



МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“

Биологически факултет
Катедра „Биохимия и Микробиология“



Катя Христова Николова-Маламова

Дисертации от Scutellaria galericulata
и биологичната им активност

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“
Професионално направление: 4.3 Биологически науки (Биохимия)

Научен ръководител: доц. д-р Петко Бозов



Пловдив, 2019

Дисертационният труд съдържа 183 страници на формат А4, 10 таблици и 35 фигури и 151 литературни източника.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на **10.07.2019** г. от **11** часа в зала „Компас“ на ПУ „Паисий Хилендарски“, ул. „Цар Асен“ № 24, Пловдив.

Материалите по защитата са на разположение в деканата на Биологически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“, град Пловдив, ул. „Тодор Самодумов“ № 2.

Изразявам своята сърдечна благодарност към моя научен ръководител доц. д-р Петко Бозов за вниманието, търпението и оказаната помощ при разработването и оформянето на настоящия дисертационен труд.

*Искрено благодаря и на моя колега Иван Стойков от БАН – София за помощта, която ми оказа при тестването за цитотоксичност на някои дитерпени, изолирани от представители на семейство *Latiaseae*, както и за дадените съвети и наставления.*

ВЪВЕДЕНИЕ

Растенията от род *Scutellaria* (превара, тибетейки) принадлежат към семейство *Lamiaceae* (*Labiatae*, Устноцветни) [Cantor et al., 2009]. Те наброяват около 360 вида – разпространени по целия свят, с изключение на Южна Африка, [Йорданов et al., 1989; Willis, 1966; Greuter et al., 1986; Shang et al., 2010; Cantor et al., 2009].

В България род *Scutellaria* обхваща осем вида. Благодарение на съдържащите се в тях биологично-активни химични съединения, растенията от род *Scutellaria* се използват от най-дълбока древност [Dai et al., 2007-b].

Екстракти от корени и надземни части на растенията под формата на отвара са ефективно средство срещу дизентерия (от вида *S. baicalensis*), стафилококи (от *S. barbata*), артериална хипертония (от *S. orientalis*), тумори, хепатит, цироза на черния дроб (от *Scutellaria rivularis*) и др. [Bruno et al., 2002-b]. Поредица съединения от род *Scutellaria* притежават и противотуморен, хепатопротективен, антиоксидантен, противовъзпалителен, антиконвулсивен, антибактериален и антивирусен ефект [Dai et al., 2007-b; Dai et al., 2008-a].

Видовете, принадлежащи към рода *Scutellaria* са богат източник на *нео*-клероданови дитерпени [Coll&Tandrón, 2008; Simmonds et al., 1989] и флавоноиди [Malikov et al., 2002; Parajuli et al., 2009], които предизвикват голям интерес с многообразието от скелети и с разнообразната си биологична активност, по-специално като мощни антифиданти [Blaney et al., 1988; Gebbinck et al., 2002].

В България фитохимичните изследвания на род *Scutellaria* започват, през 1991 г., когато колектив от ПУ „Паисий Хилендарски“, изолира от *Scutellaria alpina* (Алпийска превара) първия *нео*-клероданов дитерпеноид, скуталпин А [Vozov et al., 1993].

През 2012 година, Vozov и съавтори публикуват още девет *нео*-клероданови дитерпени, получени от *Scutellaria galericulata* [Vozov et al., 2014-b; Vozov et al., 2014-c]. Екипът установява присъствие в ацетоновия екстракт на растението, на сложен коктейл от минорни дитерпени, които не са изолирани.

Настоящият дисертационен труд е продължение на изследването на *Scutellaria galericulata* в търсене на нови *нео*-клероданови антифиданти, съдържащи се в минорни количества в растението.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Цел на изследването

Целта на настоящия дисертационен труд е изолиране, разделяне и пречистване на минорните *нео*-клероданови дитерпеноиди от надземните части на *Scutellaria galericulata*, идентифициране на съединенията и цялостно охарактеризиране на структурата и стереохимията на новите вещества.

Тестване на антифидантната, антитумурната и цитотоксичната активност на *нео*-клероданови дитерпени, изолирани от видове на род *Scutellaria*. Установяване на някои забележими аспекти от взаимовръзката структура – биологична активност на *нео*-клеродановите съединения.

Задачи на изследването

За реализиране целта на дисертационния труд са планирани задачите:

1. Екстрахиране на природните органични съединения и изолиране на горчивата фракция, обогатена на *нео*-клероданови дитерпеноиди от *Scutellaria galericulata*;
2. Разделяне и пречистване на дитерпеноидите до индивидуални чисти вещества;
3. Идентифициране на дитерпеноидите и охарактеризиране структурата и стереохимията на новите съединения;
4. Тестване на биологичните свойства на *нео*-клероданови дитерпеноиди, изолирани в по-големи количества.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

1. МЕТОДИ ЗА ИЗОЛИРАНЕ И РАЗДЕЛЯНЕ НА БИОЛОГИЧНО-АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА

1.1. Получане на горчива фракция от биологично-активни вещества

Настоящите изследвания са свързани с фитохимичното изследване на *Scutellaria galericulata* от сем. *Lamiaceae*, събрана в района на Плевен. Дитерпеновите съединения се съдържат главно в листата и стъблата на растенията от род *Scutellaria*. За извличането им, растителният материал се суши на сянка, смила се фино и се екстрахира

изчерпателно чрез накисване за една седмица в ацетон. Екстрактът се концентрира под вакуум и температура не по-висока от 45°C, разрежда се с вода (1:1) и се оставя за 24 часа в хладилник при 4°C. При тези условия хлорофилът и восъците се утаяват, а терпеновите съединения остават във водно-ацетонов разтвор. След филтруване на утайката, филтратът се екстрахира с хлороформ до пълно извличане на биологично-активните вещества (отрицателна проба на ТСХ). Тъмно-зелената утайка отново се разтваря в ацетон, разрежда се с вода и се оставя при 4°C. Тази операция се повтаря до пълно извличане на терпеноидите. Обединените хлороформени екстракти се сушат над безводен Na₂SO₄ и се дестилират под вакуум до получаването на жълто-кафяв смолообразен продукт, наречен горчива фракция поради горчивия вкус на *нео*-клеродановите дитерпеноиди.

1.2. Разделяне на горчивата фракция до индивидуални съединения

Фракцията, съдържаща биологично-активни вещества се разпръсква с дезактивиран силикагел и се хроматографира на стъклена колона (диаметър от 1 до 6 cm) запълнена със силикагел Merck № 7734, дезактивиран с 10% H₂O, w/w. Първоначалният елуент за деленето на сместа е петролев етер, с който се отстраняват слабо полярните вещества като въглеводороди и восъци. Процесът на разделяне на компонентите на горчивата фракция продължава с елуиране със смес от DCM/MeOH с градиент от 10:0 до 9.8:0.2. Обикновено не се получават индивидуални вещества след първото хроматографиране. Получените подфракции се подлагат на рехроматографиране на КХ, или на ПТСХ със смеси от горните разтворители с нарастваща полярност. Изкристилизираните съединения обикновено се прекристилизират от Me₂CO, EtOAc или MeOH.

За разделяне на смеси в малки количества чрез ПТСХ са използвани плаки Merck 2 mm, № 5745, с елуент – смеси от EtOAc/ПЕ в съотношение 2:8 ÷ 1:1 и CH₂Cl₂/MeOH в съотношение 9.9:0.1 ÷ 9.7:0.3.

Силикагел 60 F254 алуминиеви плаки (Merck, Darmstadt, Germany) са използвани за ТСХ мониторинг.

2. СПЕКТРАЛНИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ СТРУКТУРАТА И СТЕРЕОХИМИЯТА НА СЪЕДИНЕНИЯТА

Изолираните чисти вещества се охарактеризират чрез физико-химичните им показатели (Т.т., R_f – стойност, $[\alpha]_D^{22}$), и чрез спектрални изследвания (ИЧ и ЯМР спектроскопия, и Мас – спектрометрия). Получените резултати са прецизно анализирани и сравнени с литературните, при някои от съединенията са използвани и автентични проби. Непознатите дитерпеноиди са допълнително анализирани чрез спектрални изследвания за доказване на структурата и стереохимията на съединенията.

3. ТЕСТВАНЕ НА БИОЛОГИЧНИ АКТИВНОСТИ

3.1. Антифидантна активност

Биологичните изпитания се извършват в петриеви стъкла с използване на картофени дискове. Изчислява се коефициент на хранене $FR = CTD/CCD$. За получаване на сравнителни резултати се използва FR_{50} – коефициент на хранене, при който е изконсумирано 50% от контролните дискове във всяко блюдо (CCD_{50}).

3.2. Антитуморна и цитотоксична активност

Антитуморната активност се тества срещу туморни клетъчни линии по белите дробове, а цитотоксичността се регистрира срещу нормални клетъчни линии от пъпна връв. Използва се метода на МТТ (фурмазанови лилави кристали) анализа. Интензивността на лилавото оцветяване се измерва от ELISA READER. Данните се обработват с програмата GraphPad Prism. Активността се оценя в стойност на IC_{50} .

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. ИЗВЛИЧАНЕ НА *HEO*-КЛЕРОДАНОВИТЕ ДИТЕРПЕНОИДИ ОТ НАДЗЕМНИТЕ ЧАСТИ НА *SCUTELLARIA GALERICULATA*

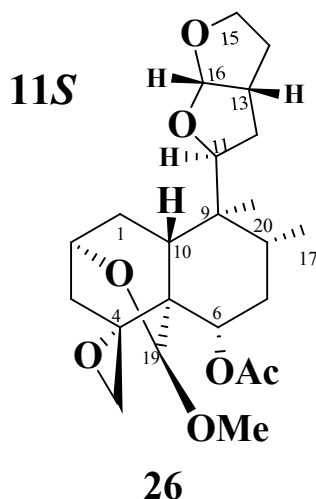
Растителният материал – надземните части от *Scutellaria galericulata* (5.2 kg), е събран през юли 2014 година в района на Плевен, България, определен и депозиран в хербария на Аграрен университет – Пловдив, България, под № 7234/406.

Въздушно-сухата и фино смляна дрога е екстрахирана с Me_2CO (2 x 15L) при стайна температура в продължение на една седмица. След

филтруване, разтворителят е изпарен при понижено налягане и ниска температура (40°C). Получената смола (225 g) е разтворена в 1L разводнен Me_2CO (40% H_2O , v/v) и разтворът е охладен до 4°C в продължение на 24 часа. Неразтворимите при тези условия вещества, като хлорофил и восъци са отделени чрез филтруване. Филтратът е екстрахиран с CHCl_3 (3 x 300 ml). Органичният слой е изсушен с безводен Na_2SO_4 , след което е филтруван и изпарен под вакуум. Отделеният сух остатък (17.9 g) е наречен горчива фракция, тъй като *нео*-клеродановите дитерпеноиди са със силно горчив вкус.

2. РАЗДЕЛЯНЕ НА СЪЕДИНЕНИЯТА ДО ИНДИВИДУАЛНИ ВЕЩЕСТВА

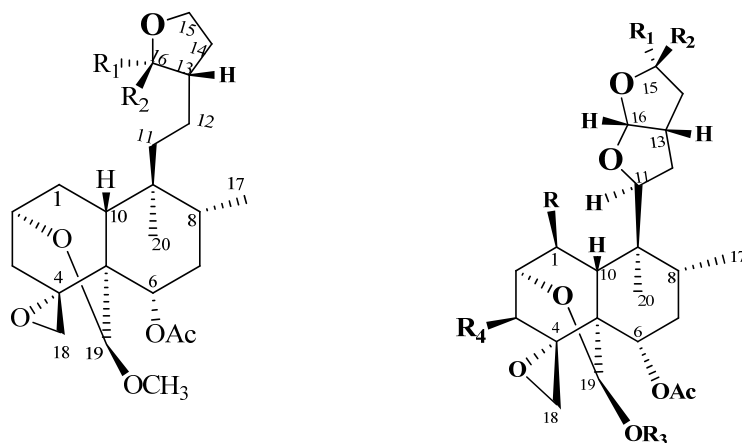
За разделяне на горчивата фракция до чисти вещества, тя е хроматографирана на колона запълнена със силикагел (Merck № 7734, дезактивирана с 10% H_2O , 350 g) и елуирана с CH_2Cl_2 -MeOH в съотношение от 10:0 до 9.9:0.1. Първоначално сместа от дитерпени е разделена на пет фракции – I (150 mg), II (450 mg), III (140 mg), IV (83 mg) и V (250 mg). В резултат на рехроматографиране на фракция II с елуент CH_2Cl_2 са получени две подфракции (IIa и IIб), даващи хомогенно петно на TLC. От подфракция IIa е изолиран 36 mg скуталтисин В (26) (Фигура 1).



Фигура 1. Структура на *нео*-клеродановия дитерпеноид скуталтисин В (26)

От подфракция IIб (чрез ТСХ, при използване на различни разтворители и смеси от разтворители и чрез кристализация) е получена 15.3 mg неделима смес, в съотношение 1:2, на С-16 епимери – скутегалерин С (207) и скутегалерин D (208) (Фигура 2). От фракция IV, пре-

чистена на препаративна TLC с използване на EtOAc, като елуент са изолирани 8 mg от нов дитерпен – скутегалерин E (**209**) (Фигура 2). От него чрез прекристализация с ацетон са изолирани 6 mg от **209**. В остатъчните луги на **209** е наблюдавано петно с R_f стойност, различна от тази на всички до сега изолирани вещества.



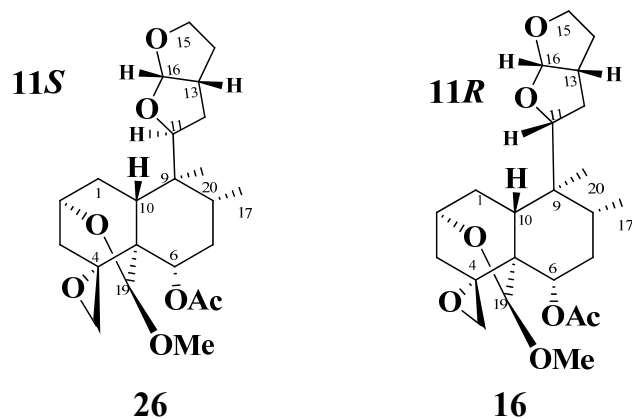
Съединение	R ₁	R ₂	Съединение	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
скутегалерин С (207):	OMe	H	скутегалерин F (210):	OTig	H	OH	Ac	H
скутегалерин D (208):	H	OMe	скутегалерин G (211):	OTig	OH	H	Ac	H
			скутегалерин E (209):	H	H	H	Me	HO

Фигура 2. Структури на *нео*-клеродановите дитерпеноиди скутегалерини С (**207**)/D (**208**), скутегалерин E (**209**) и скутегалерини F (**210**)/G (**211**)

След няколкократно рехроматографиране на ТСХ, при същите условия, е изолирана 10 mg хомогенна субстанция на два нови минорни дитерпеноида – скутегалерини F (**210**) и G (**211**), които са епимери при C-15 (Фигура 2).

