

ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ «ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ»

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА „БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ“

---

**ПЕТКО ИВАНОВ БОЗОВ**

**Клероданови дитерпеноиди от видове на семейство Lamiaceae**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА**

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

**за придобиване на научната степен**

**“Доктор на науките“**

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.2. Химически науки (Органична химия)

ПЛОВДИВ, 2021 г.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за публична защита на разширено заседание на Катедра „Биохимия и микробиология“ при Биологическия факултет на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ на 12.02.2021 г.

*Дисертационният труд съдържа 290 страници и включва: 3 схеми, 33 таблици, 137 фигури, 276 цитирани заглавия, от които четири на български, 23 приложения.*

#### **Научно жури:**

проф. д.н. Георги Янков Папанов  
проф. д.н. Пантелей Петров Денев  
проф. д-р Петко Недялков Денев  
проф. д-р Николай Георгиев Василев  
проф. д-р Илиян Иванов Иванов  
проф. д-р Велизар Костадинов Гочев  
доц. д-р Пламен Ангелов Ангелов

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 11.05.2021 г. от ..... ч. в зала.....на Ректорат при Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“, ул. „Цар Асен“ № 24.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в университетската библиотека, Ректорат, ул. „Цар Асен“ № 24.

## ВЪВЕДЕНИЕ

Видовете на семейство Lamiaceae са разпространени във всички климатични пояси и надморски височини на земята. Не се срещат само в тундровата област и в ледените пустини на Арктика и Антарктида. Обитават сухи и влажни почви, срещат се и по мочурливи и заблатени места, но водни растения между тях няма.

Към това семейство принадлежат 200 рода с над 3500 вида. От него в България са установени около 135 вида, принадлежащи към 30 рода. Растенията от векове се използват в целия свят като лечебно средство в народната медицина, в парфюмерийно-козметичната и хранително-вкусовата промишленост.

Различните видове от родовете *Scutellaria* (Превара), *Teucrium* (Подъбиче), *Ajuga* (Срещниче) и *Salvia* (Какула, Конски босилек) от семейство Lamiaceae са богат източник на дитерпенови съединения с клероданов скелет, които се отличават с разнообразна биологична активност - антимикуробна, антифунгална, инсектицидна, антиулкусна, цитотоксична, антипиретична, аналгетична и други. Те се характеризират и като мощни антифиданти, потискащи храненето и развитието на ларвите на насекоми-вредители (*Leptinotarsa decemlineata* Say, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exempta*) нанасящи икономически значими щети по селскостопанските култури.

Представителите на космополитния род *Scutellaria* L (skullcaps) (около 360 вида), известни като превара и тубетейки, растат в различни климатични зони в целия свят с изключение на Южна Африка. Голяма част от тях са разпространени в Азия. Отличителна характеристика за видовете от род *Scutellaria* е венчелистче с горна устна с две плитки зъбчета с щитовиден, поголям или равен на нея, израстък (scutellum). Растенията от този род се използват широко в билкотерапията от хилядолетия. Екстракти от корените и надземните им части под формата на отвара намират приложение в Китайската народна медицина и до днес като ефективно средство срещу стафилококи, холера, дизентерия, пневмония и др. С помощта на фармакологични изследвания е потвърдено, че екстракти или индивидулни съединения от *Scutellaria* притежават цитотоксичен, хепатопротектен, антиоксидантен, противовъзпалителен, антиконвулсивен, антибактериален и антимикуробен ефект. Последователите на англо-американското училище по билкови лекарства, наречени физиомедикалисти са първите, които употребяват отвара от превара с успокояващо действие върху нервната система и ги използват за лечение на истерия, епилепсии конвулсии и сериозни психични заболявания като шизофрения. Едни от най-активните *нео*-клероданови дитерпени, изолирани от представители на род *Scutellaria*, клеродин (1), джодрелин А (11), джодрелин В (12), skutalbin А (9) и скутекипрол В (57) проявяват антифидантен, антифунгален, цитотоксичен, антимикуробен ефект. Джодрелин В е най-мощният познат до сега антифидант.

Изолираните клеродани от *Salvia divinorum* са природно срещащи се, несъдържащи азот вещества с потенциална и селективна агонистична активност

спрямо к-опиоид рецептори. Сред тях салвинорин е с най-голямо психоактивно действие.

