са намерени представители на 25 въглеродни скелета, като най-голям е броят на гермакранолидите, ейдесманолидите и гуайанолидите. Многообразието на сескитерпеновите лактони се дължи както на функционализиране на въглеродния скелет с различни групи, така и на съществуване на конституционна и стереоизомерия. Интересът към сескитерпеновите лактони се обуславя от една страна на разнообразните химически проблеми, които те предлагат за разрешаване, а от друга - на тяхната широкоспектърна биологична активност (антибактериална, антивирусна, антихелминтна, антималарийна и други). Не на последно място трябва да се отбележи и успешното използване на сескитерпеновите лактони при разрешаване на таксономични проблеми.

ЦЕЛИ И ОБЕКТИ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА

Целта на настоящите изследвания е изучаване на сескитерпенови лактони в някои български лечебни растения от семейство Asteraceae.

Обекти на дисертационния труд са следните седем вида:

1. *Xanthium italicum* (Moretti) D. Löve (италиански казашки бодил);
2. *Xanthium strumarium* L. (влакнест казашки бодил);
3. *Xanthium spinosum* L. (бодлив казашки бодил);
4. *Cnicus benedictus* L. (пресечка, бенедиктински трън);
5. *Senecio macedonicus* Griseb. (македонски спореж);
6. *Artemisia pedemontana* Balbis. (светлолюспест пелин);
7. *Artemisia pontica* L. (понтийски пелин).

Подборът на изследваните растения се обуславя предимно от факта, че повечето от тях намират приложение в народната медицина. Освен това, тези видове (с изключение на *X. spinosum*) не са изследвани у нас.

От така подбраните обекти се очаква да се получат резултати от значение както за химията на природните органични вещества, така и за хемотаксономията на изследваните видове.

СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

1. Растителен материал.

За провеждане на настоящите изследвания са използвани материали от гореизброените видове събрани във фаза на пълен цъфтеж. Хербарийните образци са депозирани в Института по ботаника при БАН.

Изследвани са поотделно листа и корени от трите вида *Xanthium*, листа от *Senecio macedonicus* и надземни части от *Cnicus benedictus* и двата вида *Artemisia*.

2. Използвани подходи и методи.

Разработването на растителния материал бе извършено съгласно Схема 1. Суровата лактонна фракция се получава чрез разпределяне на тоталния хлороформен екстракт от въздушно сух растителен материал между петролев етер и воден етанол, утаяване на водно-алкохолния разтвор с оловен ацетат за отстраняване на фенолните съединения, филтруване на получената утайка, отстраняване на етанола от филтрата и екстракция с хлороформ на получения остатък.

Чрез колонна хроматография върху силикагел с подходящо избрана подвижна фаза се постига първоначалното фракциониране на суровата лактонна фракция. На по-нататъшно разработване се подлагат само тези фракции, инфрачервените спектри на които съдържат характерната за γ-лактони абсорбционна ивица при 1770-1750 $см^{-1}$. Рехроматографиране чрез колонна или препаративна тънкослойна хроматография /ПТСХ/ на така подбраните фракции води до получаване на индивидуалните съединения.

За идентифициране и структурно - химични изследвания са из-

ползвани преди всичко данните от ^{1}H, ^{13}C ЯМР и ИЧ спектроскопия и мас спектрометрия. Поради малките количества (5-10 мг) на изолираните съединения ограничено са използвани химични трансформации.

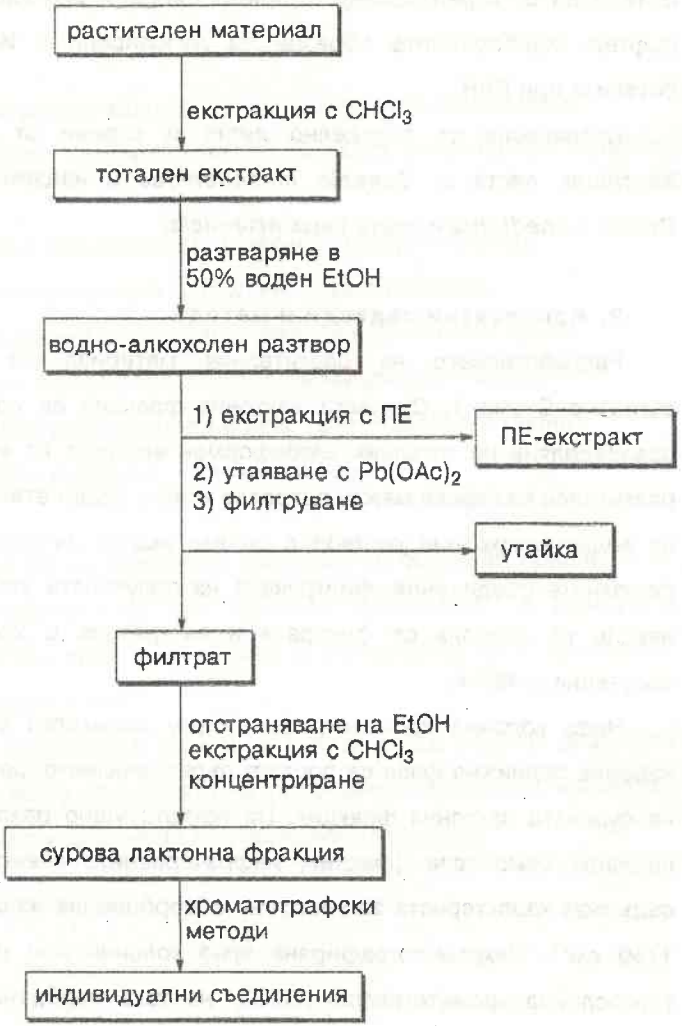
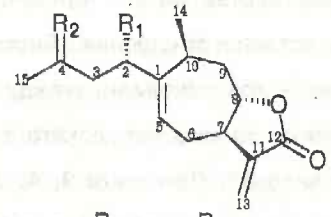


Схема 1. Разработване на растителния материал

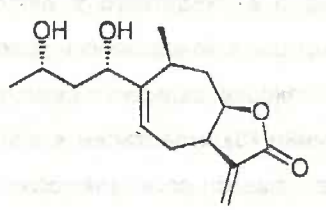
3. Изследване на видове *Xanthium*.

В България се срещат само три вида от род *Xanthium* - *X. italicum*, *X. strumarium* и *X. spinosum*, като първият често се разглежда като подвид или вариетет на *X. strumarium*. Характерна химична съставка на този род са сескитерпеновите лактони с 4,5-секо-гуайанов скелет, наречени по името на рода ксантанолиди.