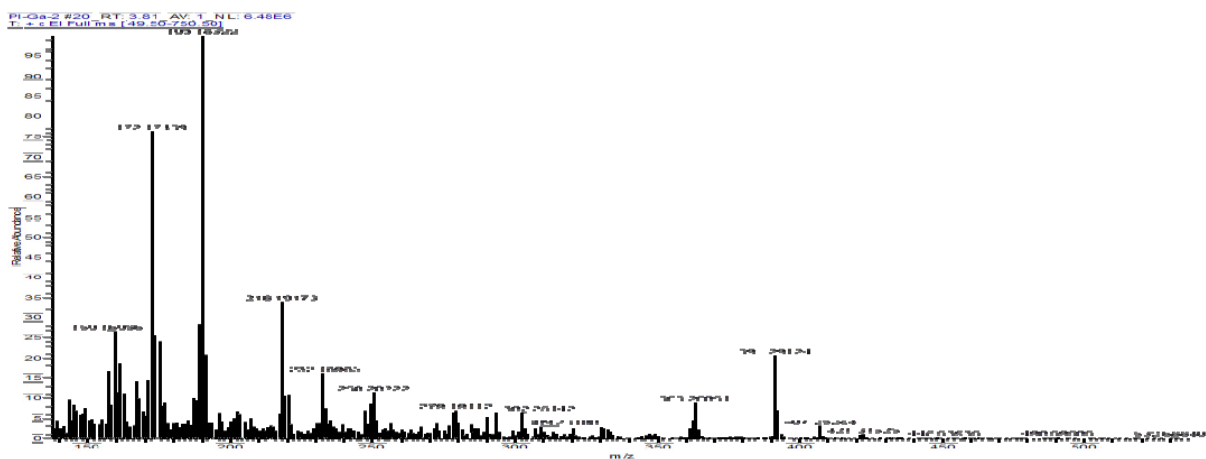
3. ДОКАЗВАНЕ НА СТРУКТУРАТА И СТЕРЕОХИМИЯТА НА ИЗОЛИРАНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ

От положителния молекулен йон $[M+1]^+$ с маса m/z 421.3153 в HR-ESIMS спектър на субстанция **26** (Фигура 4), заедно с преброените двадесет и три въглеродни атоми в ^{13}C -ЯМР спектър (Фигура 5), е съставена молекулната формула $C_{23}H_{32}O_7$ (изчислена за $C_{23}H_{33}O_7$, 421.2217).



Фигура 3. Структури на епимерните *нео*-клероданови дитерпеноиди скуталтисин В (**26**) и С (**16**)

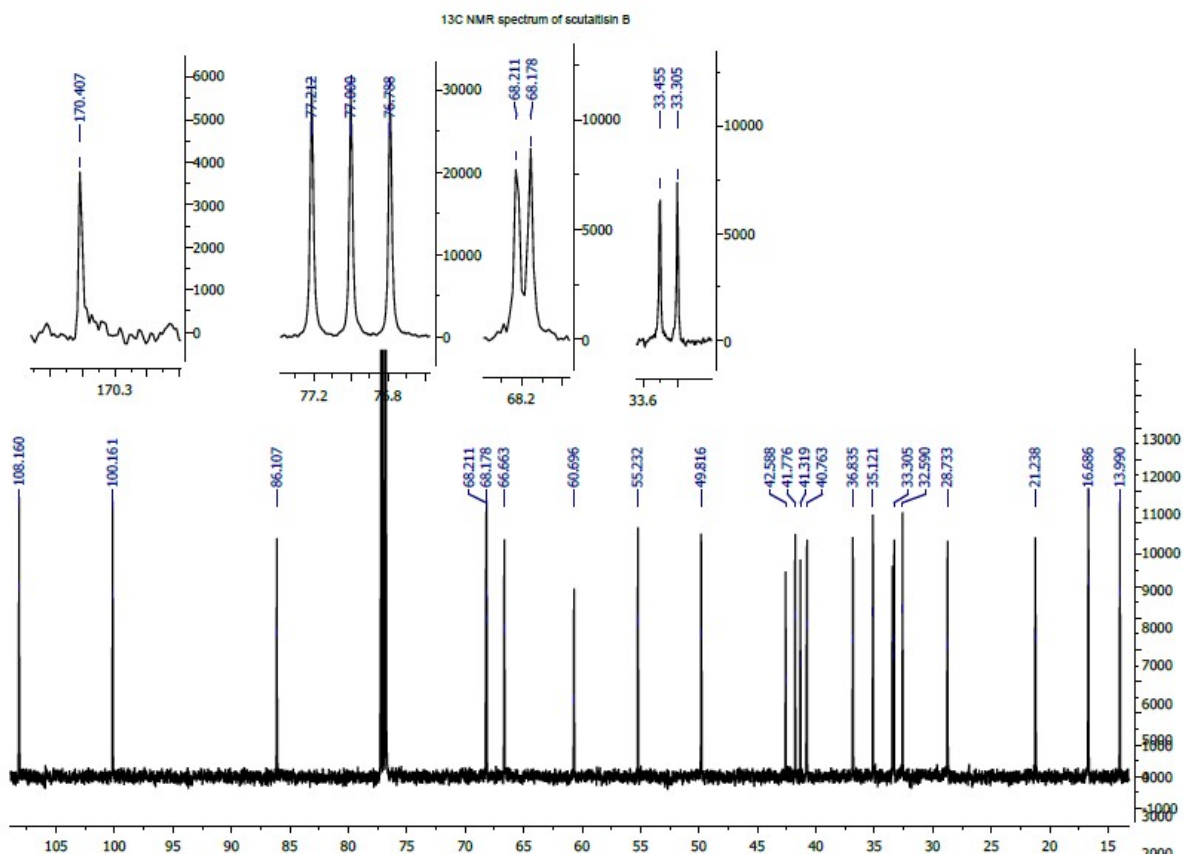
При сравняване на ^1H спектъра (Фигура 7) на съединение **26** с протонните спектри на дитерпени, изолирани от *S. altissima* се установи, че то е идентично с единия от компонентите на епимерната смес – скуталтисин В/скуталтисин С, получена по-рано от Vozov и Coll в същото растение [Vozov&Coll, 2015].



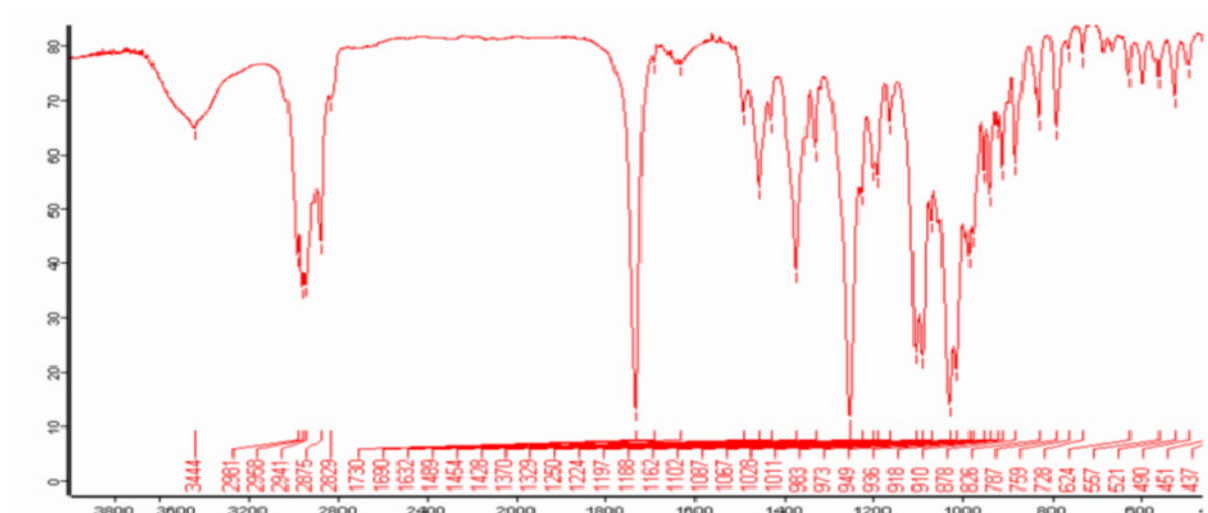
Фигура 4. HR-ESIMS спектър на скуталтисин В (**26**)

В мас-спектъра се откриват фрагменти, получени при отцепване на метилова група при m/z 407 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, метокси група при m/z 391 $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$ и на ацетокси група m/z 363 $[\text{M}-\text{OOCCH}_3]^+$.

Последната се потвърждава от абсорбцията за карбонилна група в ИЧ-спектъра на съединението при 1730 cm^{-1} (Фигура 6). В спектъра липсва абсорбция за хидроксилна група и двойна връзка.



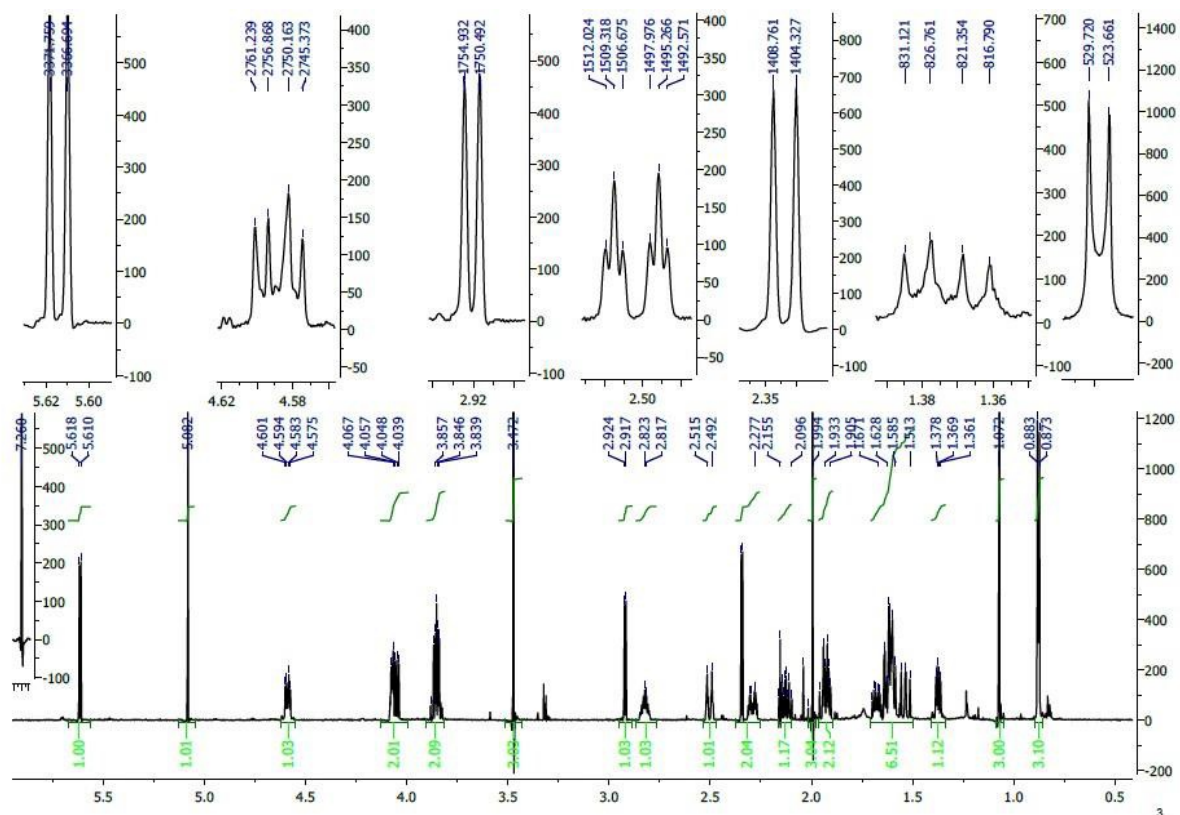
Фигура 5. ^{13}C -ЯМР спектър на скуталтисин В с разгънати секции



Фигура 6. ИЧ – спектър на скуталтисин В (26)

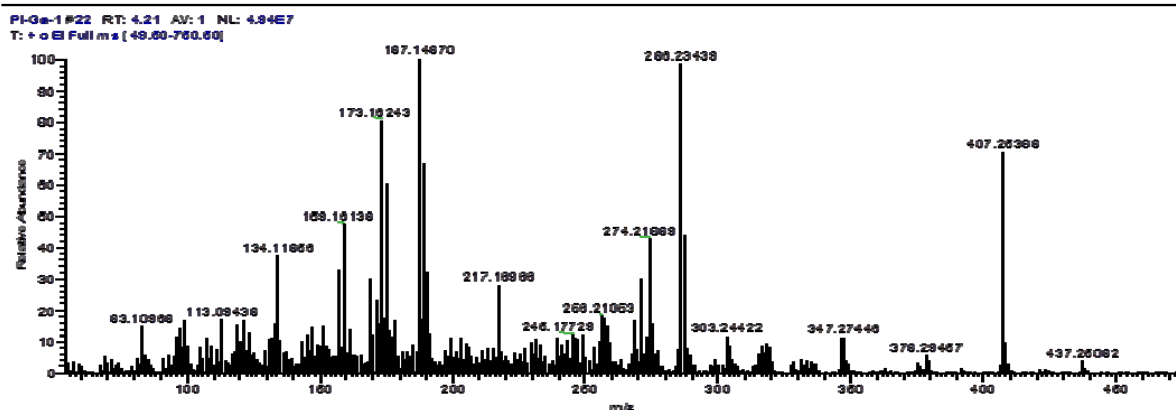
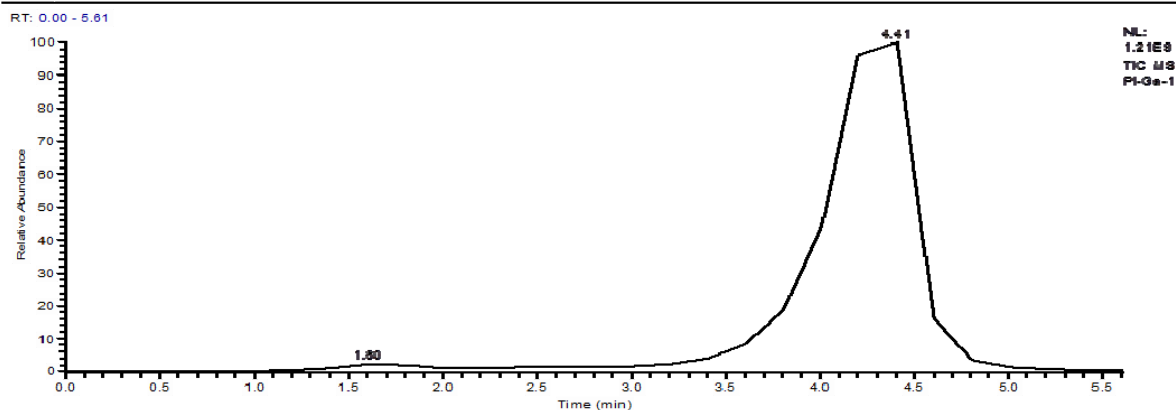
В протонния спектър на скуталтисин В се наблюдават характерните сигнали за декалиново ядро с С-4–С-18 оксиранов пръстен и тетраhydroфуофуранова система в страничната верига С-11–С-16, при δ_{H} 1.93 (1H dd; $J = 11.4, 4.4$; H-10); 0.88 (3H d, $J = 6.1$, CH₃-17); 1.07

(3H s, CH₃-20); 2.92 (1H d, *J* = 4.4, H-18b); 2.34 (1H d, *J* = 4.4; H-18a); 2.82 (1H tddd; *J* = 9.2, 5.0, 3.7, 1.6; H-13) и 5.61 (1H d; *J* = 5.1, H-16).