Видовете на род *Teucrium*, около 360, са медоносни и с медицинско приложение. Лапи и отвари се прилагат при лечение на открити рани, болки в стомаха и червата, разстройство и други. *T. polium* се използва в средиземноморските страни при лечение на коремни болки, стомашни разстройства, ревматизим, диабет. При изследванията на алкохолни и водни екстракти на бяло подъбиче, се установяват антимикуробни, хипо-глицемични и антиоксидантни свойства. Stankovic и съавтори доказват цитотоксична активност на седем представители на род *Teucrium* срещу карциногенни клетки.

*T. capitatum* таксономически е близък с *T. polium* subsp. *polium*. Двата вида съдържат нео-клеродановите дитерпеноиди капитатин и аурополин, но в *T. capitatum* са намерени още клероданови съединения, които не са идентифицирани в *T. polium* subsp. *polium*. Бруно и сътрудници изследвайки през 2003 година автентична проба от *T. polium* subsp. *polium* доказват, че изолираните дитерпеноиди са коренно различни от срещаните се нео-клеродани във всички таксони означени като *T. polium*. Те препоръчват да се преразгледа идентификацията на растителния материал в работите изследващи дитерпеновия състав на този вид.

През 1973 г. в катедрата по Органична химия на ПУ „Паисий Хилендарски“ започват фитохимични изследвания на различни видове от семейство *Lamiaceae*. Изолирани и охарактеризирани са голям брой бициклени дитерпеноиди от нео-клероданов и нор-клероданов тип и пентациклени тритерпеноиди с урсанов и олеанов скелет. У нас сравнително пълно са изследвани растенията от родовете *Ajuga*, *Lavandula*, *Teucrium* от семейство *Lamiaceae*, докато представителите на род *Scutellaria* до 1992 година не са били обект на фитохимични изследвания.

Малаков и съавтори публикуват, от 1978 до 1983, година резултатите за изолираните и структурно охарактеризирани единадесет клероданови дитерпеноида от вида *Teucrium polium* подвид *polium*. В том IX на Флора на България, 1989 г. се актуализира систематиката на растенията от род *Lamiaceae*. В него се посочва, че вида *Teucrium polium* подвид *polium* не се среща в България, а са разпространени *Teucrium polium* подвид *capitatum* и *Teucrium polium* подвид *vincentinum*.

Предмет на изследване в настоящия труд са клеродановите дитерпеноиди в Българските видове от род *Scutellaria*, *Teucrium polium* subsp. *vincentinum* L. (Rouy) D. Wood, *Teucrium scordium* subsp. *scordioides* (Schreb.) Maire et Petitmengin, *Salvia splendens* Ker.-Gawl. и *Salvia nemorosa* L.

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Обзорът е направен на базата на 276 литературни източника, 4 от които на кирилица и е структуриран в три подрездела: **I.** Състав, строеж, класификация и биосинтез на терпените; **II.** Преглед на изолираните от видове на род *Scutellaria*, *Teucrium polium* и *T. scordium* клероданови дитерпеноиди и полифеноли и на проявяваните от тях биологични активности; **III.** Обобщение на химичния състав на етеричното масло, получено в страни от Балканския полуостров от същите видове както дестилираните в настоящия труд растителни видове; **IV.** Резултати от фитохимично изследване на *Scutellaria alpina* и *Ajuga salicifolia*, които са част от дисертационния труд на автора за придобиване на ОНС „доктор“.

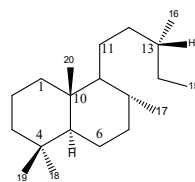
Представен е състава, строежа, класификацията и биосинтеза на терпените като е акцентирано върху бициклените и полициклените дитерпеноиди. Подробно е разгледана класификацията и номенклатурата на дитерпеноидите изолирани от род *Scutellaria*. Клеродановият скелет е разделен на два основни фрагмента: C-1 – C-10 декалинов пръстен и C-11–C-16 странична верига. Систематизирани са подструктурите в декалиновия фрагмент на молекулата на базата на окислителното число на C-18, а във C-11–C-16 фрагмента от въглеродния скелет подструктурите са групирани на базата на образуваните цикли.