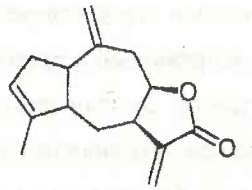
При изследване на листата на трите таксона бяха изолирани и идентифицирани следните ксантанолиди: ксантинозин (**1**), ксантатин (**2**), ксантинин (**3**), 2-хидроксиксантинозин (**4**), ксантанол (**5**), изоксантанол (**8***), ивалбин (**10**), 8-епи-ивалбин (**18**). Предвид на непубликувани данни за биологична активност на корени от *X. italicum* бяха изследвани и корените на трите вида *Xanthium*.



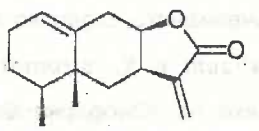
	R_1	R_2
1	H	O
2	H	O, $\Delta^{2,3}$
3	OAc	O
4	OH	O
5	OAc	αOH, H
8	OH	αOAc, H
10	OH	αOH, H



18



35



37

*Номерацията на съединенията следва тази от дисертационния труд

Таблица I. Съдържание (в тегловни проценти) на лактоните **1 - 5**, **8**, **10**, **18**, **35** и **37** в тоталните екстракти

Вид	Листа								Корени	
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**8**	**10**	**18**	**35**	**37**
X. italicum	1	6	14	1	4	2	-	-	-	12
X. strumarium	1	3	11	<1	4	2	-	-	-	31
X. spinosum	-	1	2	>1	2	1	1	<1	24	-

Установено бе, че те не съдържат ксантанолиди, а гуайанолида циниолид (**35**) и еремофиланолида ксантанодиен (**37**).

В Таблица I са обобщени данните за съдържание на лактони, изчислено в тегловни проценти спрямо тоталните екстракти. Очевидно е сходството в лактонния състав на *X. italicum* и *X. strumarium* в качествено и в количествено отношение. Листата на двата таксона съдържат само транс - ксантанолиди, между които ксантинин (**3**) е застъпен в най-голямо количество, докато в корените е намерен само еремофиланолида **37**. Лактоните **2**, **4**, **5**, **8** и **37** са нови за *X. italicum*. Листата на *X. spinosum* не съдържат ксантинозин (**1**), а количеството на ксантинин (**3**) е значително по-ниско в сравнение с другите два таксона. Освен това, единствено от този таксон са изолирани лактоните **10** и **18**, като последния се намира за първи път в изследвания вид. От кореният на *X. spinosum* бе изолиран гуайанолида **35**, докато ксантанодиен (**37**) не бе установен даже и в следи.

Очевидното сходство в химичния състав на листа и корени от *X. italicum* и *X. strumarium* говори в полза на възприетото от авторите на "Флора на Европа" таксономично разглеждане на *X. italicum* като подвид на *X. strumarium*, макар че във "Флора на България" те са описани като самостоятелни видове.

Наред със сескитерпеновите лактони, в кореният на трите вида бяха намерени и следните съпътстващи ги вещества: фитостероли (β-ситостерол, стигмастерол и кампестерол), тритерпеноиди (тараксерол и тараксерилацетат), сескитерпеноид от дауканов тип (ласидиол-р-метоксибензоат), захари (глюкоза и захароза), мастни алкохоли (н-хептакозанол) и полиина тридец-1-ен-3,5,7,9,11-пентаин.

4. Изследване на *Cnicus benedictus*.

Безразборното събиране на *Cnicus benedictus* за търговски и промишлени цели е довело до значително намаляване на популациите на вида у нас, поради което от 1995 г. е забранено събирането му от естествени находища. Във връзка с това е поставен въпросът за неговото култивиране и оттук необходимостта от сравняване на химичния състав на диворастящия и култивиран вид.

Първоначално бе изследвана надземната част на *Cnicus benedictus*, култивиран в опитното поле на Института по ботаника. С оглед на по-пълно фитохимично охарактеризиране, растителният материал бе екстрахиран последователно с два различни по полярност разтворителя - петролев етер и хлороформ.

Установено бе, че петролево - етерният екстракт съдържа следните класове природни съединения:

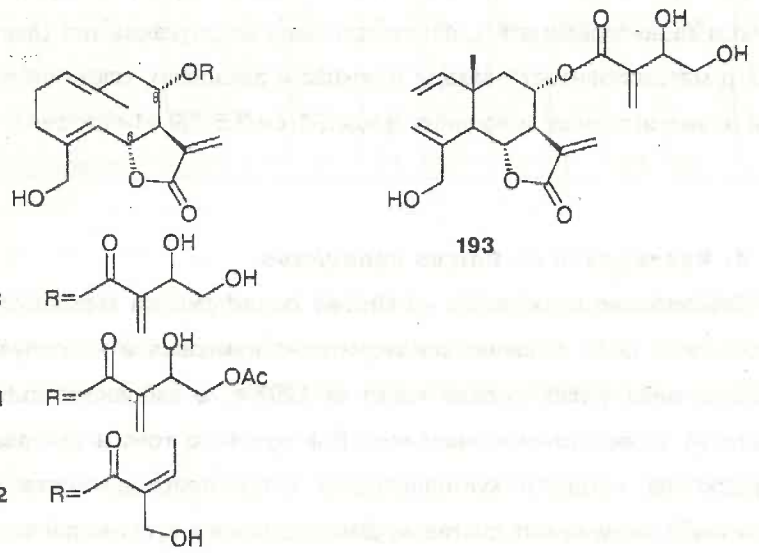
- тритерпеноиди от амиринов тип - α-амирин, α-амиринацетат, урсолова и олеанолова киселина;

- фитостероли - смес от β-ситостерол, стигмастерол и кампестерол;

- мастни алкохоли - 1-докозанол.

От хлороформения екстракт бяха изолирани четири сескитерпенови лактона - гермакранолидите **43**, **191-192** и елеманолида **193**. Установено бе, че те представляват 0.74% в сухата надземна

част, като най-голямо е количеството на кницина (**43**) (0.38%). Лактоните **191-193** се откриват за първи път в *Cnicus benedictus*.

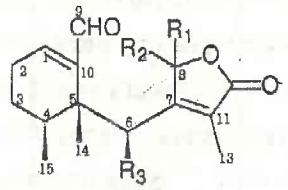


Наред със сескитерпеновите лактони, от хлороформения екстракт бяха изолирани и идентифицирани два нови за вида флавоноида - пендулетин и цирсимаритин.