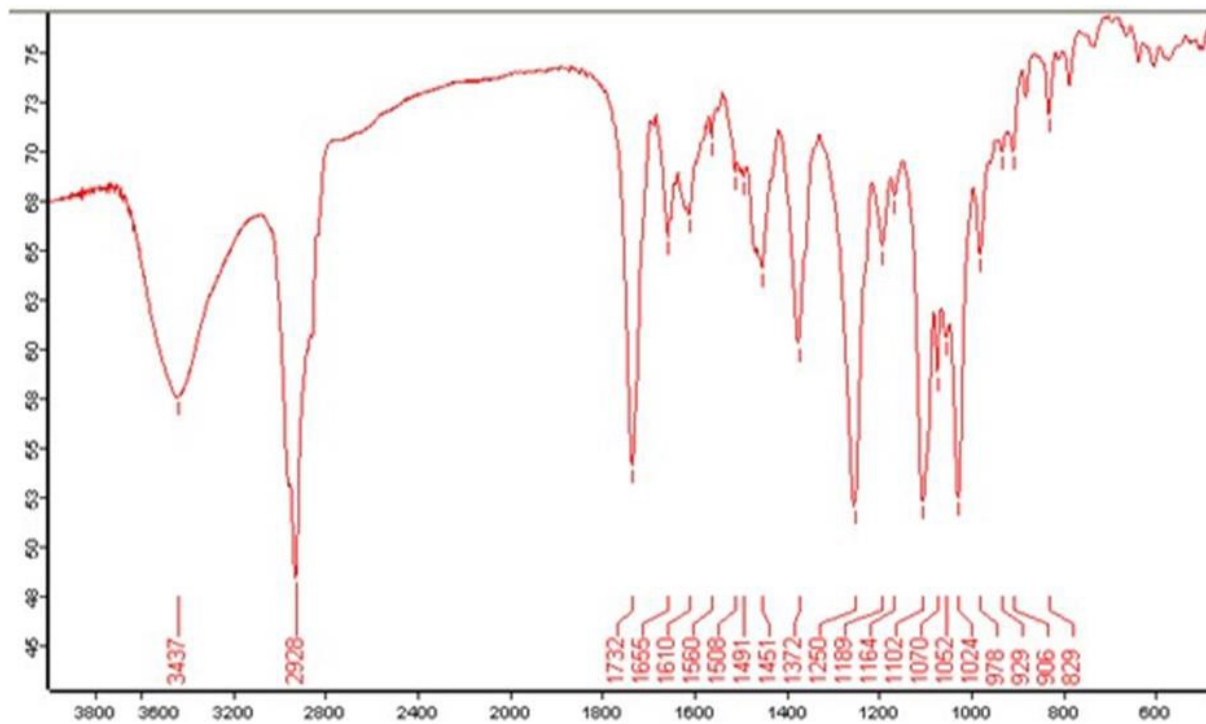
Фигура 7. ¹H-ЯМР – спектър на скуталтисин В с разгънати секции

В спектъра лесно се откриват сигналите за ацетатна δ_{H} 1.99 (3H s, CH₃CO-6) и метокси група при 3.47 (3H s, CH₃O-19), както и за 2 α ,19-ацетален пръстен (1H dtd; *J* = 5.1, 2.4, 0.7; H-2 β) и 5.08 (1H s, H-19 α). Тези отнасяния се потвърждават от сигналите във ¹³C-ЯМР спектъра. Характерни са пиковите при δ_{C} 170.41 за карбонилен С-атом и 21.24 (CH₃) от ацетатния остатък и за въглеродните атоми, свързани с кислороден атом при δ_{C} 66.66 (C-2), 60.70 (C-4), 66.18 (C-6), 86.11 (C-11), 68.21 (C-15), 108.16 (C-16) и 100.16 (C-19). Всички въглеродни атоми са отнесени еднозначно с помощта на 2D-ЯМР спектрите – HSQC, HMBC, COSY и NOESY.



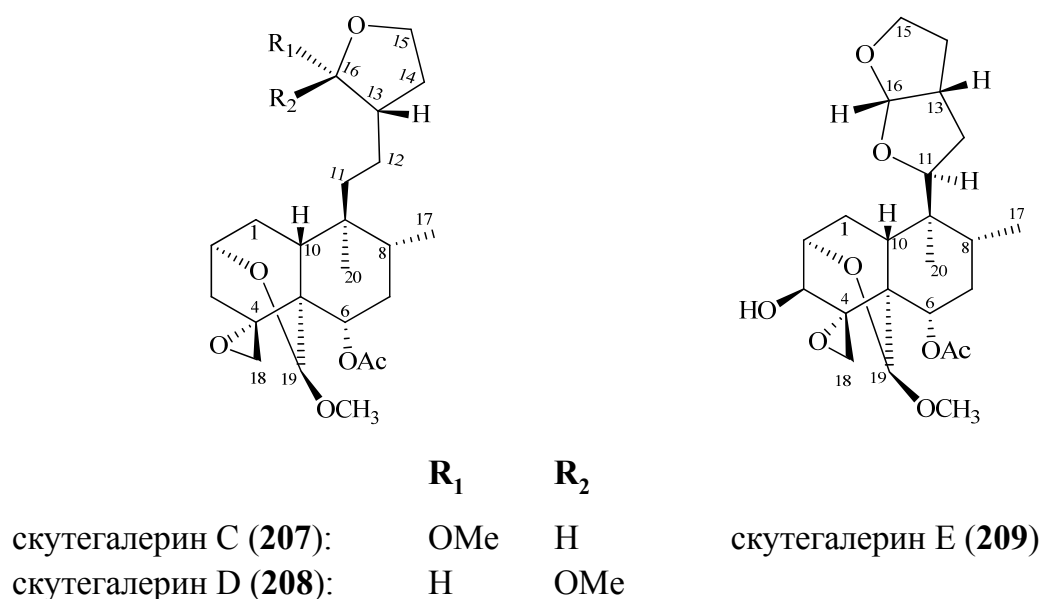
Фигура 8. HR-ESIMS – спектър на скутегалерини C + D (207 + 208) епимерна смес

Съотношението в количеството на двата епимера 1:1 е довело до затруднения в отнасянето на сигналите за някои въглеродни атоми.



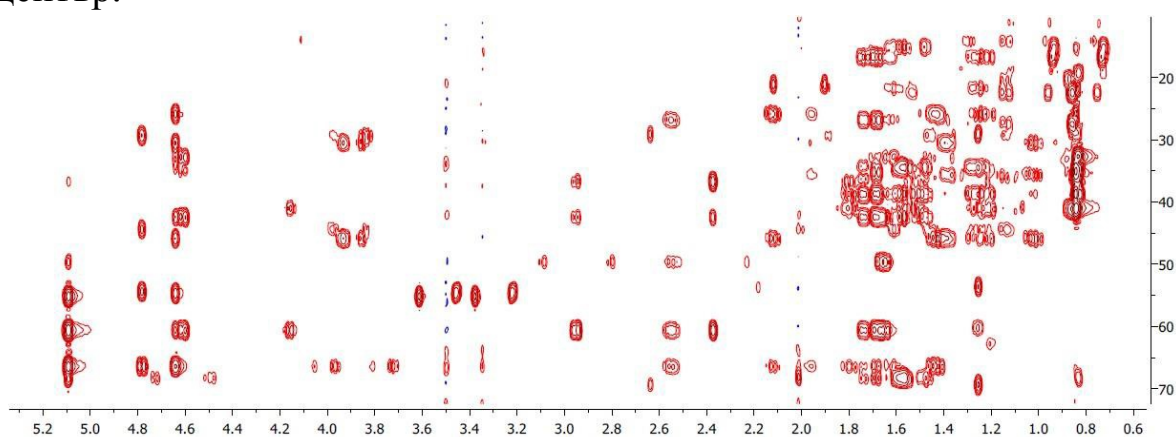
Фигура 9. ИЧ–спектър на скутегалерини C + D

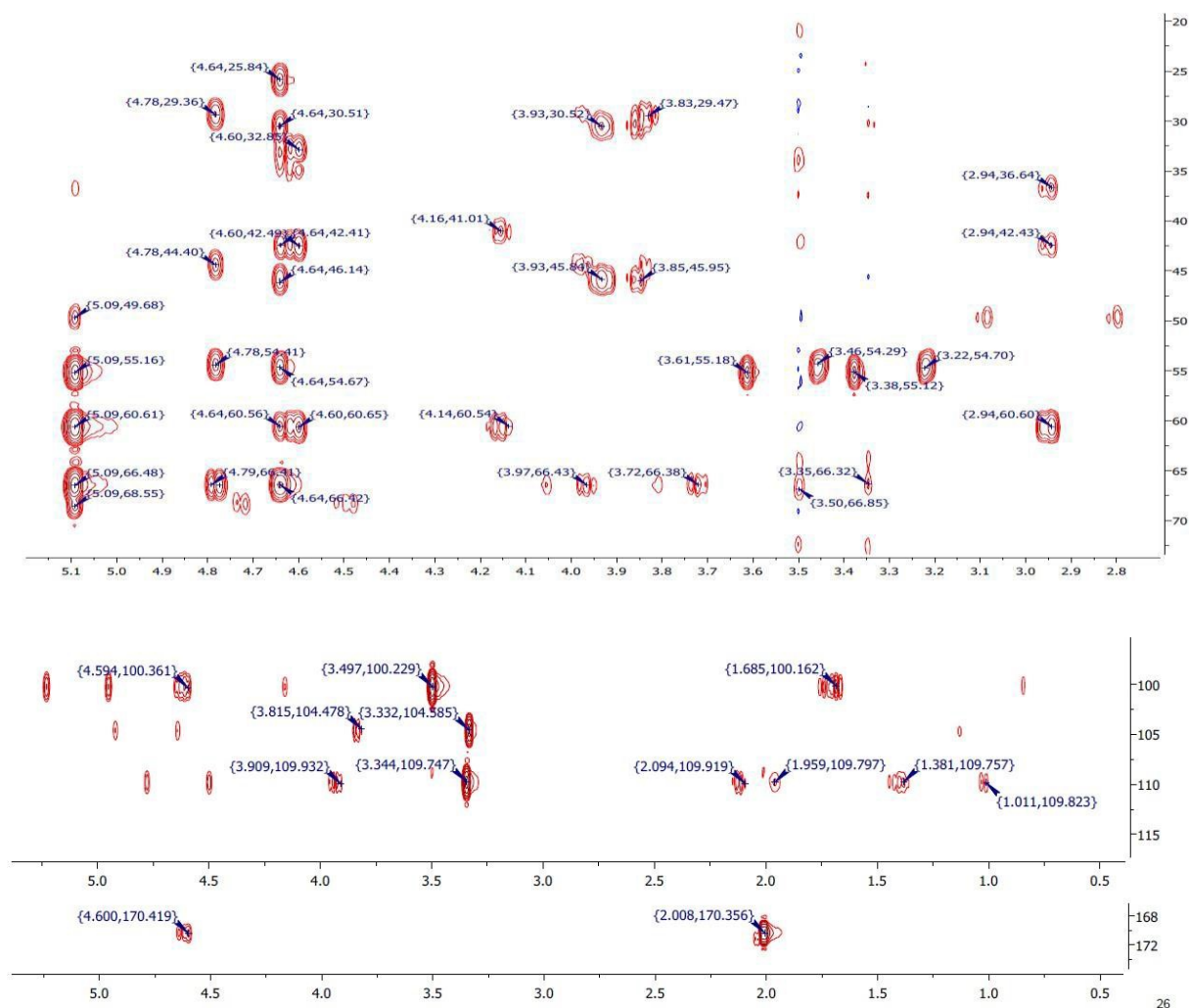
Сега, с всички ^1H - и ^{13}C -ЯМР сигнали, отнесени недвусмислено за получения в индивидуално състояние скуталтисин В, се установи че в **26** сигналите при δ_c 33.45 и 33.30, се дължат на С-7 и С-12 и показват погрешното заключение направено, при предишното отнасяне на двата сигнала δ_c 33.38/33.55 за С-7 (Таблица 1). Освен това е коригирано и отнасянето за С-9 при δ_c 41.3 (докладвани по-рано 42.47/41.67).



Фигура 10. Структури на изолирани *нео*-клероданови дитерпеноиди

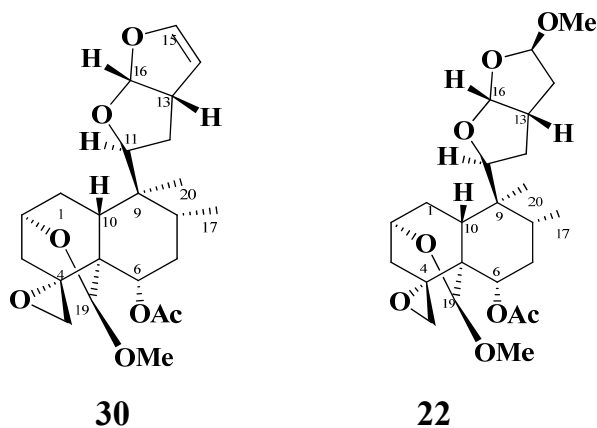
Двата С-16 метоксила показват по-голяма разлика в стойността на химическото им изместване, тъй като са по-близо до епимерния център.



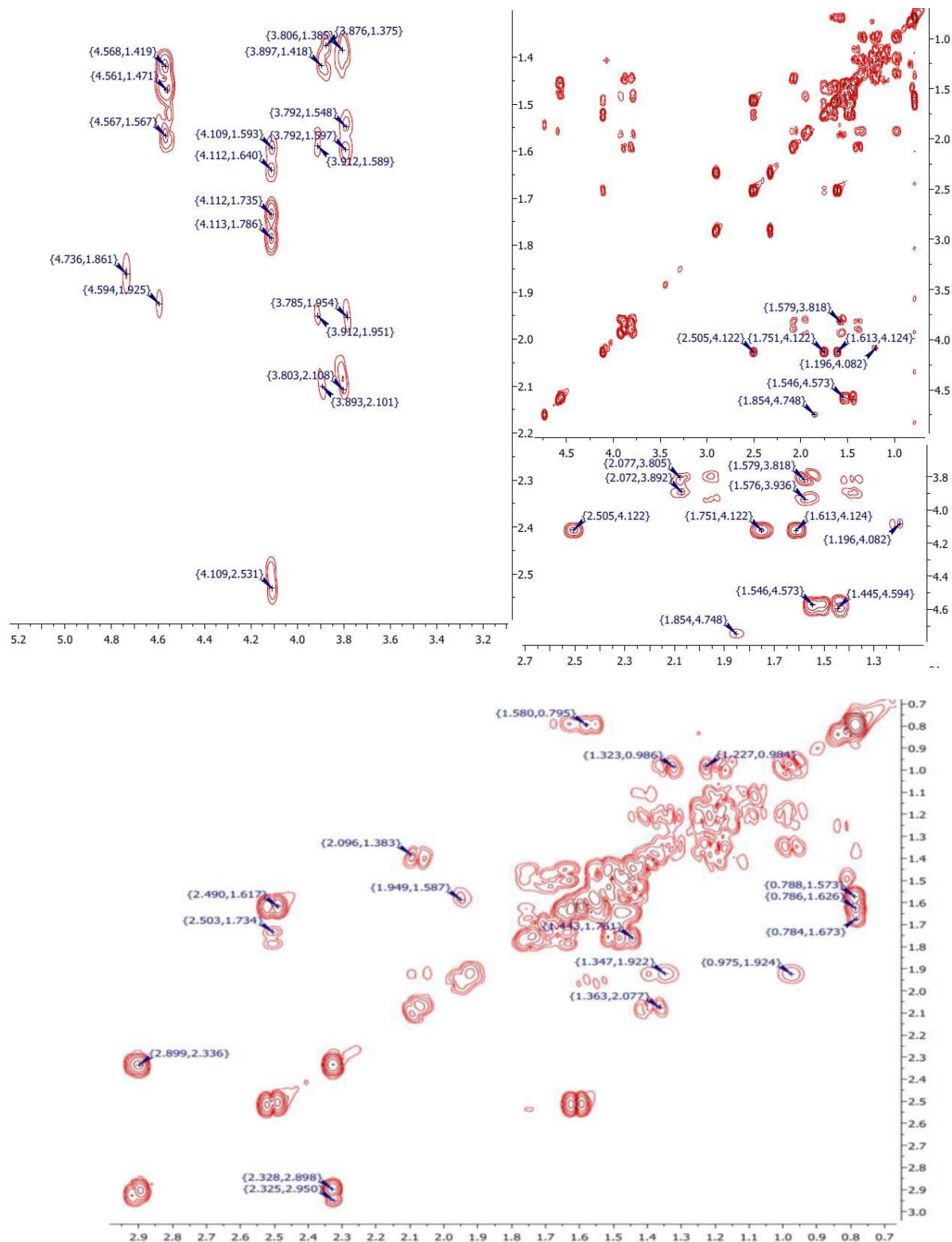


Фигура 11. НМВС – спектър на скутегалерини С + D (**207** + **208**) с разширени секции

Тези данни заедно с някои други дублирани сигнали [δ 4.73/4.59 (d, H-16); 5.05/5.04 (s, H-19 α)] на **207** и **208**, показват наличие на смес от два епимера (1:2), които имат идентично декалиново ядро с *нео*-клеродановите дитерпени – скуполини Н (**30**) и I (**22**) (Фигура 12).