Списък с имената и формулите на изолираните клероданови дитерпеноиди от видовете на род *Scutellaria* и от видовете *Teucrium polium* и *T. scordium* е даден в приложение 1 както и на изолираните полифеноли от видовете на род *Scutellaria*.

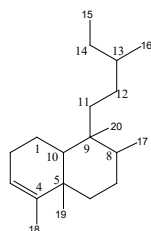
Разгледан е химичия състав на етеричното масло от *Ajuga laxmanii* Benth, *Salvia amplexicaulis* Lam. и *Stachys cretica* subsp. *bulgarica* Rech. Fil, разпространени на Балканския полуостров. Извършен е преглед на проявяваните биологични активности на екстракти от различни видове на род *Scutellaria*, от *T. polium* и *T. scordium*, етеричните масла от *Ajuga laxmanii*, *Salvia amplexicaulis* и *Stachys cretica* L. subsp. *bulgarica* rech. fil. По-задълбочено са разгледани активностите на индивидуални съединения – на полифеноли и особено на *нео*-клероданови дитерпеноиди и *нео*-клеродан дитерпенови алкалоиди.

След анализиране на обобщените данни от литературната справка са направени заключенията:

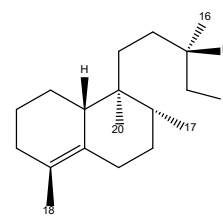
**1.** От класифицираните от Rowe и съавтори 14 основни скелета на циклените дитерпеноиди в родовете *Scutellaria* и *Ajuga* се срещат съединения с бицикления клероданов скелет. Клеродановите дитерпеноиди се разглеждат като съединения с прегрупиран лабданов скелет, вследствие на мигриране на  $\text{CH}_3$ -19 $\alpha$  метиловата група от C-4 при C-5. 19-*нор*-клеродановия скелет е разновидност на *нео*-клеродановия. Получава се при елеминиране на метиловата група и образуване на двойна връзка  $\Delta^{4,5}$ . От изолираните 286 дитерпена от видове на род *Scutellaria*, само три са с 19-*нор*-клероданов скелет,



лабданов скелет



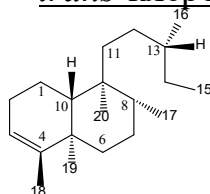
клероданов скелет



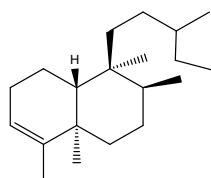
19-нор-клероданов скелет

скутефолид В<sub>1</sub> (249), скутефолид В<sub>2</sub> (250) и скутефолид С (251). От останалите 283 съединения повечето са с *нео*-клероданов скелет (тип ТС).

trans-клероданови скелети

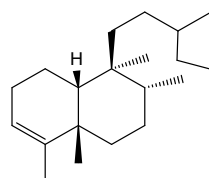


ТС - тип

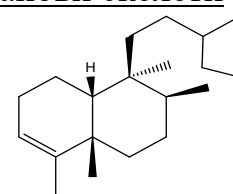


ТТ - тип

cis-клероданови скелети



СС - тип



СТ - тип

Изключение се наблюдава при поредица дитерпеноиди, изолирани от азиатските видове *S. rivularis*, *S. barbata*, *S. coleifolia* и *S. repens*, които са със скелет от типа СС. В род *Ajuga* са открити само *нео*-клероданови дитерпеноиди. В *Teucrium polium* и *T. scordium* са доказани дитерпеноиди както с *нео*-клероданов, така и с 19-нор-клероданов скелет. Във всички изолирани съединения е присъства фуранов пръстен. В много клеродани присъства един или два лактонни пръстена. В някои представители е наличен оксиранов, оксетанов, оксоланов, оксанов, полуацетален или ацетален пръстен. Монтанин А (309) е единствения клероданов дитерпен, който има две фуранови ядра. Изолирани са *нео*-клеродани както със скелет от типа ТС така и от типа СС. При два дитерпеноида, теухамаедрин А (357) и теувинцентин С (322), метиловите групи СН<sub>3</sub>-17 и СН<sub>3</sub>-20 са *trans* свързани.