Тъй като предоставеното количество растителен материал от диворастящ *Cnicus benedictus* бе ограничено само до 5 г, препаративното разделяне на получените петролево-етерен и хлороформен екстракти бе практически невъзможно. Поради това ние се ограничихме само до качествено и полуколичествено сравняване. ТСХ анализ на съответните екстракти в присъствие на изолираните индивидуални съединения разкрива пълно сходство в качествено и количествено отношение. Тези резултати показват, че при култивирането на *Cnicus benedictus* не настъпват промени по отношение на основните химични компоненти и следователно култивираното растение би могло да се използва успешно за медицински и други цели.

5. Изследване на *Senecio macedonicus*.

Видовете от род *Senecio* са широко разпространени из целия свят и добре изучени. Интересно за този род е присъствието на пиролизидинови алкалоиди, което обуславя токсичността на растенията. Освен това, типични химични съставки са сескитерпеноидите фураноеремофилани, еремофиланолиди и техни производни. *Senecio macedonicus* е ендемичен вид за Балканския полуостров и това обяснява липсата на данни за неговия химичен състав. В суровата лактонна фракция, получена от листа на този вид, не бяха открити еремофиланолиди, а биогенетично сродните им секомакротолиди. Тяхното изолирне в чист вид обаче не бе постигнато, дори и след ацетилиране. Чрез рехроматографиране и ПТСХ пречистване на ацетилираната фракция S-2 бяха получени пробите **S-A** и **S-B**, които дават ТСХ петна с близки R_f стойности.



	81a	**194**	**81b**	**195**
R_1	H	H	OAc	OAc
R_2	OAc	OAc	H	H
R_3	OAng	OMeacr	OAng	OMeacr
	S-A		**S-B**	

Мас спектрите (CI) на **S-A** и **S-B** са еднакви, като всеки от тях съдържа два протонирани молекулни пика при m/z 405 и 391. Това показва, че всяка проба се състои от два лактона (**81a** и **194** в **S-A**, **81b** и **195** в **S-B**) с молекулна формула $C_{22}H_{28}O_7$ (**81a/b**) и $C_{21}H_{26}O_7$ (**194/195**). В мас спектрите се наблюдава и базов пик при

m/z 305, съответстващ на елиминиране на две различни киселини, т.е. $[405\text{-}C_5H_8O_2]^+$ и $[391\text{-}C_4H_6O_2]^+$. Това показва, че най-вероятно тези лактони имат еднакъв въглероден скелет, но се различават по природата на естерната група.

В ^{1}H ЯМР спектрите (Таблица II) са налице диагностичните сигнали за ангелоилна и метакрилоилна естерни групи, докато всички останали сигнали имат много сходни химични отмествания и мултиплетност. Сигналите в областта δ 9.32 - 9.24 са характерни за

Таблица II. ^{1}H ЯМР данни на **S-A** и **S-B***

H	S-A		S-B	
	81a	**194**	**81b**	**195**
1	6.97 t		6.97 t	
2	2.42 m		2.40 m	
6	6.06 s	6.05 s	6.04 s	6.03 s
8	6.67 s		6.68 s	
9	9.24 s	9.30 s	9.24 s	9.32 s
13	2.13 s		2.10 s	
14	1.33 s	1.34 s	1.33 s	
15	0.86 d		0.86 d	
OAc	2.16 s		2.19 s	
OR	6.12 qq	6.14 brs	6.10 qq	6.14 brs
	1.98 dq	5.61dq	1.98 dq	5.60 dq
	1.91 dq	1.94 brs	1.91 brs	1.93 brs

* Спектрите са снети в $CDCl_3$

J [Hz]: 1,2=1,2'=3.8; 4,15=6.9;OAng: 3',4'=7;

3',5'=4',5'=1.5; OMeacr: 3',3"=3',4'=3",4'=1.5

протон от алдехидна група. В областта на слабите полета се наблюдават три различни сигнала. Триплетът при δ 6.97 е приписан на олефиновия протон в β-положение спрямо алдехидната група, синглетите при δ 6.67 и 6.68 - на протон, геминален на ацетокси група, а синглетите в областта δ 6.03 - 6.06 - на протони, геминални на съответните ангелоилна и метакрилоилна естерни групи. В областта на силните полета присъстват сигнали за три различни метилни групи. Два от тях (δ 1.33 s и 0.86 d) са характерни за метилните групи при C-4 и C-5 в еремофилановия скелет, а третият (δ 2.13 s) се дължи на винилната метилна група в лактонния пръстен. Тези ^{1}H ЯМР данни отговарят единствено на съединения с 8,9-секо-еремофиланов скелет, като тези на лактоните **81a/b** са идентични с познатите 6β-ангелоилокси-секомакротолид ацетат и 8-епи-6β-ангелоилокси-секомакротолид ацетат. Другата двойка епимерни лактони **194/195**, които съдържат метакрилоилна група при C-6 са нови природни съединения. По аналогия с познатите секомакротолиди е приета β-ориентация на естерните групи при C-6. Стереохимията при C-8 остана неопределена, въпреки че бяха изолирани диастереомерните двойки **81a/b** и **194/195**.

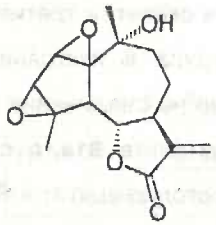
Секомакротолидите са сравнително малка група сескитерпенови лактони, наброяваща само 19 съединения намирани единствено в три вида от род *Senecio*.

6. Изследване на видове *Artemisia*.

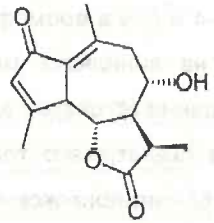
Представителите на род *Artemisia* са обект на многобройни изследвания, в резултат на което са намерени над 500 сескитерпенови лактона. В литературата обаче данните за *A. pedemontana* са ограничени, а за *A. pontica* - изобщо липсват.

6.1. *A. pedemontana.*

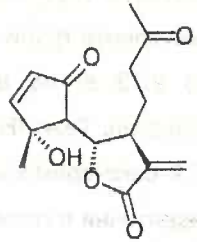
Растителният материал е събран от единственото находище на този вид у нас - района на нос Калиакра и разработен по описания на Схема 1 начин. От суровата лактонна фракция бяха изолирани шест сескитерпенови лактона, идентифицирани като канин (**98**), артеканин (**99**), 8α-хидроксиахилин (**104**), 1,10α-епокси-8α-хидроксиахилин (**106**), секотанапартолид (**184**) и танапартин-β-пероксид (**196**).