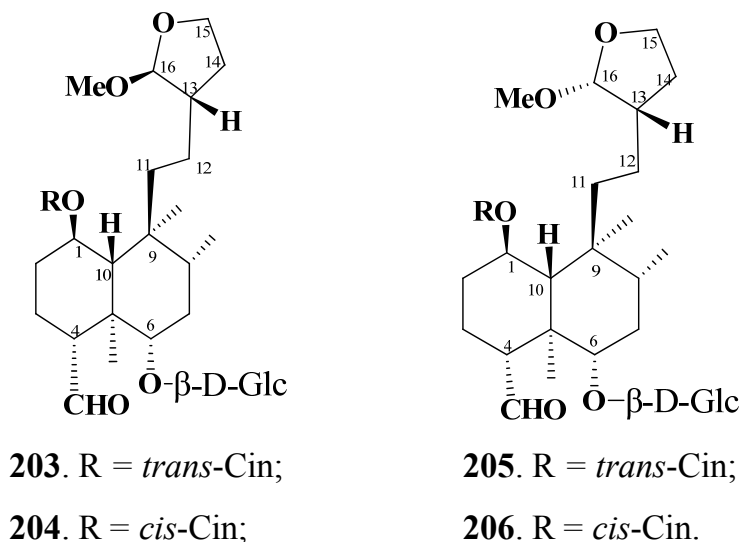


Фигура 12. Структури на *нео*-клероданови дитерпеноиди скуполини Н (**30**) и I (**22**)

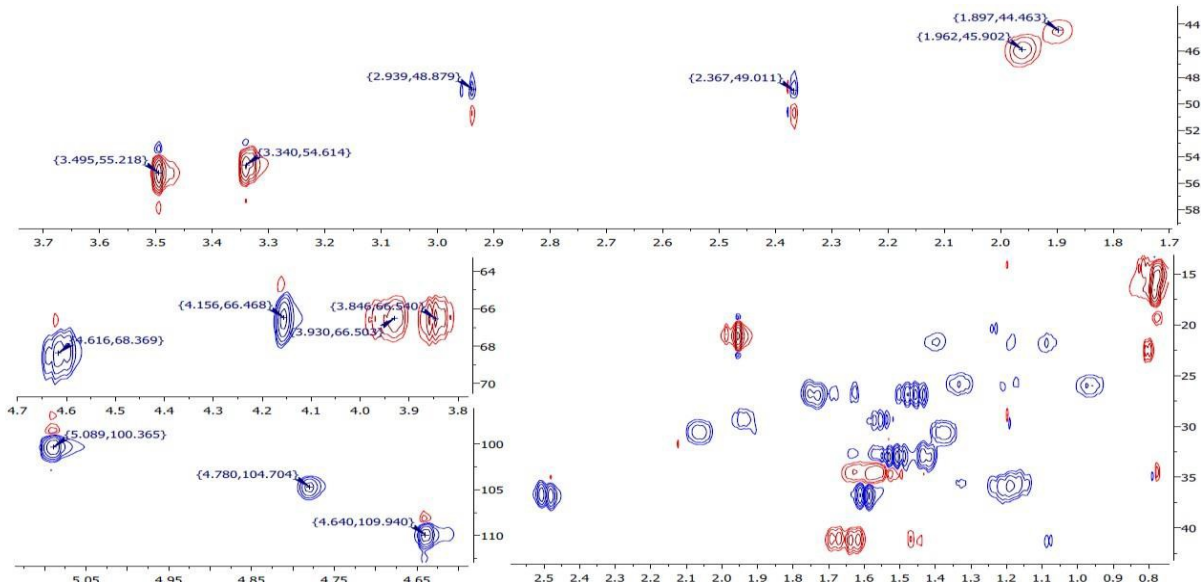


Фигура 13. COSY – спектър на скутегалерини C + D с разширени секции

Шестте атома от страничната верига C-11–C-16 участват в изграждането на лактолен пръстен, сключен между C-15–C-16, както докладваните от Kizu и сътрудници съединения скутерепенозиди A₁-A₄ (203 – 206) [Kizu et al., 1998] (Фигура 14).



Фигура 14. Структури на дитерпеноидите скутерепенозиди A₁-A₄ (203 – 206)



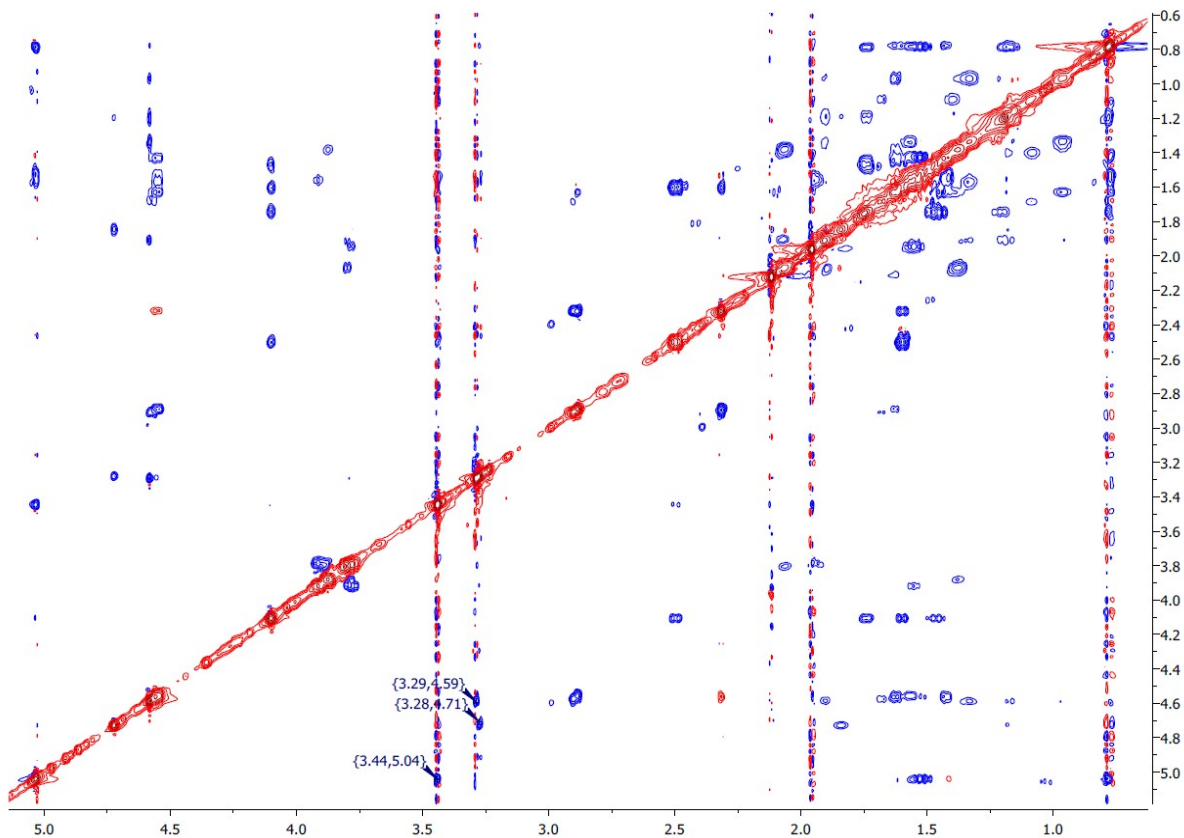
Фигура 15. HSQC – спектър на скутегалерини C + D с разширени секции

Двата дитерпеноида **207** и **208** се различават един от друг по конфигурацията на асиметричния въглерод C-16. В 16*R* епимера (**207**) този въглерод се явява при δ_C 104.6, а в 16*S* епимера (**208**) при δ_C 109.8, което дава отклонение в стойността на химичното отместване от 5.2 ppm. На базата на всички спектрални данни, за компонентите на епимерната смес, са определени структурите **207** и **208**.

Таблица 1. ЯМР данни за съединения – 26, 35, 207 – 209^a

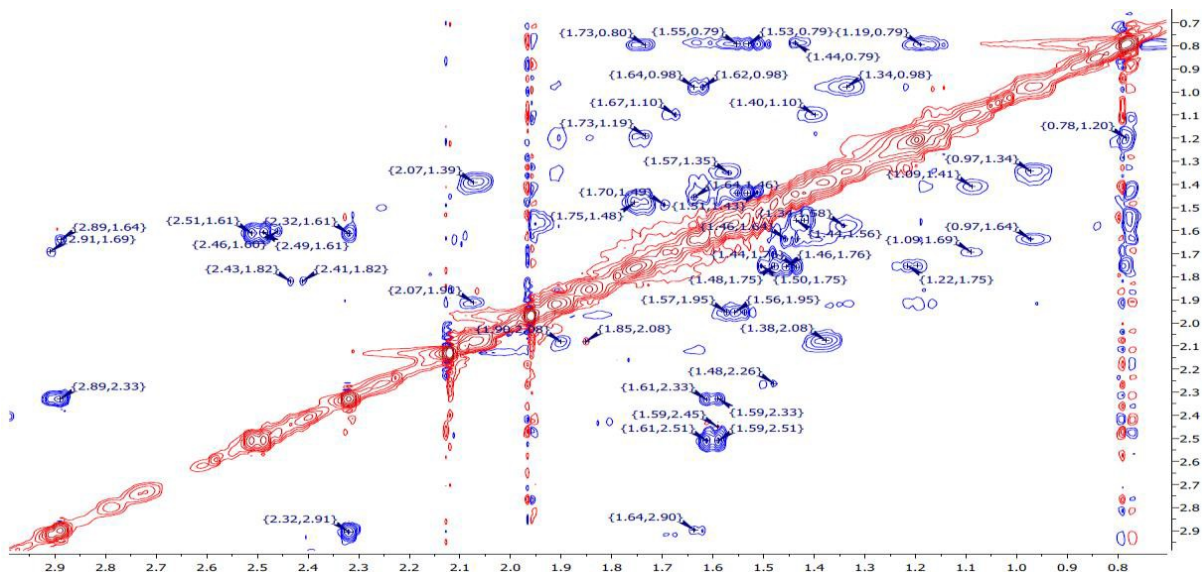
Позиция	26		207		208		209		нео-аюгапирин А (35)	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
1a	28.7	1.53 dd (14.2, 11.7)	26.9 ^e	1.47 ^d	26.9 ^e	1.47 ^d	22.9	1.83 dd (14.0, 11.6)	22.6	1.90 ddd, 14.6, 11.5, 0.9
1b		2.29 dt ^b d (14.2, 4.8, 3.0)		1.75 dm (13.2)		1.75 dm (13.2)		2.25 dddd (14.1, 5.0, 3.3, 2.0)		2.30 dddd, 14.7, 4.9, 4.0, 2.1
2	66.7	4.07 dt ^b d (5.1, 2.4, 0.7)	66.6	4.116 dt ^b (4.4, 2.2)	66.5	4.109 dt ^b (4.4, 2.2)	70.7	3.89 br dd (4.7, 2.9)	71.0	3.98 ddd, 4.9, 3.1, 0.8
3a	36.8	1.63 dd (14.0, 2.7)	36.81	1.61 ^d	36.77	1.61 ^d	70.1	4.39 br s (w _{1/2} =5.9)	70.1	4.40 ddd, 5.1, 2.9, 1.9
3b		2.50 dt ^b (14.1, 2.7)		2.503 dt ^b (14.0, 2.6)		2.507 dt ^b (14.2, 2.6)				
4	60.7		60.7 ^e		60.7 ^e		66.1		65.9	
5	42.6		42.5 ^e		42.5 ^e		43.5		42.5	
6	68.2	4.59 dd (11.5, 4.4)	68.4	4.58 dd (12.2, 4.9)	66.3	4.56 dd (11.5, 4.6)	68.0 ^f	4.61 dd (11.7, 4.3)	68.2	4.63 dd, 11.9, 4.7
7a	33.5	1.37 dd (9.9, 4.5)	33.0	1.44 ^d	32.9	1.44 ^d	33.7 ^e	1.41 dd (9.8, 4.6)	33.3	1.39 ddd, 13.1, 4.6, 3.0
7b		1.62 ^d		1.54 ^d		1.54 ^d		1.57 ^d		1.65 ^c
8	35.1	1.62 ^d	34.45	1.58 ^d	34.54	1.58 ^d	35.5	1.56 ^d	35.4	1.53 dqd 12.8, 6.6, 3.1
9	41.3		38.84		38.77		41.2		41.2	
10	40.8	1.93 ^d dd (11.4, 4.4)	41.0	1.70 dd (11.2, 4.1)	41.1	1.65 dd (11.3, 4.2)	40.8	1.89 dd (11.7, 3.1)	40.7	1.98 dd, 11.6, 3.9
11	86.1	4.05 dd (11.0, 5.7)	36.2	1.21 ^d (2H)	35.6	1.21 ^d (2H)	86.5	4.08 dd (11.0, 5.6)	86.4	4.09 dd, 11.0, 5.7
12a	33.3	1.61 ^d	21.8	1.10 ^d	25.9	0.975 ^b dd (12.6, 8.2, 4.5)	32.6 ^e	1.61 ddd (12.6, 5.5, 1.3)	33.3	1.65 ^c
12b		1.93 ^d		1.41 ^d		1.35 ^d		1.90 ddd (12.6, 11.1, 9.3)		1.92 ^c
13	41.8	2.82 ^b ddd (9.2, 5.0, 3.7, 1.6)	44.5	1.85 m	45.9	1.92 ^d	41.80	2.83 ^b ddd (9.3, 5.1, 4.6, 1.4)	41.8	2.84 br ^b ddd, 9.2, 5.1, 3.0, 1.2
14a	32.6	1.68 ddd ^b (12.6, 6.0, 4.3)	29.4	1.57 ^d	30.6	1.40 ^d	33.2 ^e	1.68 ddd ^b (12.6, 6.2, 4.2)	32.6	1.72 ^c
14b		2.13 ddd ^b (12.8, 9.1, 8.4)		1.93 ^d		2.07 dt ^b q (16.3, 7.5, 4.0)		2.14 ddd ^b (12.7, 9.2, 8.2)		2.15 ddd ^b , 12.7, 9.2, 8.3
15a	68.2	ca 3.850 ddd (8.2, 7.8, 4.5)	66.5 ^e	3.79 dt ^b (10.2, 8.2)	66.5 ^e	3.81 d (8.2, 7.4)	68.3 ^f	3.857 ddd (8.6, 8.0, 4.5)	68.3	3.8765 ddd, 8.8, 8.7, 6.6
15b		ca 3.856 ddd (8.9, 7.8, 6.2)		3.92 ddd (9.3, 8.2, 3.0)		3.88 ^b d (8.2, 4.1)		3.866 ddd (8.6, 8.5, 6.3)		3.8617 ddd, 8.7, 8.1, 4.5
16	108.2	5.61 d (5.1)	104.6	4.73 d (4.5)	109.8	4.59 d (1.7)	108.1	5.62 d (5.1)	108.1	5.63 d, 5.1
17	16.7	0.88 d (6.1)	15.1	0.787 d (6.5)	15.3	0.791 d (6.5)	16.5	0.88 d (6.0)	16.4	0.89 d, 6.1
18a	49.8	2.34 d (4.4)	49.8	2.33 d (4.4)	49.7	2.33 d (4.4)	43.9	2.82 d (4.6)	44.1	2.88 d, 4.3
18b		2.92 d (4.4)		2.915 d (4.4)		2.897 d (4.4)		3.01 d (4.6)		3.09 d, 4.3
19	100.2	5.08 s	100.3	5.05 s	100.2	5.04 s	99.8	5.05 s	91.0	6.76 s
20	14.0	1.07 s	16.81	0.787 s	16.75	0.799 s	14.3	1.11 s	14.3	1.19 s
CH ₃ CO	170.4		170.3 ^e		170.3 ^e		170.4		170.0	
CH ₃ CO	21.2	1.99 s	21.1 ^e	1.97 s	21.1 ^e	1.97 s	21.2	2.00 s	21.0	1.79 s
OC _H 3-16R			54.5	3.33 s	54.7	3.35 s				
OC _H 3-16S			55.2 ^e	3.45 s	55.2 ^e	3.45 s	55.3	3.47 s		
OC _H 3-19										
1'(CO)									166.0	
2'(C=)									128.7	
3'(HC=)									138.7	7.06 qq, 7.1, 1.4
4'(CH ₃)									14.5	1.80 dq, 7.1, 1.2
5'(CH ₃)									11.9	1.87 quint ^b , 1.3