2. Хидроксилните групи, в клероданите изолирани от род *Teucrium*, се естерифицират единствено с оцетна киселина, докато при дитерпеновите съединения доказани в представители на родовете *Scutellaria* и *Ajuga* се наблюдава разнообразие от ацилни групи: ацетил, 2-метилбутаноил, 2-метилпропаноил, (Е)-2-метил-2-бутеноил, *транс*-цинамоил, *цис*-цинамоил, бензоил, никотиноил, сенециоил и 3-хидроксибутаноил.

3. Екстракти от видове на род *Scutellaria* от древността се използват в народната медицина в Америка, Русия, Азиатските страни за превенция и лечение на широк спектър от заболявания. Например: 1. Екстракт от *S. rivularis* се използва в Тайланд и Япония за третиране на тумори, хепатит и чернодробна цироза. 2. Мексиканският вид *S. guatemalensis* е използван в местната билкотерапия като медицинско растение за третиране на психосоматични болести и някои стомашно-чревни разстройства. 3. *S. albida*. ssp. *albida*, тревисто многогодишно растение разпространено от северна Италия до Балканския и Кримския полуостров, се прилага в народната медицина при спазми, изпотпяване и треска. 4. Във Фармакопеята и Националния рецептурен сборник на САЩ, въздушно-сухите надземни части от *S. lateriflora* (известна

като skullcap) са регистрирани като седативен тоник за нервите и справяне с невралгии и мъчително чувство за безпокойство. Също така те са спазмолитик, лекарство за третиране на епилепсия, средство облекчаващо симптомите на пристрастеност към барбитурати и транквиланти. 5. В Китай, Корея и Индия, *S. indica* се използва като обезболяващо средство, за детоксикация и за стимулиране на кръвната циркулация. Листата от *S. scandens* растяща в Непал се използват за третиране на рани и отоци при ухапване от насекоми. Вторични метаболити от *S. amoena* се използват като средство с диуретични и аналгетични свойства. 6. *S. barbata* природно разпространена в Корея и Южен Китай е популярна билка в традиционната народна медицина и е вписана в китайската Фармакопея под името "Ban-Zhi Lian". Терапевтичната история на *Scutellaria barbata* обхваща повече от хиляда години. Екстракти от растението проявяват широка гама анти туморна активност спрямо човешки гинекологични туморни, левкемични и ракови клетки от дебелото черво, чернодробни и белодробни туморни клетки, такива по кожата и други.

4. Полифенолните съединения изолирани от видове на род *Scutellaria* съдържат метокси или хидроксилни групи в ароматните пръстени. Тествани са поредица биологични свойства на веществата и са установени антибактериален, анти туморен, анти-оксидантен ефект и други активности. Вербаскозид, изолиран и идентифициран в *S. altissima*, е с изразено терапевтично действие. Доказана е неговата противовъзпалителна, противовирусна, анти-бактериална, антиоксидантна и цитотоксична активност.

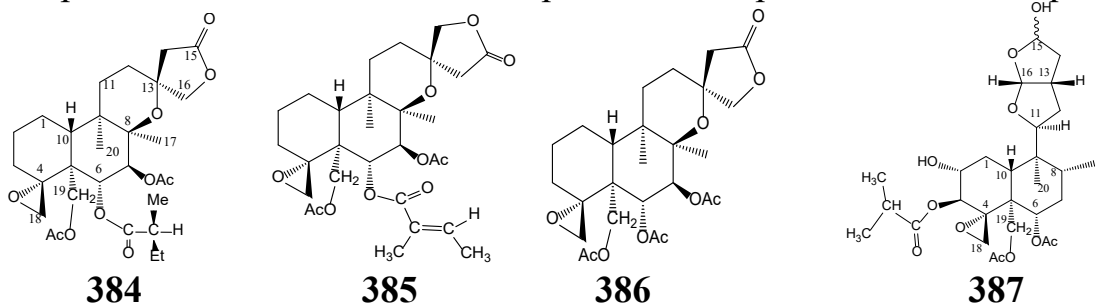
5. *Нео-клеродановите* дитерпеноиди са биологично-активни вещества проявяващи антимикуробни, антифунгални, инсектицидни и други свойства. Те се характеризират и като мощни антифиданти, потискащи храненето и развитието на ларвите на насекоми-вредители. Джодрелин В (12) изолиран през 1989 година от *S. woronowii* е най-мощният познат антифидант.