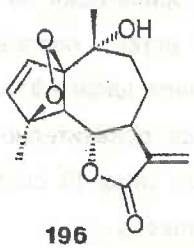
98 1β,2β;3β,4β-диепокси
99 1α,2α;3α,4α-диепокси



104
106 1α,10α-епокси



184



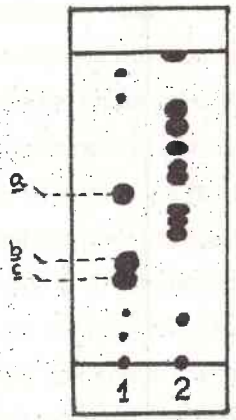
196

A. pedemontana Balbis. е описана във "Флора на Европа" със синонимни имена *A. caucasica* auct.,?an Willd., *A. assoana* Willk. и *A. lanata* Willd., non Lam. В литературата има данни за сескитерпенови лактони в *A. caucasica* (1, Русия), *A. assoana* (2, Испания), *A. lanata* (3 и 4, Испания). Установено бе, че общата характеристика за българската и проби 1-3 е съдържанието само на гуайанолиди независимо от различния им произход и сезон на събиране на

растителния материал. За разлика от тях в проба 4 са намерени и гермакранолиди. Това предполага съществуването на два хемотипа - гуайанолиден и гуайанолидно-гермакранолиден. Намерените от нас лактони **99** и **184** са нови за вида, а ендопероксидът **196** - нов за род *Artemisia.*

6.2. *A. pontica.*

За настоящите изследвания бе събран растителен материал от две различни находища - Г. Бърдо и Ябланица. ТСХ сравняване (Фигура 1) на съответните сурови лактонни фракции AP_1 (Г. Бърдо) и AP_2 (Ябланица) показа съществени различия в качествения състав, поради което те бяха разработени поотделно.



Фигура 1. ТСХ на AP_1 (1) и AP_2 (2), Хл/Ац, 3:1

6.2.1. *A. pontica* от Г. Бърдо.

След хроматографско разделяне на суровата лактонна фракция AP_1 бе получена фракция AP_1-2, която отговаря по R_f стойност (0.32) на петното b от ТСХ на Фигура 1. Мас спектърът и ^1H ЯМР данните определено показват, че AP_1-2 е смес от няколко

сескитерпенови лактона. Чрез хроматографиране върху силикагел/$AgNO_3$ бе постигнато разделяне на две подфракции **AP_1-A** и **AP_1-B** с близки хроматографски и спектрални отнасяния. Мас спек-

Таблица III. ^{13}C ЯМР данни на **AP_1-A***

C	**AP_1-A**	
	197	**198**
1	52.30 d#	
2	51.41 t	
3	77.14 d	
4	132.54 s	
5	144.94 s	
6	80.18 d	
7	55.25 d	
8	71.50 d	
9	34.93 t	
10	23.00 s	
11	40.29 d[a]	
12	177.45 s	
13	26.41 t[b]	
14	13.45 q	
15	22.38 q	
1'	172.03 s	175.77 s
2'	43.35 t	41.35 d[a]
3'	25.69 d	29.67 t[b]
4'	15.73 q[c]	11.70 q
5'	15.58 q[c]	17.03 q

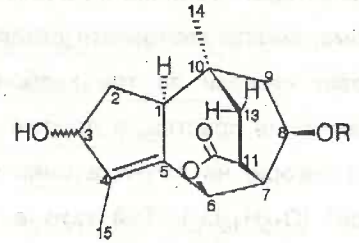
* Спектърът е снет в $CDCl_3$ при 63 MHz

#Мулиплетността на сигналите е определена чрез DEPT

a,b,cВзимнозаменящи се сигнали

търът (CI, NH_3) на **AP_1-A** показва наличие на съединение с молекулна формула $C_{20}H_{28}O_5$ (m/z 366, $[M+NH_4]^+$). Базовият пик при m/z 247 $[M-NH_3-102]^+$ отговаря на отцепване на алифатна киселина ($C_5H_{10}O_2$). ^{13}C ЯМР спектърът (Таблица III) обаче съдържа сигнали за 25 въглеродни атома, вместо очакваните двадесет. В областта δ 178-172 се наблюдават сигнали за три карбонилни въглеродни атома: единият от лактонния пръстен, а другите два - от естерни групи. Това очевидно говори, че **AP_1-A** е смес от два естера на един и същ "агликон" ($C_{15}H_{18}O_3$). Тъй като в мас спектъра се съдържа само един пик, дължащ се на елиминиране на $C_5H_{10}O_2$ киселина бе допуснато, че се касае за изомерните изовалерилна (**197**) и 2-метилбутирилна (**198**) естерни групи. Това бе потвърдено от съответните характерни ^1H ЯМР сигнали. Структурата на "агликона" бе доказана чрез ^1H ЯМР (Таблица IV), като изчерпателното декуплиране позволи приписване на всички сигнали в спектъра. Установен бе гуайанов скелет с хидроксилна група при C-3, естерен заместител при C-8 и лактонен пръстен сключен при C-6. Сигналът за винилна метилна група (δ 1.93 s) и отсъствието на сигнали за олефинови протони определят наличието на тетразаместена двойна връзка при C-4/C-5, което се потвърждава от ^{13}C ЯМР данни. На молекулната формула $C_{20}H_{28}O_5$ отговарят седем степени на ненаситеност, три от които се дължат на хидроазуленовата система и други три - на двойната връзка, лактонната и естерната карбонилни групи. Седмата степен на ненаситеност очевидно се дължи на допълнителен пръстен, тъй като няма данни за други субституции. Един трети пръстен в хидроазуленовата система може да бъде сключен между C-10 и C-13, което е в съгласие с отсъствието на сигнали за екзометиленови или метилови протони при C-13. Налице са два почти припокриващи се дублета при δ 1.36 и 1.34 приписани на C-13 метиленови протони, тъй като те се

превръщат в синглети след ирадииране на сигнала за H-11. Освен това, всички сигнали за въглеродните атоми са в пълно съгласие с предложения трицикличен хидроазуленов скелет на лактоните **197** и **198**.



197 R= iVal
198 R= 2-MeBu

Драйдинг моделът показва, че допълнителният цикъл не създава напрежение, само когато той заедно с лактонният пръстен е цис-свързан и β-ориентиран. Наличието на такъв строеж на молекулата се потвърждава от наблюдавания ядрен ефект на Оверхаузер (ЯЕО) между H-1 и H-9b (6%), а син-α-ориентацията на H-6, H-7 и H-8 следва от константите на спиново взаимодействие, както и от установения ЯЕО (9%) между H-6 и H-8. За съжаление стереохимията при C-3 остана неопределена поради нееднозначност на наблюдаваните ЯЕО.