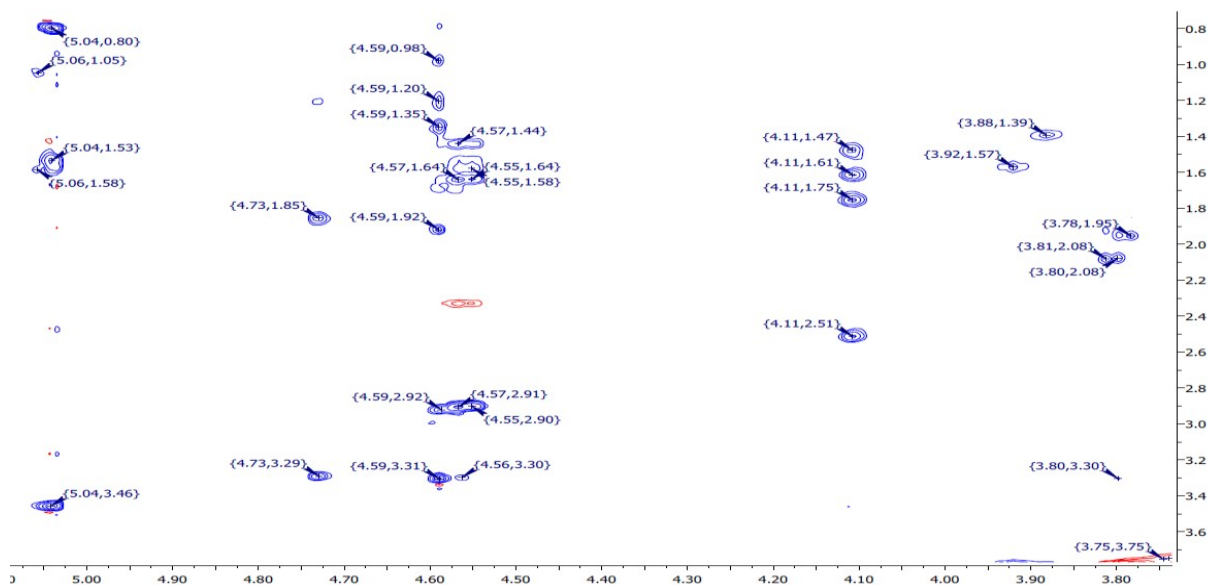
^a ¹H ЯМР (¹H 600.13 MHz) и ¹³C ЯМР (¹³C 150.9 MHz), регистрирани в CDCl₃ (¹H δ_{ref} 7.26, ¹³C δ_{ref} 77.0 ppm); стойности на химично отместване δ в ppm, J в Hz; ^b видима мултиплетност ($t = dd$ и quint. = dq); ^c слаба корелация; ^d припокрити сигнали (данни от HSQC или COSY); ^{e, f} сигнали, които могат да бъдат разменени.



Фигура 16. NOESY – спектър на скутегалерини C + D (207 + 208) епимерна смес

Измереният NOESY спектър на епимерната смес – 207 и 208 подкрепя предложената стереохимия (фигури 16 и 17). В спектъра на двата епимера се наблюдава кръстосан пик между сигналите на метокси групата на 16 позиция (OCH₃-16) и протона H-16, което потвърждава позицията на тази метокси група. Също в двата епимера има NOESY корелации между протоните на H-16 и H₂-11, поради свободното въртене по C-11–C-12 и C-12–C-13 връзките.

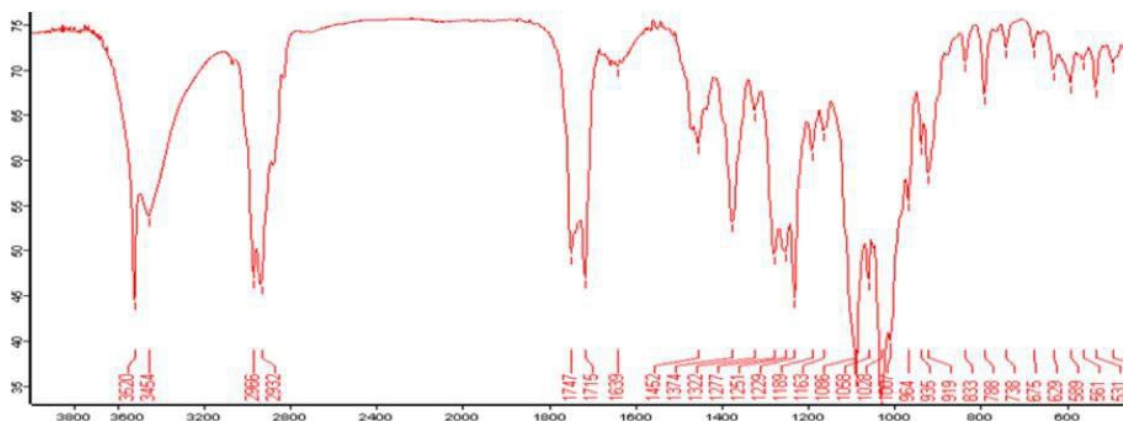




Фигура 17. NOESY – спектър на скутегалерини С + D с разширени секции

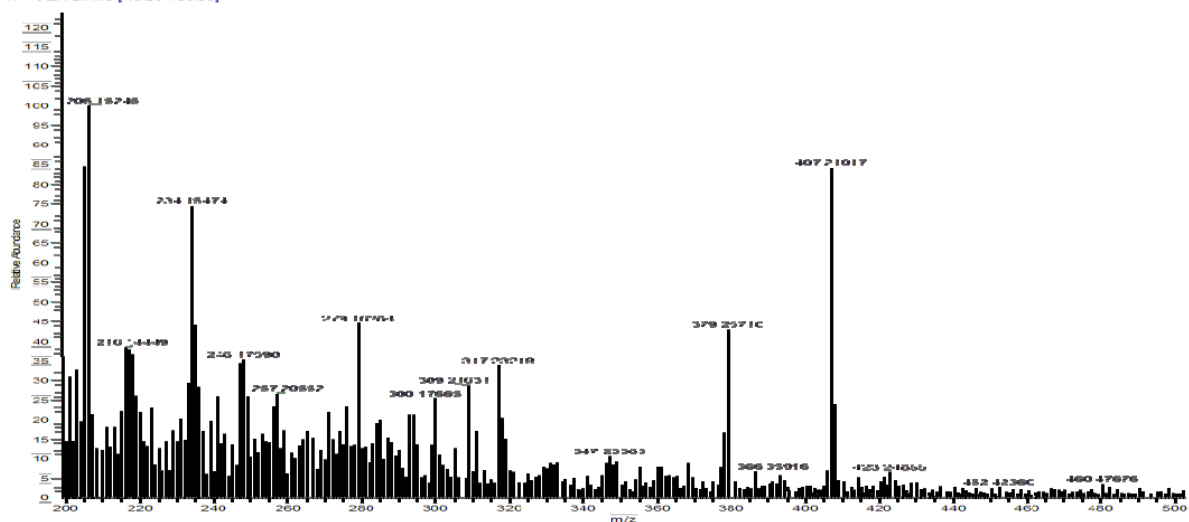
Въртенето по C-12–C-13 връзката може да сближи протон H-16 α до двата H-12 атома, както е в **208**, но не и H-16 β до H-12 атомите в **207**. Наблюдават се две NOESY корелации между $\delta_{\text{H}} 4.59 - \delta_{\text{H}} 1.35$ и $\delta_{\text{H}} 4.59 - \delta_{\text{H}} 0.98$ за съединение **208** и няма NOESY корелации между $\delta_{\text{H}} 4.73/\delta_{\text{H}} 1.41$ и $\delta_{\text{H}} 4.73/\delta_{\text{H}} 1.10$ за съединение **207**.

Транс – свързването на циклохексановите пръстени в декалиновата система се потвърждава от корелациите в NOESY спектърта между протоните CH₃-17, CH₃-20, H-11 и H-19, които са α -ориентирани и съответно протоните в β -позиция, H-10, H-6, H-8 и H-2.



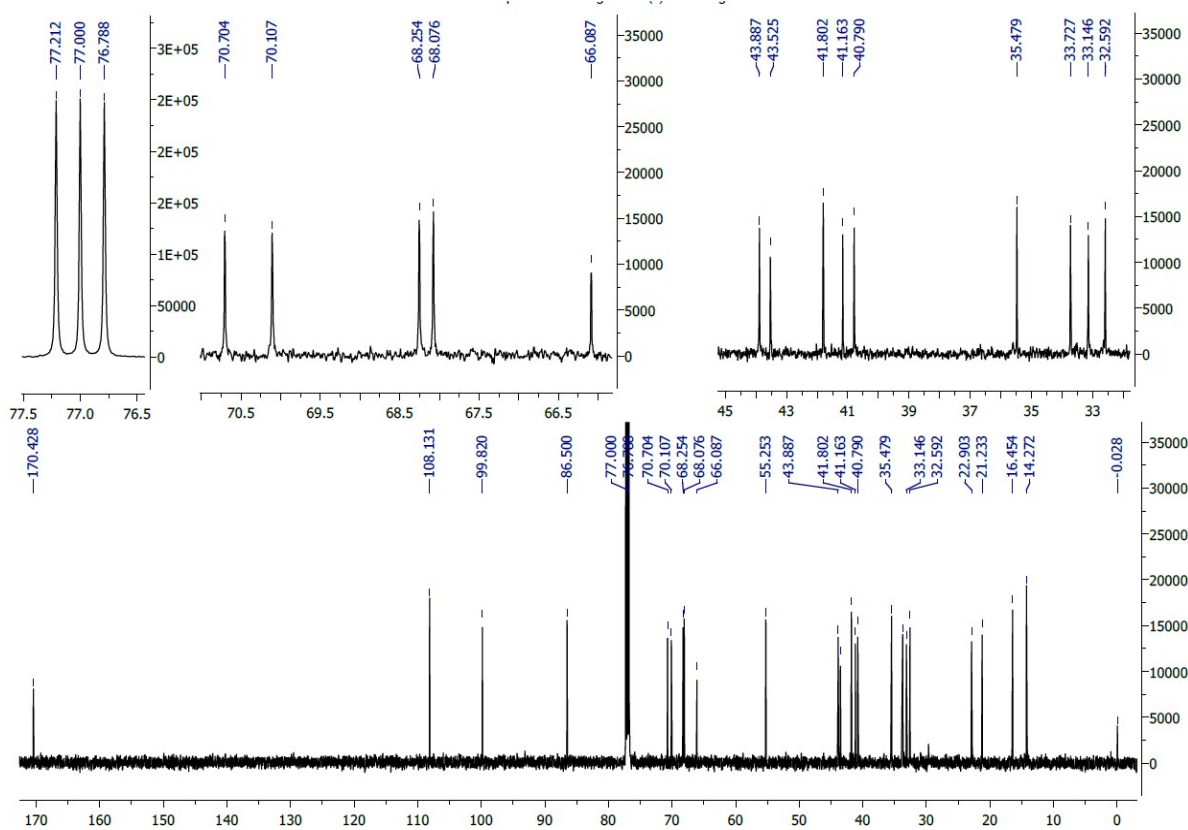
Фигура 18. ИЧ – спектър на скутегалерин Е

След двукратно пречистване на фракция IV с помощта на препаративна ТСХ изолирахме съединение **209**. В измереният ИЧ спектър се наблюдава абсорбция за карбонилни групи (1747 cm^{-1} и 1715 cm^{-1}) и за хидроксилна група при 3620 cm^{-1} (Фигура 18).



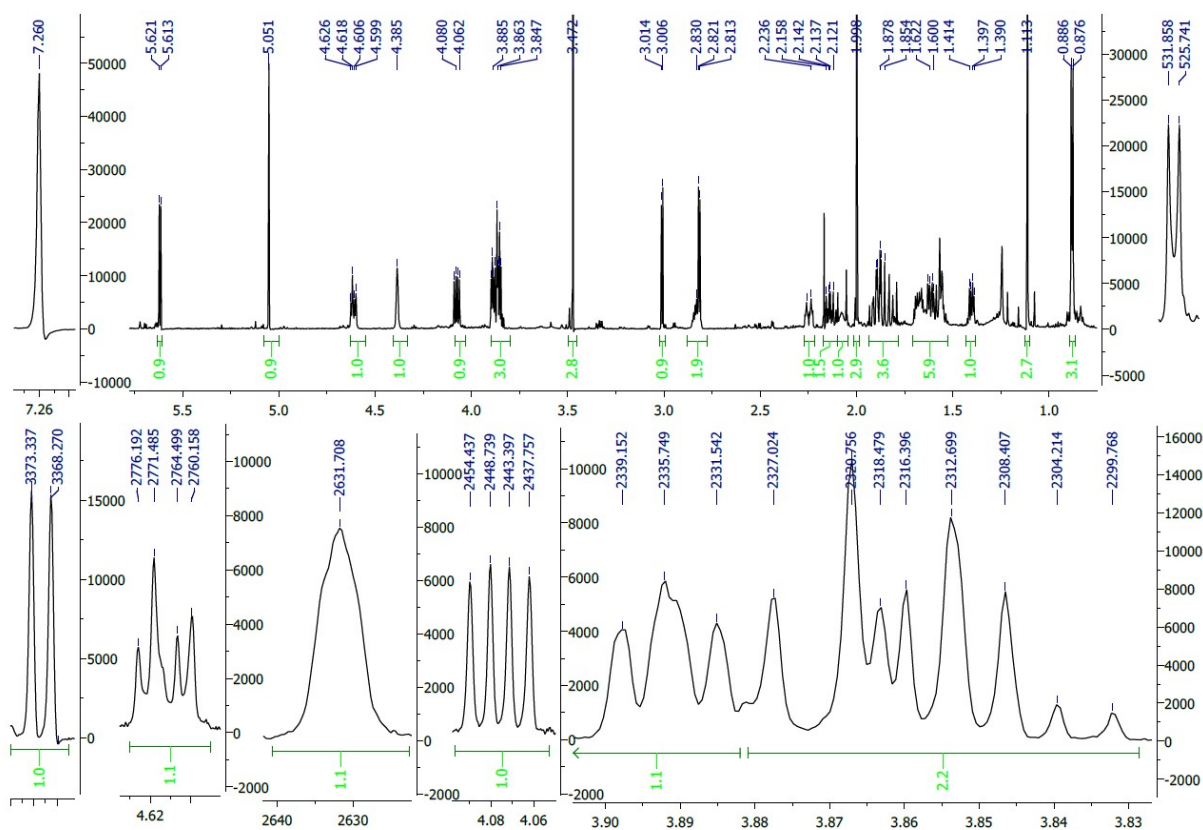
Фигура 19. Мас-спектър на скутегалерин Е

Молекулната формула на съединението $C_{23}H_{34}O_8$ (е изчислена М за $C_{22}H_{31}O_7$, 407.2061) е съставена от пика в мас-спектъра (Фигура 19) при m/z 407.2102, съответстващ на загуба на метокси група $[M-OCN_3]^+$ и от броя на въглеродните атоми, преброени във ^{13}C -ЯМР спектъра (фигура 20). В мас-спектъра се наблюдава още сигнал при m/z 479, който отговаря на дисоцииране на фрагмент $[M-OCCH_3]^+$ с молекулна маса 59, кореспондиращ с ацетокси група в молекулата на съединението.