6. Особено богата на дитерпени е *Scutellaria barbata*. От това растение са изолирани 73 *нео-клеродан* дитерпенови алкалоида и 45 *нео-клероданови* дитерпенода, от които четири са с клероданов скелет с СС свързване на метиловите групи  $\text{CH}_3\text{-18/CH}_3\text{-19}$  и на  $\text{CH}_3\text{-17/CH}_3\text{-20}$ . При останалите съединения скелета е от типа ТС. Освен доказаните в *S. barbata* *нео-клеродан* дитерпенови алкалоиди, скутестригилосин А (237) е единственият азот съдържащ дитерпеноид, изолиран от *S. strigillosa*. Много от изолираните клеродани от *S. barbata* проявяват силно изразена цитотоксична активност с  $\text{IC}_{50}$  стойности в интервала от 2.5–8.0 до 17.9–35.7  $\mu\text{M}$  срещу поредица карциномни клетъчни линии от туморни образувания при човека.

**Резултати от фитохимично изследване на *Scutellaria alpina* и *Ajuga salicifolia* за наличие на *нео-клероданови* дитерпеноиди, участвали в процедура за придобиване на ОНС „Доктор“ на тема: „Ди- и тритерпеноиди в представители от семейство *Lamiaceae* и биологичната им активност“**

Фитохимичните изследвания на растенията от род *Scutellaria* в България, започват през 1991 год., в лабораторията по Биоорганична химия към катедрата

по Органична химия при ПУ“ Паисий Хилендарски“, с проучването на *нео*-клеродановите дитерпеноиди в *Scutellaria alpina*. През 1993 г. Бозов и съавтори публикуват данните за първият изолиран клеродан, скуталпин А (**384**). През следващата година Бозов в друг колектив охарактеризира още два дитерпеноида от това растение, скуталпин Е (**385**) и скуталпин F (**386**). И трите съединения притежават, във C-11–C-16 подструктурата, наситен  $\gamma$ -лактонен пръстен 13-*стиро*-свързан с оксанов цикъл сключен между C-8 и C-13. Абсолютната стереохимия на скуталпин А и абсолютната конфигурация на асиметричния въглероден атом C-2' са установени с рентгеноструктурен анализ. Скуталпин А е първият  $8\beta,13S$ -епокси-*нео*-клеродан-15,16-олид намерен във вид от род *Scutellaria*, растящ в Европа, въпреки че тези структурни арактеристики са доказани в *нео*-клеродани изолирани от видове на род *Scute-*



*llaria* от далечния изток - *Scutellaria hematoclora*, *Scutellaria rivularis*.

Едновременно с това проучване е разработен и растителен екстракт от *Ajuga salicifolia* (L.) Shreb. Единствения изолиран дитерпеноид е C-15 епимерна смес от 15R,15S-14,15-дихидро-15-хидрокси аюгахин А (**387**). Характерен структурен фрагмент на **387** е наличието на хексахидро фурофуранов пръстен сключен между C-11–C-16, който е често срещан в клеродановите съединения изолирани от представители на род *Ajuga*.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото проучване е:

Изолиране на клероданови дитерпеноиди от видове на род *Scutellaria*, *Teucrium* и *Salvia*. Изучаване на строежа, стереохимията и антифидантна активност на съединенията, тестване на цитотоксичното и антимикробно действие на избрани дитерпеноиди.