Мас спектърът (CI, NH_3) на **AP_1-B** съдържа пикове за адукти на три молекулни йона при m/z 364 $[M'+NH_4]^+$, 352 $[M''+NH_4]^+$ и 350 $[M'''+NH_4]^+$ и базов пик при m/z 247, дължащ се на елиминиране три различни киселини, т.е. $[364-NH_3-C_5H_8O_2]^+$, $[352-NH_3-C_4H_8O_2]^+$ и $[350-NH_3-C_4H_6O_2]^+$. Следователно **AP_1-B** се състои от три ацилни аналога на **197** и **198**, а именно тиглоил (**199**), изобутирил (**200**) и метакрилоил (**201**). Това се потвърждава и от ^1H ЯМР спектъра (Таблица IV), в който се набюдават типичните сигнали за протоните от естерните групи в съединенията **199 - 201**. ^1H ЯМР данните на

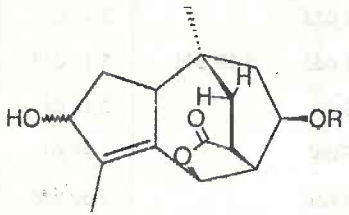
Таблица IV. ^1H ЯМР данни на лактоните **197-202** ($CDCl_3$)

H	197	198	199	200	201	202*
1	3.35 dd			3.34 dd		3.35 dd
2a	2.27 ddd			2.30 ddd		2.35 ddd
2b	1.92 ddd			1.94 ddd		1.80 ddd
3	4.60 dd			4.63 dd		4.56 dd
6	4.74 d			4.77 d		4.99 d
7	2.41 ddd			2.48 ddd		2.40 ddd
8	4.95 ddd		5.07 ddd	4.94 ddd	5.18 ddd	5.11 ddd
9a	2.18 dd			2.18 dd		2.18 dd
9b	1.81 dd			1.85 dd		1.95 dd
11	2.43 ddd			2.53 ddd		2.60 ddd
13a	1.34 d			1.32 d		1.28 d
13b	1.36 d			1.35 d		1.32 d
14	1.02 s			1.02 s		0.98 s
15	1.93 s			1.93 s		1.85 s
2'	2.15 m	2.60 m	-	2.60 m	-	-
3'	2.10 m	1.40 m 1.60 m	6.90 m	1.16 d	6.27 brs 5.99 brs	6.20 brs 6.01 brs
4'		0.92 t	1.40 d	1.17 d	1.83 s	4.56 m
5'	0.97 d	1.17 d	1.85 brs	-	-	3.88 dd 4.14 dd

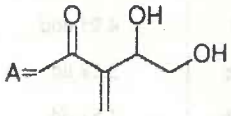
*в $(CD_3)_2CO$

J [Hz]: **197-202**: 1,2a=5; 1,2b=8; 2a,2b=15; 2a,3=7; 2b,3=3; 6,7=7,8=10; 7,11=7; 8,9a=11; 8,9b=4; 9a,9b=12.7; 11,13a=11,13b=6; **197**, OiVal: 3',4'=3',5'=7; **198**, OMeBu: 2',5'=3'a,4'=3'b,4'=7; **199**, OTigl: 3',4'=7; **200**, OiBu: 2',3'=2',4'=7; **202**: 4',5'a=4, 4',5'b=6, 5'a,5'b=11.

"агликоновата" част се оказаха много близки с тези на **197** и **198**. Относителната стереохимия на хиралните въглеродни атоми бе определена въз основа на сходството в химичните отмествания и вида на някои сигнали (H-6, H-7, H-8 и H-11) с тези в съединенията **197** и **198**.



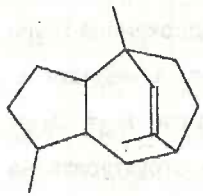
199 R= Tigl
200 R= iBu
201 R= Meacr
202 R= A



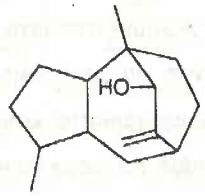
От по-полярната фракция AP_1-4 бе изолиран лактонът **202**. Мас спектърът (CI, изобутан) показва протониран молекулен йон при m/z 379, съответстващ на молекулна формула $C_{20}H_{26}O_{27}$ и отново базов пик при m/z 247 $[M+H-132]^+$. Това показва присъствие на същия "агликон", описан по-горе ($C_{15}H_{18}O_3$), който е естерифициран с дихидроксикарбоскилна киселина ($C_5H_8O_4$). ^1H ЯМР спектърът (Таблица IV) съдържа всички сигнали характерни за "агликоновите" протони на съединенията **197-201**. Присъствието на 2-(1,2-дихидроксиетил)-акрилна естерна група бе определено въз основа на диагностичните ^1H ЯМР сигнали.

Необикновеният трицикличен въглероден скелет на лактоните **197-202** е приписан за първи път през 1977 г. на сескитерпеноидите ротунден (**203**) и ротунденол (**204**), изолирани от етерично масло на два вида от род *Cyperus* (Cyperaceae). До момента в природата е намерено само едно друго ротунданово производно (**205**) във вид *Trixis* (Asteraceae), за което авторите установяват

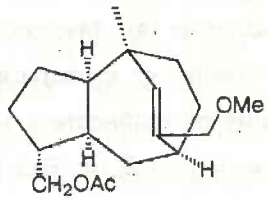
цис-свързване при C-1/C-5 и β-ориетация на пръстена C-7/C-10. Следователно, изолираните от нас съединения **197-202** са първите сескитерпенови лактони, притежаващи ротунданов скелет и за тях бе предложено наименованието ротундопонтилид A- F .



203

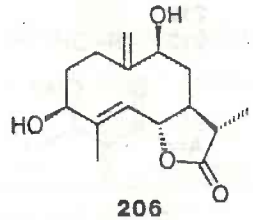


204



205

Наред с описаните по-горе необичайни сескитерпенови лактони от суровата лактонна фракция бе изолиран и идентифициран гермакранолида херболид F (**206**).

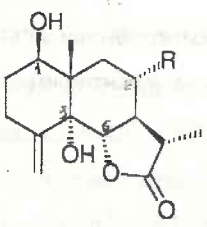


206

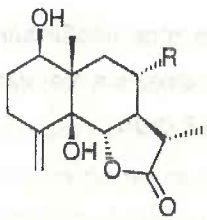
6.2.2. *A.pontica* от Ябланица

От суровата лактонна фракция AP_2 бяха изолирани 10 сескитерпенови лактона (**140, 207-215**). Спектралните данни на лактона **140** позволиха еднозначното му идентифициране като 5-хидроксиейдесманолида артемин, намиран и в други видове *Artemisia*.