Фигура 20. ^{13}C –ЯМР спектър на скутегалерин Е с разширени секции

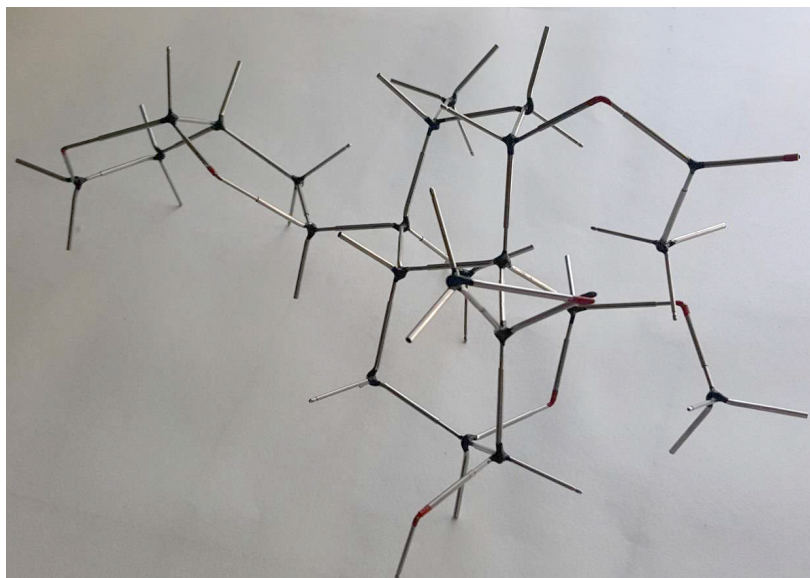
Обобщените в Таблица 1 спектрални данни на **209**, след анализирани на ^1H -ЯМР спектъра (Фигура 21) и ^{13}C -ЯМР спектъра, показват характеристични сигнали за една *нео*-клероданова структура (Me-17 при δ_{H} 0.88d, $J = 6.0$ Hz, Me-20 при δ_{H} 1.11s), която притежава 4 α ,18-оксиранов пръстен [H-18a при δ_{H} 2.82d и H-18b (Ендо водород по отношение на пръстен В) при δ_{H} 3.01d с геминална свързваща константа $J_{\text{gem}} = 4.6$ Hz]; 2 α ,19-ацетална част ($\delta_{\text{H-19}}$ 5.05s; $\delta_{\text{H-2}}$ 3.89brdd; $\delta_{\text{C-19}}$ 99.8) и C-11–C-16 хексахидро-фуорофуранова странична верига [$\delta_{\text{H-11}}$ 4.08dd, $J = 11.0, 5.6$; $\delta_{\text{H-13}}$ 2.83t dd; $\delta_{\text{H2-15}}$ припокрити сигнали в областта от 3.857 до 3.866 ddd; $\delta_{\text{H-16}}$ 5.62d, $J = 5.1$; $\delta_{\text{C-16}}$ 108.1]. В допълнение, ЯМР спектъра показва присъствие на ацетат (δ_{H} 2.0s, 3H; δ_{C} 170.4 и 21.2), метокси група (δ_{H} 3.47s, 3H; δ_{C} 55.2) и хидроксилна група при C-3 ($\delta_{\text{H-3}}$ 4,39brs, $\delta_{\text{C-3}}$ 70.1).



Фигура 21. ^1H – ЯМР спектър на скутегалерин Е с разширени секции

Химичните отмествания на H-19 α при δ_{H} 5.05s и на C-19 полуацеталният въглерод при δ_{C} 99.8, са в съответствие със стойностите на химичните отмествания на родствените структури – скутегалерин С (**207**) и скутегалерин D (**208**) (в **207** при δ_{H} 5.05; δ_{C} 100.3 и в **208** при δ_{H} 5.04; δ_{C} 100.2).

В ^1H ЯМР спектрите на скутегалерин Е се проявява далечно спин-спиново взаимодействие през 4 връзки между $\text{H-}3\alpha$ и $\text{H-}1\alpha$ в съответния фрагмент на подреждане в скелета на $\text{H-}3\alpha\text{-C-}3\text{-C-}2\text{-C-}1\text{-H-}1\alpha$, който притежава плоска зигзагообразна структура (W).



Фигура 22. 3D драйдинг модел на скутегалерин Е

Далечното спиново взаимодействие потвърждава β -ориентацията на електроотрицателния заместител (хидроксилна група) при $\text{C-}3$. Такова подреждане на атомите ($\text{H-}3\alpha\text{-C-}3\text{-C-}2\text{-C-}1\text{-H-}1\alpha$) и далечно спин-спиново взаимодействие (4J) не би могло да се осъществи ако хидроксилната група в скутегалерин Е е в 3α , а не в 3β -позиция. Плоският строеж на $\text{H-}3\alpha\text{-C-}3\text{-C-}2\text{-C-}1\text{-H-}1\alpha$ фрагмента от структурата е онагледен с помощта на молекулярния Драйдинг модел (Фигура 22).

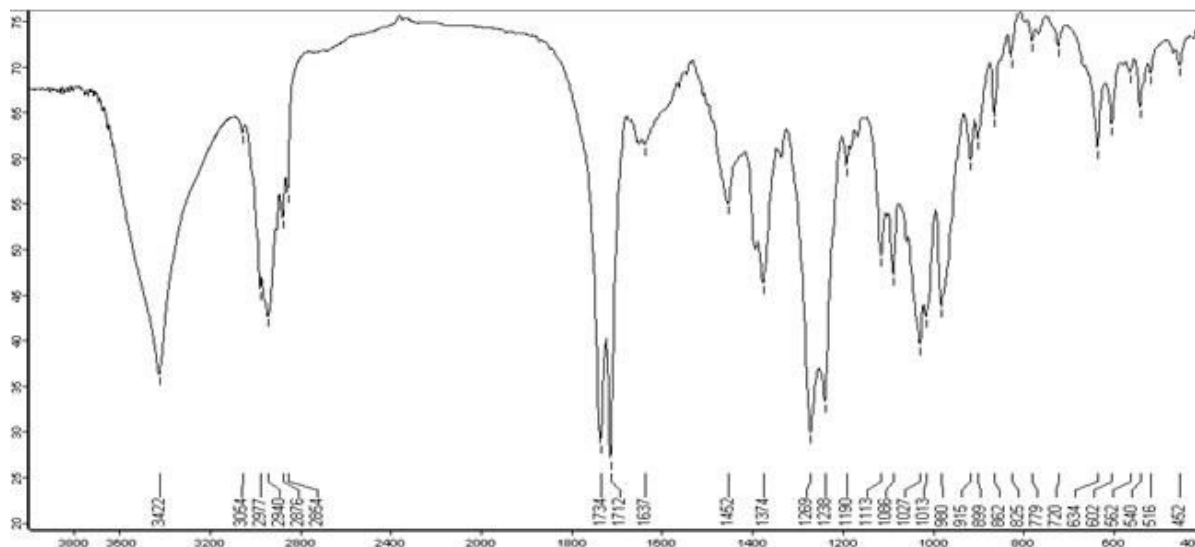
^1H - и ^{13}C -ЯМР спектрите на скутегалерин Е (209) са почти идентични с тези на *нео*-аюгапирин А (35) (Таблица 2).

Таблица 2. Ефекти на заместителите при $\text{C-}1/\text{C-}3$ в *нео*-клеродани с $2\alpha,19$ -полуацетален (ацетален) пръстен и $4\alpha,18$ -епоксид

Съединение	Заместител		δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
	$\text{C-}1$	$\text{C-}3$	$\text{H-}1\alpha$	$\text{H-}3\alpha$	C(4)/C(18)	$\text{C-}10$
скутегалерин Е, (209)	H_2	H,OH	2,25 dddd	4,39 m	66,1/43,9	40,8
<i>нео</i> -аюгапирин А (35)	H_2	H,OH	2,30 dddd	4,40 ddd	65,9/44,1	40,7
скутекиприн ^a , (25)	H_2	H_2	2,36 dtd	2,55 brd	60,6/50,2	40,8
14,15-дихидроджодрелин Т, (33) ^b	H,OTig	H_2	5,51 m	2,48 brd	59,6/50,2	48,3

^a данни от [Penchev et al., 2014]; ^b данни от [Cole et al., 1990]

Отново хомогенно петно на ТСХ се наблюдава за последната изолирана субстанция от фракция IV. В ИЧ-спектъра присъстват ивици на поглъщане за карбонилна група (1734, 1720 и 1269 cm^{-1}) и за хидроксилна група (3422 cm^{-1}) (Фигура 23). Няма абсорбция за двойна връзка.



Фигура 23. ИЧ – спектър на скутегалерини F + G

От позитивния псевдо молекулен йон пик $[M + Na]^+$ при m/z 587.2460 в HR-ESIMS спектъра на изолираното съединение, в съответствие с данните от ^{13}C -ЯМР спектъра за броя на C-атоми е съставена неговата молекулна формула $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_{11}$.

В ^1H -ЯМР спектър, има характеристични сигнали за оксиранов пръстен, свързан между въглеродите C-4 и C-18 [H_2 -18 (δ 2.45d и 3.05d с геминална константа на свързване $J = 4.5$)] и цикличен полуацетал сключен между въглеродните атоми C-2 и C-19 [H-2 β (δ 4.41 m), H-19 α (δ 6,69)] (Таблица 3).

В допълнение в ^1H -ЯМР спектър се наблюдават характерни сигнали за хексахидро-фуоро[2,3-b]фуранов пръстен от страничната верига C-11–C-16, [характеристичен мултиплет за H-13 β протон, който резонира в областта δ_{H} 3.10 – 2.80 ppm, дублет при δ_{H} 5.50 (H-16 β , $J = 5.5$ Hz), дублет от дублети при δ_{H} 3.98 – 4.55 (H-11 α , $J = 11.6$, 4.6) и заместител хидрокси група при C-15, δ_{H} в областта 5.56-5.46 (1H m, H-15), δ_{H} 3.49 (1H brs, OH)] (Таблица 4).

Таблица 3. ^{13}C -ЯМР данни на скутегалерини F/G (**210/211**)^a епимерна смес и референтни съединения

Позиция	210 (15R) R _{15β} = OH	211 (15S) R _{15α} = OH	33 (14,15- дихидро- ждодрелин T)	8-a (15R- скутекип- рол A) ^c	8-b (15S-скуте- кипрол A) ^d
	$\delta^{13}\text{C}$, nH mult	$\delta^{13}\text{C}$, nH mult	$\delta^{13}\text{C}$, nH mult	$\delta^{13}\text{C}$, nH mult	$\delta^{13}\text{C}$, nH mult
1e	69.8, CH	69.8, CH	66.7, CH	22.2, CH ₂	22.2, CH ₂
2e	66.9, CH	66.9, CH	69.6, CH	25.0, CH ₂	25.0, CH ₂
3	31.2, CH ₂	31.2, CH ₂	31.1, CH ₂	32.7, CH ₂	32.7, CH ₂
4	59.9, C	59.9, C	59.6, C	65.0, C	65.0, C
5	43.1, C	43.1, C	43.0, C	45.6, C	45.6, C
6	67.4, CH	67.4, CH	67.7, CH	72.0, CH	72.1, CH
7	33.2, CH ₂	33.2, CH ₂	32.6, CH ₂	33.4, CH ₂	33.4, CH ₂
8	35.1, CH	35.1, CH	35.2, CH	36.1, CH	36.2, CH
9	40.5, C	40.5, C	40.7, C	40.1, C	40.2, C
10	48.3 CH	48.3 CH	48.3, CH	48.5, CH	48.3, CH
11	85.0, CH	84.8, CH	85.9, CH	83.6, CH	83.6, CH
12	32.9, CH ₂	32.7, CH ₂	32.8, CH ₂	32.1, CH ₂	32.5, CH ₂
13	40.1, CH	40.5, CH	41.7, CH	40.0, CH	41.0, CH
14	38.8, CH ₂	39.6, CH ₂	33.2, CH ₂	38.8, CH ₂	39.9, CH ₂
15	98.8, CH	98.4, CH	68.2, CH ₂	98.7, CH	98.4, CH
16	108.5, CH	110.3, CH	108.1, CH	107.5, CH	109.5, CH
17	16.23, CH ₃	15.92, CH ₃	16.0, CH ₃	16.5, CH ₃	16.4, CH ₃
18	50.5, CH ₂	50.5, CH ₂	50.2, CH ₂	48.3, CH ₂	48.4, CH ₂
19	90.6, CH	90.6, CH	90.4, CH	61.7, CH ₂	61.7, CH ₂
20	14.98 CH ₃	15.65 CH ₃	15.7, CH ₃	14.0, CH ₃	14.0, CH ₃
OTig 1'	166.5, C	166.5, C	166.3, C		
2'	128.6, C	128.6, C	128.1, C		
3'	137.9, CH	137.9, CH	137.7, CH		
4'	14.6, CH ₃	14.6, CH ₃	14.4, CH ₃		
5'	12.3, CH ₃	12.3, CH ₃	11.9, CH ₃		
OAc	170.0, C	170.0, C	169.7, C	170.1, C	171.0, C
	169.8, C	169.8, C	169.5, C	170.1, C	171.0, C
	21.4, CH ₃	21.4, CH ₃	21.6, CH ₃	21.2, CH ₃	21.1 CH ₃
	21.1, CH ₃	21.1, CH ₃	21.1, CH ₃	21.2, CH ₃	21.1, CH ₃

^aCDCl₃, ¹H 600.13 MHz, δ_{ref} 7.26; ¹³C 150.0 MHz, δ_{ref} 77.0 ppm; ^bЛитературни данни за референтни съединения, включени за директно сравняване; ^c14,15-дихидрождодрелин T (**33**) [Rodriguez et al., 1993]; ^d15R-скутекипрол A (**8-a**) [Rosselli et al., 2004]; ^e15S-скутекипрол A (**8-b**) [Rosselli et al., 2004]; ^e в удебелен, наклонен курсив са означени разменените от нас отнасяния.

Таблица 4. ^1H ЯМР данни, ^1H - ^1H COSY и HMBC корелации на скутегалерини F и G (600.13 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz)

С атом	211			212		
	δ_{H} (m, J (в Hz))	^1H - ^1H COSY	HMBC	δ_{H} (m, J (в Hz))	^1H - ^1H COSY	HMBC
1eq	5.52 (m ^e)	3 eq		5.52 m ^e	3 eq	
2eq	4.41 (dt, J = 5.0, 2.5)	3 eq, 3ax	4 ^g , 19 ^g	4.41 (dt, J = 5.0, 2.5)	3 eq, 3ax	4 ^g , 19 ^g
3ax	1.86 (dd, J = 15.1, 2.0)	2, 3eq	4, 18	1.86 (dd, J = 15.1, 2.0)	2, 3eq	4, 18
3eq	2.48 (br.d, J = 14.5)	1, 2, 3ax	1 ^g , 2 ^g , 4	2.48 (br.d, J = 14.5)	1, 2, 3ax	1 ^g , 2 ^g , 4
6ax	4.65 (m ^e)	7eq, 7ax	4 ^g , CH ₃ CO ^g	4.65 (m ^e)	7eq, 7ax	4 ^g , CH ₃ CO ^g
7eq	1.43 ^c (m ^e)	6ax, 7ax, 8		1.43 ^c (m ^e)	6ax, 7ax, 8	
7ax	1.67 ^c (m ^e)	6ax, 7ax	6	1.67 ^c (m ^e)	6ax, 7ax	6
8	1.52 ^c (m ^e)	11, 17, 7eq		1.52 ^c (m ^e)	11, 17, 7eq	
10	2.04 (d, J = 2.6)		1, 4, 5, 9, 19, 20	2.04 (d, J = 2.6)		1, 4, 5, 9, 19, 20
11 α	3.98 (dd, J = 11.7, 4.6)	8, 12a, 14b	10	4.55 (dd, J = 10.6, 6.3)	8, 12a, 14b, 15	
12b	ov ^f			ov ^f		
12a	1.93 ^c (m ^e)	11, 14a		1.93 ^c (m ^e)	11, 12a, 13	
13 β	3.06 (m ^e)	16, 14a		2.86 (m ^e)	12a, 13, 14a, 16	
14b	2.10–2.18 (ov)	14a, 16		2.10–2.18 (ov)	14a, 16	
14a	2.56–2.62 (m ^e)	12a, 14b, 15, 16	13 ^g , 15 ^g	2.56–2.62 (m ^e)	12a, 14b, 16	13 ^g , 15 ^g
15 β	–			5.46 (m ^e)	11, 14a	13 ^g , 16 ^g
15 α	5.56 (m ^e)	14b, 14a	12 ^g , 13 ^g	–		
16 β	5.50 (d, J = 5.5)	12a, 13, 14a, 14b	11 ^g , 13 ^g , 15 ^g , 12 ^g	5.52 (d, J = 5.5)	12a, 13, 14a, 14b	11 ^g , 13 ^g , 15 ^g , 12 ^g
17	0.89 (d, J = 6.7)	8, 9	7, 8, 9	0.92 (d, J = 6.8)	8, 9	7, 8, 9
18B ^b	3.05 (d, J = 4.5)	18A	3 ^g	3.05 (d, J = 4.5)	18A	3 ^g
18A	2.45 (d, J = 4.5)	18B	4, 6	2.45 (d, J = 4.5)	18B	4, 6
19	6.69 (s)		4, 6, CH ₃ CO	6.68 (s)		4, 6, CH ₃ CO
20	1.25 (s)		8, 9, 10, 11	1.25 (s)		8, 9, 10, 11
OTig 3'	6.81 (qq, J = 5.7)	4', 5'	1', 5' ^g	6.81 (qq, J = 5.7)	4', 5'	1', 5' ^g
4'	1.82 (dq ^d , J = 5.0, 1.0)	3', 5'	1', 2', 3'	1.82 (dq ^d , J = 5.0, 1.0)	3', 5'	1', 2', 3'
5'	1.81 (br.s)	3', 4'	1', 2', 3'	1.81 (br.s)	3', 4'	1', 2', 3'
OAc	2.14 (s); 1.96 (s)			2.14 (s); 1.96 (s)		4, CH ₃ CO
OH	3.49 (br.s)			3.49 (br.s)		

δ_{ref} 7.26; ^bендо водород; ^cданни от COSY; ^dвидима мултиплетност; ^eмултиплетността и свързващите константи не могат да бъдат отчетени; ^fприпокриване с „водната“ ивица при приблизително δ_{H} 1.6; ^gтези корелации са слаби.