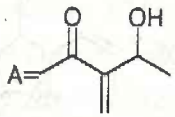
Спектралните характеристики (МС и ^{1}H ЯМР) на лактона **207** са много близки с тези на артемин (**140**), но в молекулната формула е налице един кислороден атом повече (m/z 282 $[M]^+$, $C_{15}H_{22}O_5$). Отцепването на две молекули вода от молекулния йон (m/z 246 $[M-2H_2O]^+$, както и присъствието на сигнали за два карбинолни протона при δ 4.18 и 4.01 (Таблица V) показват, че лактонът **207** е хидроксилен аналог на **140**. Мястото на допълнителната хидроксилна група при С-8 следва от експериментите на декуплиране, а нейната α-ориентация от стойностите на вициналните константи $J_{7,8}$= $J_{8,9}$= 10.5 Hz и $J_{8,9'}$= 4.7 Hz. Въз основа на тези данни структурата на новото природно съединение **207** бе определена като 8α-хидроксиартемин.

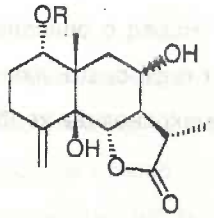


140 R=H
207 R=OH
208 R=OiVal
209 R=OiBu
210 R=OSen
211 R=OA



212 R=H
213 R=OH





214 R=iVal
214a R=OAc

ИЧ спектрите на **208-211** са много сходни и съдържат абсорбционни ивици за γ-лактонен пръстен, естерна и хидроксилна групи. Техните ^{1}H ЯМР спектри (Таблица V) са близки до тези на **207**, но сигналът за H-8 е отместен в по-слабите полета (δ 5.16-5.29), което показва, че естерната група е свързана при С-8. Наред с това, в ^{1}H ЯМР спектри се съдържат диагностичните сигнали за изовалерилна,

Таблица V. ^{1}H ЯМР данни на лактоните **140, 207-214***

H	140	207	208	209	210	211**	212	213	214
1	4.15dd	4.18dd	4.17dd	4.18dd		4.11dd	3.45brs	3.46brs	5.05dd
2	1.75m[a]	1.78m	1.80m	1.80m		1.70m	1.90m[a]	1.90m	1.60m
2'	1.60m[a]	1.55m	1.60m	1.65m		1.55m	1.80m[a]	1.80m	2.05m
3	2.65m	2.68m	2.68m	2.68m		2.70m	2.07ddd	2.10ddd	2.18m
3'	2.17ddd	2.12ddd	2.16ddd	2.18ddd		2.10ddd	2.90m	2.89m	2.70m
6	4.25d	4.25d	4.33d	4.34d	4.36d	4.56d	4.35d	4.37d	4.39d
7	2.35m	2.44dt	2.60dt	2.60dt		2.70m	2.32dt	2.41dt	2.60dt
8	1.85m[a]	4.01ddd	5.17ddd	5.16dd	5.19ddd	5.29ddd	1.85m[a]	4.11ddd	4.05ddd
8'	1.55m[a]	-	-	-		-	1.60m[a]	-	-
9	1.85m[a]	2.05dd	2.10dd	2.10dd		2.10dd	1.60m[a]	1.60dd	1.89dd
9'	1.60m[a]	1.95dd	1.76dd	1.78dd		1.75dd	1.30m	1.58dd	1.65dd
11	2.40dq	2.60dq	2.60dq	2.60dq		2.70m	2.32dq	2.58dq	2.60dq
13	1.24d	1.41d	1.25d	1.25d		1.32d	1.23d	1.38d	1.39d
14	0.90s	0.90s	0.95s	0.95s	0.96s	0.95s	1.34s	1.35s	1.19s
15	5.03d	5.05d	5.07d	5.07d		5.03d	5.14d	5.19d	5.15d
15'	4.98brs	5.00brs	5.02brs	5.02brs		4.99s	5.08brs	5.12brs	5.11brs
R			2.20m	2.45m	5.66brs	6.22brs			2.20m
			2.05m	1.18d	1.92s	5.95brs			2.00m
			0.97d		2.19s	4.63q			0.97d
						1.20d			

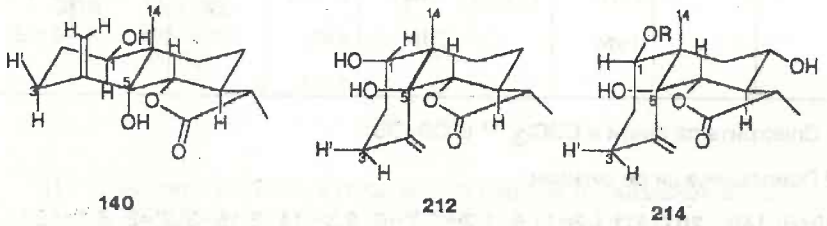
* Спектрите са снети в $CDCl_3$; ** В CD_3OD;

[a] Припокриващи се сигнали;

J[Hz]: **140, 207-211**:1,2=11.5; 1,2'=2,3'=5; 3,3'=14; 3,15=3',2'=2; 6,7=10.5; 7,11= 12; 11,13=6.5; **207-211**: 7,8=8,9=10.5; 8,9'=4.7; 9,9'=12; **212-213**: 3,3'=14; 2,3' =3,15=2; 2',3'=4.5; 6,7=11.5; 7,11=12; 11,13=6.4; **213**: 7,8=8,9=11; 8,9'= 5.4; 9,9'=11.9; **214**: 1,2=5, 1,2'=11.5; 6,7=7,8=8,9 =11; 8,9'=5; 9,9'=7,11 =12; 3,15=2; 11,13=6.5; OiVal: 3'',4''=3'',5'' =6.5; OiBu: 2'',3''=2'',4''=6.5; OA: 4'',5''=6.5

изобутирилна, сенеционилна и 1-хидроксиетилакрилна естерни групи. Присъствието на последните се потвърждава и от мас спектрите на **208-211**, които освен молекулните йони при m/z 366, 364, 352 и 380, съответно, съдържат един и същ пик при m/z 264, дължащ се на елиминиране на съответните киселини, т.е. $[366\text{-}C_5H_{10}O_2]^+$, $[364\text{-}C_5H_8O_2]^+$, $[352\text{-}C_4H_8O_2]^+$ и $[380\text{-}C_5H_8O_3]^+$. Тези данни определят лактоните **208-211** като нови ацилни производни на 8α-хидроксиартемин (**207**).

Спектралните данни на лактона **212** напълно съвпадат с тези на познатия 5-епи-артемин. Характерната разлика в ^{1}H ЯМР спектрите (Таблица V) на епимерните лактони **140** и **212** е химичното отместване на сигналите за H-1, H-3, H-3' и H-14. Както се вижда от Драйдинг модела (Фигура 2) C-5 хидроксилната група при транс-декалинова система в **140** влияе силно върху H-1 и H-3 и техните сигнали са парамагнитно отместени с 0.6-0.7 ppm в сравнение с тези в **212**. В цис-декалинова системата на **212** C-5 - хидроксилната група, ангуларната метилна група и H-3' са син-разположени, в резултат на което сигналите на последните абсорбират в по-слабо поле (δ 1.34 и 2.90) от съответните в **140** (δ 0.90 и 2.17).



140 **212** **214**

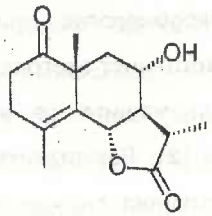
Фигура 2. Драйдинг модели на **140**, **212** и **214**

Мас спектърът на лактона **213** съдържа същия молекулен йон и пикове (m/z 282 $[M]^+$, 264 и 246) като тези на 8α-хидрокси-артемин (**207**), но с различен интензитет. ^{1}H ЯМР различията (Таблица V)

между двете съединения са аналогични на тези, описани за лактоните **140** и **212** и определят новият лактон **213** като 8α-хидрокси-5-епи-артемин.

Лактонът **214** е също 5-хидроксиейдесманолид, както следва от ^{1}H ЯМР спектралните данни (Таблица V). Химичното отместване на ангуларната метилна група (δ 1.19) говори в полза на цис-анелирана декалинова система (Фигура 2). Наличието на хидроксилна група при C-8 следва от сигнала за карбинолен протон (δ 4.05 ddd), който се превръща в дублет от дублети след ирадииране на H-7 сигнала (δ 2.60). Виционалните константи на взаимодействие $J_{7,8}$= $J_{8,9}$= 11 Hz и $J_{8,9'}$=5 Hz определят α-ориентацията на C-8 хидроксилната група. Сигналът при δ 5.05 е приписан на протон, геминален на естерна група при C-1, а наблюдаваните константи $J_{1,2}$=11.5 Hz и $J_{1,2'}$=5 Hz ясно показват, че H-1 е β-аксиален. Присъствието на изовалерилна естерна група бе определено въз основа на диагностичните ^{1}H ЯМР сигнали и от мас спектъра, в който пика при m/z 264 съответства на елиминиране на изовалерианова киселина от молекулния йон, т.е. $[366\text{-}C_5H_{10}O_2]^+$. Тези данни ни дават основание да определим новият лактон **214** като 1-изовалерил-8α-хидрокси-1,5-диепи-артемин. Последният е ацилен аналог на **214a**, изолиран неотдавна от *A. huguetl*.

Лактонът **215** бе идентифициран като 8α-хидроксиаурин въз основа на спектралните му данни (ИЧ, МС и ^{1}H ЯМР).



215

Изолираните девет сескитерпенови лактона (**140, 207-214**) са представители на относително малката група 5-хидроксиейдесманолиди, намирани в някои видове *Artemisia*. От тях, само артемин (**140**) и 5-епи-артемин (**212**) са известни, докато 8α-хидроксиартемин (**207**), неговите ацилни производни **208-211**, 8α-хидрокси-5-епи-артемин (**213**) и 1-изовалерил-8α-хидрокси-1,5-диепи-артемин (**214**) са нови природни съединения.

Наред с описаните по-горе лактони, от суровата лактонна фракция бе изолиран един флавоноид идентифициран като генкванин. Този флавоноид е нов за изследвания вид и е изключително рядко застъпен в род *Artemisia*, тъй като досега е намерен само в *A. capillaris*.

Описаните резултати показват съществени различия в лактонния състав на изследваните две проби от *A. pontica*. Така, изолираните от пробата от Ябланица 5-хидроксиейдесманолиди не бяха открити в пробата от Г. Бърдо. Последната съдържа главно лактони с ротунданов скелет. Докато ейдесманолиди се срещат в род *Artemisia*, то лактоните с необичайния трицикличен ротунданов скелет се намират за първи път в природата. Тези резултати определят съществуването на хемотипове на *A. pontica*.

7. Биологична активност

7.1. Антибактериална и антивирусна активност

В Института по микробиология при БАН бяха проведени биологични изпитания на тоталният екстракт, получен от листа на *X. italicum*, както и на съдържащите се в него основни лактони ксантинин (**3**) и ксантатин (**2**). Резултатите от тях показват значителна антибактериална активност спрямо грам-положителни бактерии и висока цитотоксичност на тотален екстракт и на лактоните **2** и

3. Тоталният екстракт е единствената проба активна спрямо псевдоарабски вирус (PsRV).

7.2. Инсектицидна активност на растителни екстракти спрямо неприятели на земеделски култури

В Института за растителна защита- Костинброд бе изследвана активността на екстракти от *X. italicum* - листа и корени, *X. strumarium* - корени, *X. spinosum* - корени, *S. macedonicus* - листа и *Cnicus benedictus* - надземна част спрямо ябълков плодов червей, оранжерийна белокрилка и обикновен паяжинообразуващ акар. Резултатите от тях показват, че екстрактите от корени на *X. italicum* и листа на *S. macedonicus* проявяват най-висока активност спрямо ябълковия плодов червей и обикновения акар.

ОБОБЩЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изследвани са сескитерпеновите лактони в седем вида от семейство Asteraceae, растящи в България - *Xanthium italicum, Xanthium strumarium, Xanthium spinosum, Cnicus benedictus, Senecio macedonicus, Artemisia pedemontana* и *Artemisia pontica*. Намерени са общо 41 сескитерпенови лактона с 9 различни въглеродни скелета (Схема **2**). Идентифицирани са десет ейдесманолида, осем ксантанолида, шест гуайанолида, шест ротундопонтилида, четири гермакранолида, четири 8,9-секо-еремофиланолида и по един представител от еремофиланов, елеманов и 1,10-секо-гуайанов тип. Установено е, че 15 от намерените лактони са нови природни съединения, чиято структура и относителна стереохимия е доказана главно чрез спектрални методи.

2. От листата на трите вида *Xanthium*, срещани у нас са изоли-

рани общо осем ксантанолида, пет от които са нови за изследваните видове. Установено е, че корените не съдържат ксантанолиди, даже и в следи. Вместо това, от корени на *X. italicum* и *X. strumarium* е изолиран еремофиланолида ксантанодиен, а от *X. spinosum* - гуайанолида циниолид. Установеното много голямо сходство в състав на листа и корени от *X. italicun* и *X. strumarium* говори в полза на възприетото от авторите на "Флора на Европа" таксономично разглеждане на *X. italicum* като подвид на *X. strumarium*.