Заклученията за конфигурацията на епимерния център при C-15 се потвърждават от корелациите в NOESY спектъра между H-15 α и H-11 α в **210** и H-15 β и H-13 β в **211**. На базата на всички спектрални данни, за съединенията скутегалерини F и G са определени структурите **210** и **211**.

При проведеното изследване на *Scutellaria galericulata* за наличие на минорни *нео*-клероданови дитерпеноиди, изолирахме, пречистихме и спектрално охарактеризирахме пет нови съединения: епимерните скутегалерин C (**207**)/скутегалерин D (**208**), скутегалерин F (**210**)/скутегалерин G (**211**) и скутегалерин E (**209**), заедно с познатия skutalтинсин B (**26**, 11*S* изомер) – получен по-рано от Бозов и Coll,

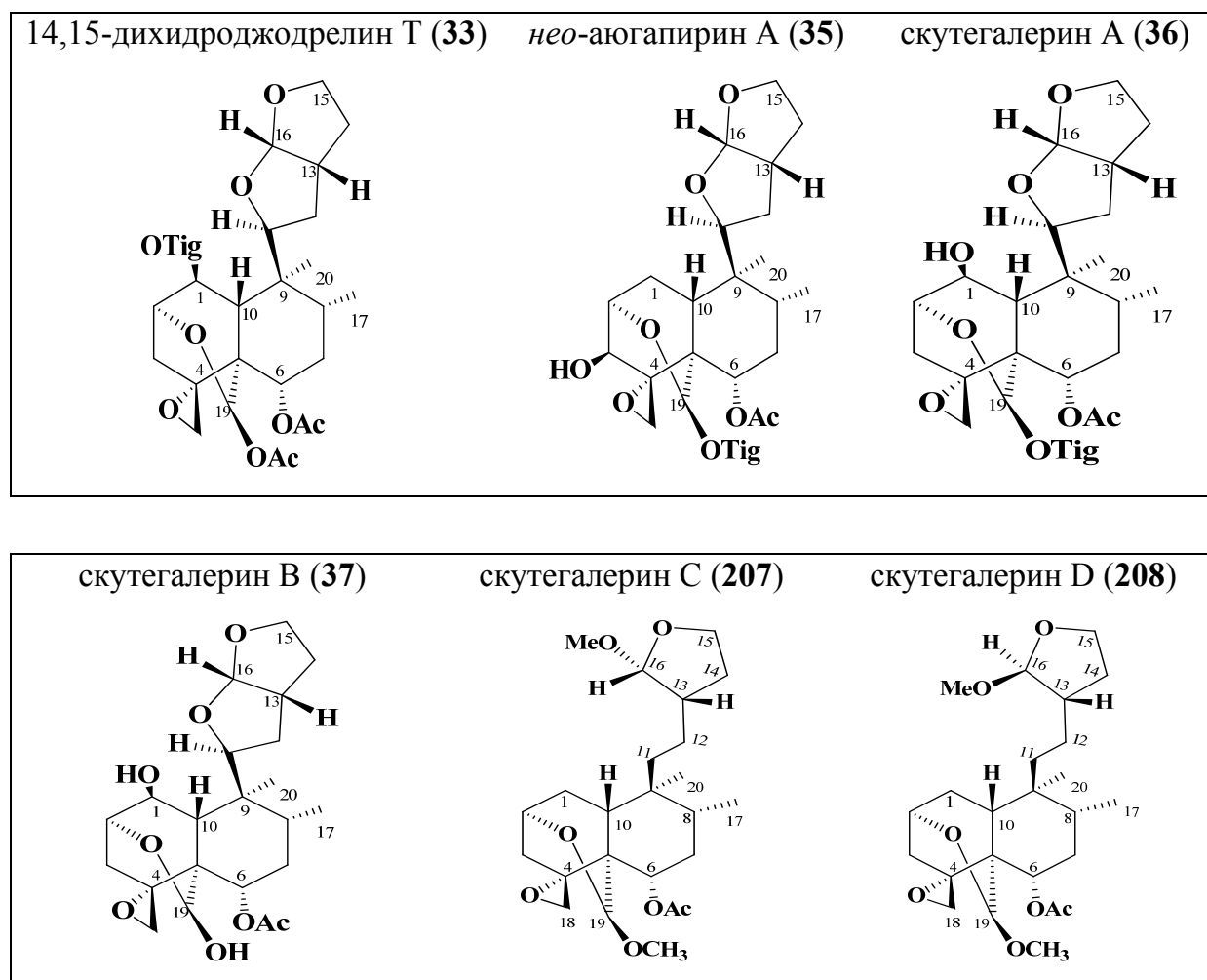
през 2015 година от *Scutellaria altissima* като неделима смес с 11*R* епимера, скуталтисин С (16) [Bozov&Coll, 2015].

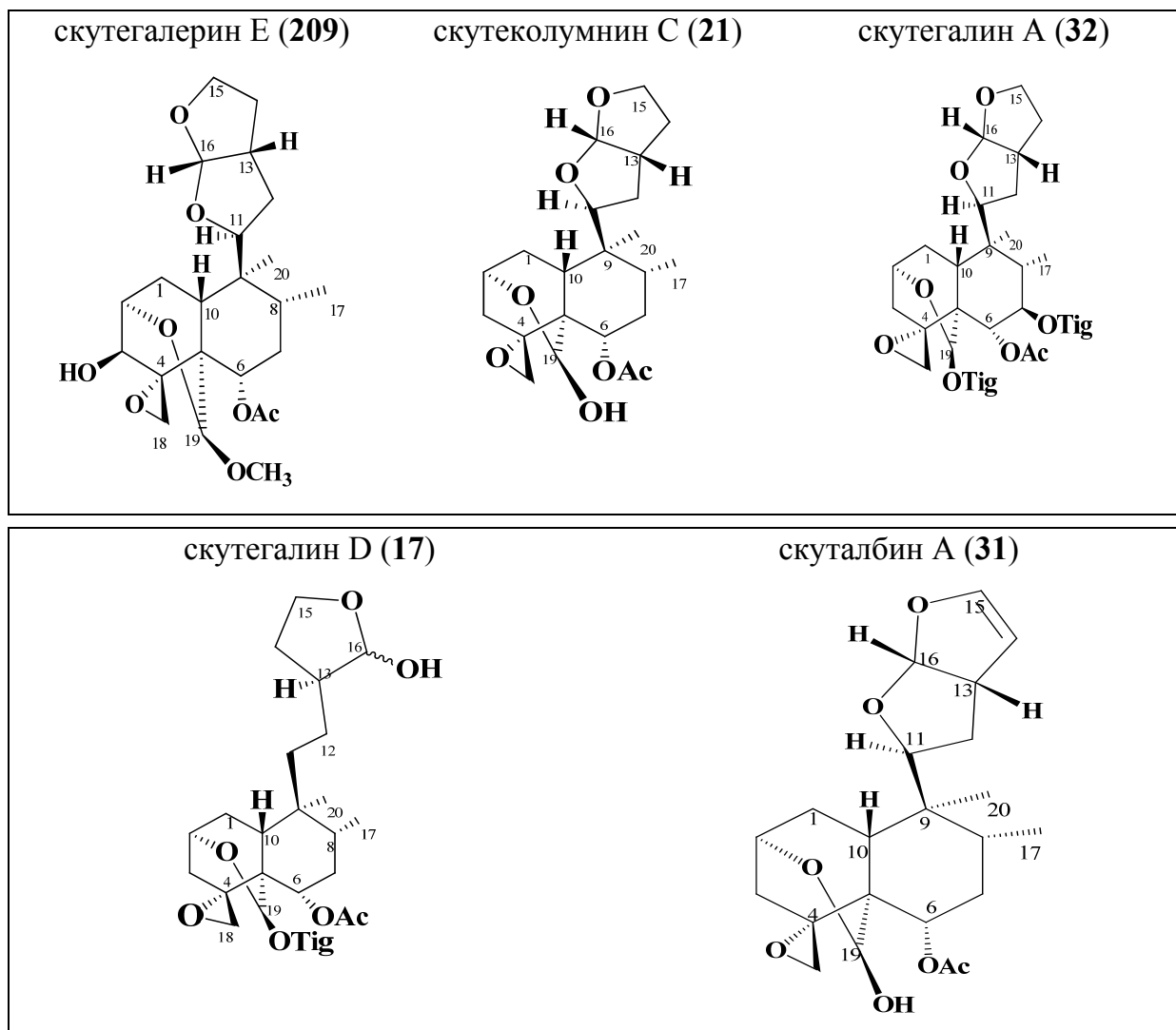
4. ТЕСТВАНЕ НА БИОЛОГИЧНИ АКТИВНОСТИ

4.1. Антифидантна активност

Изследвахме антифидантния ефект на единадесет природни *нео*-клероданови дитерпеноиди, изолирани от *Scutellaria galericulata* (*Labiatae*), срещу ларвите на колорадски бръмбър, с тестване при хранене (Таблица 5).

Таблица 5. *Нео*-клероданови дитерпеноиди, тествани за антифидантен ефект срещу ларви на Колорадския бръмбар





В подструктурата C-11–C-16 на повечето тествани единадесет *нео*-клероданови дитерпеноиди, изолирани от видовете *Scutellaria*, се съдържа хексахидрофуоро[2,3-*b*]фуранов пръстен, с изключение на съединението **31** – с тетраhydroфуорофуранов цикъл и съединенията **207**, **208**, **17**, в които C-15 и C-16 участват в изграждането на единичен пръстен – полуацетал (**17**) или ацетал (**207** и **208**).

Съединенията **35** и **36** са позиционни изомери, докато **207** и **208** са епимери при C-16.

От Таблица 6 се вижда, че повечето от тестваните природни дитерпеноиди потискат храненето на ларвите на Колорадския бръмбар ($FR_{50} < 0.1$) при доза 1000 ppm ($33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), с изключение на съединенията **207**, **208** и **17**.

Таблица 6. Коефициенти на хранене на тестваните природни *нео*-клероданови дитерпени

Съединение	Доза (ppm)	N	FR ₅₀ ±SE	FR ₇₅ ± SE
14,15-дихидродрелин Т (33) (Стандарт)	1000	3	0.03±0.00	0.03±0.01
	100	5	0.12±0.04	0.18±0.06
	10	5	0.37±0.10	0.37± 0.10
<i>нео</i> -аюгапирин А (35)	1000	3	0.05±0.01	0.07±0.04
	100	5	0.14±0.09	0.21±±0.11
	10	5	0.44±0.11	0.49±0.14
скутегалерин А (36)	1000	3	0.04±0.02	0.05±0.01
	100	5	0.14±0.07	0.24±0.09
	10	5	0.42±0.13	0.52±0.16
скутегалерин В (37)	1000	3	0.11±0.04	0.17±0.07
	100	5	0.26±0.08	0.33±0.13
	10	5	0.63±0.17	0.74±0.17
скутегалерин С (207) + скутегалерин D (208)	1000	5	0.31±0.07	0.40±0.09
	100	3	0.59±0.10	0.67±0.17
	10	3	0.88±0.19	0.99±0.22
скутегалерин Е (209)	1000	3	0.14±0.04	0.17±0.05
	100	3	0.32±0.12	0.38±0.10
	10	5	0.76±0.16	0.89±0.18
скутеколумнин С (21)	1000	3	0.14±0.03	0.20±0.03
	100	3	0.25±0.10	0.29±0.12
	10	5	0.39±0.14	0.43±0.11
скутегалин А (32)	1000	3	0.09±0.02	0.10±0.05
	100	3	0.17±0.10	0.22±0.16
	10	5	0.47±0.12	0.65±0.18
скутегалин D (17)	1000	5	0.28±0.06	0.32±0.07
	100	3	0.46±0.15	0.51±0.19
	10	3	0.80±0.17	0.88±0.18
скуталбин А (31)	1000	3	0.07±0.02	0.09±0.05
	100	3	0.16±0.10	0.18±0.13
	10	5	0.45±0.12	0.53±0.16

Легенда: N – брой на повторения; SE – стандартна грешка; FR – коефициент на хранене; FR = CTD/CCD (където CTD и CCD представляват консумирани части съответно на третираните и контролните дискове).

Ниската активност на тези три клеродана може да се дължи на липсата на фурофуранова C-11–C-16 подструктура в основния клероданов скелет.

От позиционните структурни изомери – скутегалерин А и *нео*-аюгапирин А, по-голяма активност показва първият. С най-висока ак-

тивност сред тестваните *нео*-клероданови дитерпеноиди е скутегале-рин А, който има заместител хидроксилна група при С-1, подобно на 14,15-дихидроджодрелин Т, който обаче има тиглатна естерна група при С-1. В декалиновия пръстен на тестваните съединения, като заместители при С-1, С-3, С-7 и С-19 варират естерни групи, хидроксилна или метокси група. В този ред активността намалява, а съответно тя се увеличава, когато има двойна връзка между С-14 и С-15.

Резултатите, получени при изследване на антифидантната активност на *нео*-клеродановите съединения срещу ларвите на Колорадския бръмбар, потвърждават предишни изследвания за активността на подобни вещества срещу различни видове насекоми. Така например, че присъствието в клеродановата структура на спиро епоксиден пръстен при С-4 и две естерни групи при С-6 и С-19, заедно с хексахидро- или тетраhydro-фурофуранов пръстен при С-9, са условие за увеличаване на активността.

4.2. Цитотоксична активност

Клетъчни линии: За скрининг на ин витро цитотоксична активност са избрани две клетъчни линии: тумори по белите дробове, означени като H1299 и нормални клетъчни линии – HUVEC (клетки от пъпна връв). Клетъчните линии са получени от BPS Bioscience. Закупените клетки са поддържани в изкуствена среда (DMEM – HUVEC; RPMI – H1299) и често са пресявани. Тестването за цитотоксична активност на дитерпени, изолирани от представители на род *Scutellaria* от семейство *Lamiaceae*, се проведе в БАН – София. Изпитването беше извършено на готови клетки, поддържани в нейната лаборатория при изкуствена среда.

Дванадесет природни *нео*-клероданови дитерпени, изолирани от *Scutellaria galericulata* L., *S. alpina* L. и *S. altissima* L., растящи в България (*S. galericulata* L. – събрана близо до Ловеч и Плевен, *S. alpina* L. в Пирин планина, в района на Банско и *S. altissima* L., в Бачково, близо до Асеновград), са тествани с помощта на МТТ метода /3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид/ за антитуморна и цитотоксична активност на две клетъчни линии, от човешки тумори на бял дроб, обозначени с H1299 и нормални клетки от пъпна връв (HUVEC).