Схема 2. Въглеродни скелети на сескитерпеновите лактони намерени в изследваните растения

3. Наред с основния лактон кницин, от култивиран *Cnicus benedictus* са изолирани още три нови за вида сескитерпенови лактона - два германкранолида и един елеманолид. Установено е пълно сходство на основните химични компоненти в екстракти от култивиран и диворастящ вид, което показва, че култивираното растение може да се използва успешно за медицински и други цели.

4. В листата на *Senecio macedonicus*, ендемичен вид за Балканския полуостров, са намерени 4 сескитерпенови лактона с 8,9-секо-еремофиланов скелет. Два от тях, 6β-метакрилоилоксисекомакротолид ацетат и неговият С-8-епимер са нови природни съединения. Те са представители на относително малката група секомакротолиди намирани досега единствено във видове *Senecio*.

5. От надземните части на *A. pedemontana* са изолирани пет гуайанолида и един 1,10-секо-гуайанолид. Лактоните артеканин и секотанапартолид са нови за вида, а танапартин-β-пероксид се намира за първи път в представител на род *Artemisia*.

6. Установена е съществена разлика в състава на сескитерпеновите лактони в две популации на *Artemisia pontica*, което говори за наличие на хемотипове. Популацията от Ябланица съдържа главно 5-хидроксиейдесманолиди, като седем от тях са нови природни вещества. Този тип лактони не са открити даже и в следи в популацията от Г. Бърдо. В последната са намерени 6 нови терпеноида, наречени ротундопонтилиди, които са първите представители на сескитерпенови лактони с необичайния трицикличен ротунданов скелет.

7. Наред със сескитерпеновите лактони са идентифицирани съпътстващи ги природни съединения от следните химични класове:

- висши мастни алкохоли - н-хептакозанол и 1-докозанол;
- ненаситени въглеводороди - тридец-1-ен-3,5,7,9,11-пентаин;

- флавоноиди - пендулетин, цирсимаритин и генкванин;
- захари - глюкоза и захароза;
- сескитерпеноиди - ласидиол-р-метоксибензоат;
- фитостероли - β-ситостерол, стигмастерол и кампестерол;
- тритерпеноиди - тараксерол, тараксерилацетат, α-амирин, α-амиринацетат, урсолова и олеанолова киселини.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Tsankova, E., Todorova, M., Trendafilova, A. and Robeva, P., "Constituents of *Xanthium italicum* roots", **Fitoterapia**, 64, 470 (1993).
2. Tsankova, E., Trendafilova, A., Kujumgiev, A., Galabov, A. and Robeva, P., "Xantanolides of *Xanthium italicum* Moretti and their biological activity", **Z. Naturforsch.**, 49c, 154 (1993).
3. Tsankova, E., Trendafilova, A. and Gussev, Ch., "Chemical constituents of *Cnicus benedictus*L.", **Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.**, 47, 53 (1994).
4. Trendafilova, A., Tsankova, E. and Evstatieva, L., "Seco-eremophilanolides from *Senecio macedonicus*", **Phytochemistry**, 40, 329 (1995).
5. Todorova, M., Tsankova, E., Trendafilova, A. and Gussev, Ch., "Sesquiterpene lactones with the uncommon rotundane skeleton from *Artemisia pontica* L.", **Phytochemistry**, 41, 553 (1995).
6. Trendafilova, A., Todorova, M. and Gussev, Ch., "Eudesmanolides from *Artemisia pontica*", **Phytochemistry**, 42, 469 (1996).

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

на дисертационния труд на н.с. III ст. Антоанета Трендафилова на тема: "Сескитерпенови лактони в някои български лечебни растения от семейство Asteraceae"

Дисертационният труд представлява насочено фундаментално изследване от значение за химията на сескитерпеновите лактони и за фитохимичната характеристика на някои български растения. Резултатите имат отношение и към използването на някои от тези растения в народната медицина, както и към хемосистематиката на изследваните видове.

Приносите на проведените изследвания могат да се обобщят, както следва:

1. В български популации на *Xanthium italicum, Xanthium strumarium, Xanthium spinosum, Cnicus benedictus, Senecio macedonicus, Artemisia pedemontana* и *Artemisia pontica* са намерени общо 41 сескитерпенови лактона, принадлежащи към девет въглеродни скелета. От тях, 15 са нови природни съединения, чиято структура и относителна стереохимия е установена главно чрез спектрални методи.

2. От листата на трите вида *Xanthium* срещани у нас, са изолирани общо осем ксантанолида, пет от които са нови за изследваните видове. Установено е, че корените не съдържат ксантанолиди, даже и в следи. Вместо това от корени на *X. strumarium* и *X. italicum* е изолиран един еремофиланолид, а от *X. spinosum* - един гуайанолид. Очевидното сходство в лактонния състав на *X. strumarium* и *X. italicum*, както в листа така и в корени говори в полза на възприетото таксономично разглеждане на *X. italicum* като подвид на *X. strumarium*.

3. Наред с основния биологичноактивен компонент кницин, от надземната част на култивиран *Cnicus benedictus* са изолирани още три нови за вида сескитерпенови лактона. Установеното пълно сходство в химичния състав на диворастящ и култивиран вид показва, че последния може успешно да се използва за медицински и други цели.

4. За първи път е изследван лактонния състав на *Senecio macedonicus*, ендемичен за Балканския полуостров вид. Намерени са четири сескитерпенови лактона, два от които са нови природни съединения. Те принадлежат към малката група на секомакротолидите, откривани до сега единствено в род *Senecio*.

5. От *Artemisia pedemontana* са изолирани пет гуайанолида и един 1,10-секо-гуайанолид, като два от тях са нови за вида, а единнов за род *Artemisia*.

6. За първи път е изучен лактонният състав на *Artemisia pontic*. Резултатите от изследваните две находища показват съществуването на два хемотипа. Едната популация съдържа главно 5-хидроксиейдесманолиди, седем от които са нови природни съединения. Този тип лактони не присъстват в другата популация. Вместо това са намерени шест нови природни съединения - първите представители на сескитерпенови лактони с необичайния трицикличен ротунданов скелет. Структурата на новите ротундопонтилиди е доказана еднозначно, както и разположението на четвъртия лактонен цикъл.

7. В изследваните видове е установено присъствието на представители на следните класове природни съединения: тритерпеноиди и фитостероли, мастни и ненаситени алкохоли, флавоноиди и захари.