Цитотоксичната активност е отчетена чрез използването на скалата IC₅₀ (концентрацията на съединението измерена в μМ, при която половината от клетките умират). Сред тестваните съединения най-активен е скуталпин А със стойности на IC₅₀ съответно 21.35 и 23.9

μM , три съединения, skutalпини А (2), Е (3) и F (4) проявяват умерени цитотоксични свойства за двете клетъчни линии, а останалите – не са активни. (Таблица 7).

Таблица 7. Резултати от тестванията за цитотоксична активност на *нео*-клероданови дитерпени спрямо H1299 и HUVEC клетъчни линии

Съединение	IC ₅₀ стойности, (измерена в μM)		Съединение	IC ₅₀ стойности, (измерена в μM)	
	H1299	HUVEC		H1299	HUVEC
Вода (Контрола)	–	–	клеродин (1)	236,35	236,84
14,15-дихидродрелин Т (33)	242,21	244,43	skutalпин А (2)	21,35	23,89
<i>нео</i> -аюгапирин А (35)	288,65	287,59	skutalпин F (4)	26,62	31,28
skuteгалерин А (36)	452,01	458,00	skutalпин Е (3)	34,24	32,48
skuteколумнин С (21)	667,44	665,79	skuteгалин D (17)	888,35	883,47
skuteкипрол А (8)	335,76	365,32	skutaltисин G (18)	892,02	892,22
skupoлин Н (30)	578,71	574,55			

От получените резултати следва извода, че няма връзка между двата вида биологични активности – цитотоксична и антифидантна. Трите съединения, с цитотоксичен ефект, имат 13-спиро свързан γ -лактон, като в skutalпин Е (3) конфигурацията на C-13 е *R*, докато skutalпини А (2) и F (4) притежават другата възможна ориентация – *S*. Серията биоанализи показват, че *нео*-клероданите (skutalпини А (2), Е (3) и F (4)), проявяващи цитотоксичност имат в C-11—C-16 подструктурата на скелета си, структурния фрагмент 13-спиро- α,β -ненаситен- γ -лактон, докато най-активните антифиданти (като skuteгалерин А, *нео*-аюгапирин А и 14,15-дихидродрелин Т) притежават фурофуранова C-11–C-16 подструктура в основния клероданов скелет.

Активността при различните биологични свойства зависи от различни структурни фрагменти на съединенията.

ОБОБЩЕНИЕ

Настоящият дисертационен труд е продължение на изследването на *Scutellaria galericulata* с цел изолиране и пречистване на минорни *нео*-клеродани, доказване структурата им и тестване на някои биологични свойства на *нео*-клероданови дитерпени, изолирани от представители на род *Scutellaria*.

От *Scutellaria galericulata* получихме пет фракции (I-V). От фракции II и IV получихме съединенията – скуталтисин В (26), скутегалерин С (207), скутегалерин D (208) и скутегалерин Е (209), а от прекристализацията на скутегалерин Е и получихме хомогенна субстанция от две нови съединения – скутегалерини F (210) и G (211), които са епимери при C-15.

Изследвахме антифидантният ефект на единадесет природни *нео*-клероданови дитерпеноиди – 14,15-дихидроджодрелин Т, *нео*-аюгапирин А, скутегалерин А, скутегалерин В, **скутегалерин Е (209)**, скутеколумнин С, скутегалин А, скутегалин D, скуталбин А, **скутегалерин С (207)** и **скутегалерин D (208)**, срещу ларвите на колорадски бръмбър, наречен *Leptinotarsa decemlineata* (Say).

Резултатите показаха, че повечето от тестваните природни дитерпеноиди потискат храненето на ларвите на Колорадския бръмбар, с изключение на наблюдаваните съединения – **скутегалирини С (207) и D (208)** и скутегалин D. Потвърди се докладваната в предишни изследвания зависимост, че присъствието в клеродановата структура на оксиранов пръстен, спиро-свързан при C-4 и две естерни групи при C-6 и C-19, заедно с тетра- или хексахидро-фуурофуранова подструктура при C-9, е условие за повишаване на активността.

Тествахме цитотоксичността на дванадесет *нео*-клероданови дитерпеноиди: 14,15-дихидроджодрелин Т, *нео*-аюгапирин А, скутегалерин А, скутеколумнин С, скутегалин D, скутекипрол А, скуполин Н, клеродин, скуталтисин G, скуталпин А, скуталпин F, скуталпин Е, срещу туморни клетки от бял дроб (H1299) и нетуморни клетки от пъпна връв (HUVES).

От получените резултати се вижда, че три съединения – скуталпин А, скуталпин Е и скуталпин F, проявяват цитотоксичност. Те имат 13-спиро свързан γ -лактон в шестчленната странична верига. Най-активният сред тях е скуталпин А.

ИЗВОДИ

1. От хемо-таксономична гледна точка, може да се отбележи, че в *S. galericulata* се синтезират само дитерпеноиди с транс *нео*-клероданов скелет от типа ТС.
2. *Нео*-клеродановите дитерпеноиди изолирани от *S. galericulata*, съдържат в структурата си 4 α ,18-епоксиден пръстен и естерна група при С-6 в α -позиция.
3. Във всички изолирани дитерпеноиди от *S. galericulata* се съдържа 2 α ,19-полуацетален или ацетален пръстен.
4. Заместването на естерните групи при С-1, С-3, С-7 и С-19 в декалиновия пръстен на *нео*-клероданите, с хидроксилна или метокси група, води до намаляване на антифидантната активност. Активността се увеличава, когато има двойна връзка между въглеродите С-14 и С-15.
5. Смяната на тетраhydroфурофурановия пръстен в подструктурата С-11–С-16 на *нео*-клероданите с лактолен пръстен при дитерпени-те скутегалерин С, скутегалерин D и скутегалин D, води до драстично намаляване на активността.
6. Силата на антифидантната и на цитотоксичната активност зависи от различни структурни фрагменти и заместители в молекулите на *нео*-клероданите.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Оригинални научни приноси

1. Проведено е фитохимично изследване на *Scutellaria galericulata* от сем. *Lamiaceae*, растяща в България за наличие на минорни *нео*-клероданови дитерпеноиди.
2. Изолирани и спектрално охарактеризирани са шест *нео*-клероданови дитерпеноиди. Пет от тях са нови за науката съединения: скутегалерин С, скутегалерин D, скутегалерин E, скутегалерин F и скутегалерин G. Шестото вещество, скуталтисин B е нов дитерпен за вида *S. galericulata* и за рода *Scutellaria*, и е получен за първи път в индивидуално състояние. Еднозначно са отнесени всички сигнали във ¹³C-ЯМР спектъра на скуталтисин B, като са корегирани стойностите за С-7, С-9 и С-12.
3. Доказана е относителната стереохимия на всички асиметрични въглеродни атоми в *нео*-клероданите чрез интерпретация на свързващите *J* константи и на NOESY спектрите.

4. Тествана е антифидантната активност на единадесет *нео*-клероданови дитерпеноиди изолирани, от *S. galericulata* срещу ларви на Колорадски бръмбар. Получените резултати за активността на съединенията – *нео*-аюгапирин А (35) и скутегалерин А (36) са близки с тази на стандартното съединение – 14,15-дихидроджодрелин Т (33).
5. При тестването за цитотоксичната активност на дванадесет *нео*-клероданови дитерпеноиди, изолирани от представители на род *Scutellaria*, срещу две клетъчни линии: човешки тумори по белите дробове, означени като H1299 и нормални клетки от пъпна връв (HUVEC) се установи, че най-активен е скуталпин А с IC_{50} – 21.35 и 23.9 μ M. Неговата активност е по-висока от тази на изолираните от *Scutellaria coleifolia* *нео*-клероданови дитерпеноиди – скутефолид G₁, G₂, O₁, O₂, Q със същия скелет, които имат IC_{50} от 36.2 μ g/mL до 82.5 μ g/mL.

Научни приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е хипотезата на японските изследователи Којима и Kato, че присъствието в клеродановата структура на спиро епоксид при C-4 и две естерни групи при C-6 и C-19, заедно с хексахидро- или тетраhydroфуорофуранов пръстен при C-9, са предпоставка за висока антифидантна активност. Същевременно се потвърди и отличната активност на съединения, в които фуорофурановата система е заменена с γ -лактонен пръстен спиро-свързан при C-13, както е установено от италианските химици Rassuglia и съавтори при изследване на антифидантната активност на *нео*-клеродановите дитерпеноиди – хастифолини А – G, изолирани от *Scutellaria hastifolia*.
2. И трите *нео*-клероданови дитерпеноида, проявяващи цитотоксичност – скуталпин А (2), скуталпин Е (3) и скуталпин F (3) имат γ -лактонен пръстен в молекулата си, 13-спиро свързан с шест атомен оксанов пръстен, сключен между C-8 и C-13, както е докладвано за поредица дитерпеноиди, изолирани от азиатски видове на род *Scutellaria*.
3. Потвърдено е предположението на испанските изследователи López-Olguín и съавтори, че антифидантната активност на *нео*-клеродановите дитерпеноиди се определя от реактивоспособни групи (спиро свързани епоксиден и γ -лактонен пръстен, естерни групи) в декалиновия пръстен и от структурните фрагменти в страничната C-11–C-16 въглеродна верига.

Списък с научни публикации във връзка с дисертационния труд

1. **K. H. Nikolova**, I. T. Stoykov and P. I. Bozov, 2018, „Responsible structural features for cytotoxic and other kinds of activity of *neo-clerodane* diterpenes from genus *Scutellaria*“, BCC (*Journal Bulgarian Chemical Communications*), Volume 50/Special issue C, pp. 7-13, **IF: 0,238**.
2. **Katia H. Nicolova**, Norbert Kúsz, Judit Hohmann, Mladen M. Naydenov, Petko I. Bozov, 2018, „Two new *neo-clerodane* diterpenes from *Scutellaria galericulata*“, *Chemistry of Natural Compounds*, Volume 54, No. 1, pp. 77- 80, **IF: 0,450**.
3. Plamen N. Penchev, Josep Coll, **Katia Nicolova**, Ilia N. Iliev and Petko I. Bozov, 2016, „Minor diterpenoids from *Scutellaria galericulata*“, *Phytochemistry Letters*, Vol. 15, pp. 103-107, **IF: 1.418**.
4. Petko I. Bozov, **Katia H. Nicolova**, Veselin P. Bivolarski, Tonka A. Vasileva, 2014, „Antifeedant activity of *neo-clerodane* diterpenoids from *Scutellaria galericulata* against Colorado potato beetle larvae“, *J. Bio Sci. Biotech.*, pp.161-164.

Статията е цитирана в списание с **IF**.

Участия в национални и международни научни форуми във връзка с дисертационния труд

Международни научни форуми

1. **Katya Nikolova**, Petko Bozov, Thematic area 2: „Food Chemistry, Microbiology, Biotechnology and Safety“ entitled: „Isolation and identification of *Scutellaria* diterpenoids and testing on vegetable culture against Colorado larvae /*Leptinotarsa decemlineata* (Say)/“ (доклад), **65th Anniversary Scientific Conference with International Participation, „Food Sciences, Equipment and Technology – 2018“, University of food Technologies (UFT) – Plovdiv: 11^{nt} – 13th October, 2018, Plovdiv, Bulgaria;**
2. **Katya H. Nikolova**, I. T. Stoykov and P. I. Bozov., „Responsible structural features for cytotoxic and other kinds activity of *neo-clerodane* diterpenes from genus *Scutellaria*“ (постер), **First International Conference on Bio-antioxidants (ICBA 2017): „Natural Bio-antioxidants – as a base for new synthetic drugs and food additives/supplements“: 25 – 29 June, 2017, Sofia, Bulgaria;**
3. **Katya Nikolova**, I. T. Stoykov and Petko Bozov, „Two new *neo-clerodane* diterpenes isolated from *Scutellaria galericulata* and

cytotoxic activities of diterpenes from different *Scutellaria* genus“ (постер), **4th Balkan Scientific Conference on Biology: 1st – 3rd November, 2017, Plovdiv, Bulgaria.**

Национални научни форуми

К. Николова и П. Бозов, „Дитерпени от *Scutellaria galericulata* и биологичната им активност“ (доклад), **XVI Национална конференция по химия за студенти и докторанти 2017, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, 17 – 19 май, гр. София, България.**

Забелязани цитати на статии, свързани с дисертационния труд

- Plamen N. Penchev, Josep Coll, **Katia Nicolova**, Ilija N. Iliev and Petko I. Bozov, **2016**, „Minor diterpenoids from *Scutellaria galericulata*“, *Phytochemistry letters*, Vol. 15, pp.103-107, **IF: 1,418**.
1. Xiao Kai, Han Qing-Tong, Zhang Lei, Dai Sheng-Jun, **2017**, Two new flavanone glycosides from *Scutellaria galericulata* with anti-inflammatory activities., *Phytochemistry Letters*, Vol. 20, pp.151–154, **IF: 1,575**.
 2. Hanson James R., **2017**, Diterpenoids of terrestrial origin, *Natural Product Reports*, Vol. 34, No. 10, pp. 1233-1243, **IF: 11,406**.
- Bozov P. J., **Katia H. N.**, Veselin P. B., Tonka A., Vasileva, **2014**, Antifeedant activity of *neo-clerodane* diterpenoids from *Scutellaria galericulata* against colorado potato breedle larvae, *J. BioSci Biotech*, 15:161.
1. Raju Sripathi and Subban Ravi, **2017**, Ethnopharmacology, Phytoconstituents, Essential Oil Composition and Biological Activities of the genus *Scutellaria*, *Journal of Pharmaceutical Sciences&Research*, Vol. 9(3), pp. 275-287, **IF: 0,34**.

„Diterpenes of *Scutellaria galericulata* and their biological activity“

Katya Hristova Nikolova-Malamova
(PhD thesis – SUMMARY)

The genus *Scutellaria* consists of over 360 species worldwide. The *Scutellaria* species are renowned for their rich diversity and abundance of flavonoids, and other chemical constituents of the *Scutellaria* genus include *neo-clerodane* diterpenoids, to which most of its medicinal properties are ascribed. The *Scutellaria* species has been used in traditional medicine for many centuries and even today.

Our research focused on the health aspects of the diterpenoids on humans. It led to the isolation and structural elucidation, via different spectral methods, of new *neo-clerodane* compounds, testing the antifeedant effect of eleven natural *neo-clerodane* diterpenoids (14,15-dihydrojodrellin T, *neo-ajugapyrin* A, scutegalerin A, scutegalerin B, scutegalerin E, scutecolumnin C, scutegalin A, scutegalin D and scutalbin A, scutegalerin C and scutegalerin D) against *Leptinotarsa decemlineata* (Say) larvae and to testing the cytotoxic activity of twelve diterpenes from different *Scutellaria* genus on the two cell lines, for potential medical use.

The conclusions and recommendations from our research are the following:

1. From the chemotaxonomic point of view, only the diterpenoids with a *trans neo-clerodane* skeleton of the TC type are synthesized in *S. galericulata*.
2. In their structure the *neo-clerodane* diterpenoids isolated from *S. galericulata* contain the 4 α , 18-epoxide ring and the ester group at the C-6.
3. All isolated diterpenoids of *S. galericulata* contain 2 α , 19-chemiacetal or acetal ring.
4. The substitution of the ester groups in C-1, C-3, C-7 and C-19 in the decalin ring of the *neo-clerodanes*, with a hydroxyl or methoxy group, causes a reduction in the antifeedant activity. The activity increases when there is a double relation between the carbons C-14 and C-15.
5. The replacement of the tetrahydro-furofuran ring in the C-11-C-16 substructure of the lactone ring of the *neo-clerodanes* in the diterpenes scutegalerin C, scutegalerin D and scutegalin D, causes a significant activity reduction.
6. The degree of the antifeedant and cytotoxic activity depends on the various structural fragments and substituents in the *neo-clerodane* molecules.