За постигане на поставената цел се изпълниха задачите:

- 1) Събиране на надземни части от видовете за изследване, определянето им и подготовка на суровината за изчерпателно екстрахиране на органичните съединения;
- 2) получаване на горчива фракция, в която се съдържат основно клеродановите дитерпеноиди;
- 3) хроматографско разделяне на горчивата фракция до изолиране на индивидуални дитерпени;
- 4) определяне на физико-химичните показатели на съединенията;



5) спектрално охарактеризиране на дитерпеноидите (ИЧС, МС,  $^1\text{H}$  ЯМР,  $^{13}\text{C}$  ЯМР, DEPT 135,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC, HMBC, NOE, NOESY) за доказване на структурата и стереохимията на веществата;

6) тестване на антифидантната активност на растителни екстракти и на индивидуални клероданови дитерпеноиди, установяване на взаимовръзката строеж-антифидантна активност;

7) тестване на антимикробната и цитотоксична активност на избрани клероданови дитерпеноиди.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Изходен растителен материал на научното изследване

Настоящият дисертационен труд е продължение на фитохимичното изследване на *нео*-клеродановата дитерпеноидна фракция на *Scutellaria alpina* и *Ajuga salicifolia* (Lamiaceae), което е част от работата за придобиване на научната и образователна степен „доктор“. Обект на проучването са неизследвани и слабо изследвани видове и подвидове на пет рода: *Scutellaria*, *Teucrium*, *Salvia*, *Ajuga*, *Stachys*. Всички проучвани растения са диворастващи, широко или по-малко разпространени в различни региони на страната. Растителният материал, състоящ се от надземните части на растенията, е събиран по време на цъфтеж от естествени хабитати в цяла България и е определен в катедрите по Ботаника при ПУ „Паисий Хилендарски“ град Пловдив, при Аграрен Университет – Пловдив и в Института по Ботаника към БАН – София. Събрани и изследвани са растителните видове: *Scutellaria alpina* (L) (Алпийска прева), *Scutellaria orientalis* (L) (Перестолистна, източна прева), *S. albida* (L) (Белезникава прева), *S. altissima* (L) (Високостъблена прева), *S. galericulata* (L) (Единичноцветна прева), *S. hastifolia* (L) (Копиелистна прева), *S. velenovskyi* Rech. Fil. (Родопска прева), *S. columnae* All. (Пурпурноцветна прева), *Teucrium polium* subsp. *vincentinum* L. (Rouy) D. Wood (Бяло подъбиче), *T. scordium* subsp. *scordioides* (Schreb.) Maire et Petitmengin (Чесново подъбиче), *Salvia splendens* Ker.-Gawl. (Пламяк, Пожарче), *S. nemorosa* L. (Горска какула), *S. amplexicaulis* LAM. (Стъблообхващаща какула), *A. laxmanii* (L.) Benth. (Лаксманово срещниче), *Stachys cretica* L. subsp. *bulgarica* rech. fil. (Критски чистец).

### 2. Методи за изолиране и разделяне на биологично-активни вещества

#### 2.1. Изолиране на клероданови дитерпени

Клероданите се съдържат главно в листата и стъблата на растенията. За извличането им растителният материал се суши на сянка, смила се фино и се екстрахира изчерпателно с подходящ органичен разтворител (ацетон, метанол, диетилов етер и други), подборът на който зависи от стабилността и полярността на веществата. След филтруване, екстрактът се концентрира под вакуум при 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, танините, восъците и други вещества присъстващи в голямо количество се

утаяват, а терпеновите съединения остават във водно-ацетоновия разтвор. Утайката се филтрува и филтратът се екстрахира с хлороформ до пълното извличане на дитерпените (отрицателна проба на ТСХ). Тъмно-зелената утайка отново се разтваря в ацетон, разрежда се с вода в съотношение 1:1 и се оставя при 4 °С. Дестилационният остатък представлява жълто-кафяв смолообразен продукт, наречен горчива фракция поради силно горчивия вкус на клеродановите дитерпеноиди. Горчивата фракция се подлага на хроматографско разделяне и прекристализация до получаване на чисти вещества. Използваните методи са колонна хроматография (КХ), препаративна тънкослойна хроматография (ПТХ) и препаративна високо ефективна течна хроматография (HPLC) върху различни адсорбенти – силикагел, алуминиев оксид и други. Процесът на делене и чистотата на съединенията се контролира чрез тънкослойна хроматография (ТСХ).

## 2.2. Получаване на етерично масло

Растителният материал се изсушава на сянка и се определя съдържанието на влага в дрогата при нагряване до 105 °С. Маслото се дестилира с лабораторна стъклена апаратура на Британската Фармакопея, суши се над безводен натриев сулфат и се съхранява в плътно затворени тъмни фиалки при 4 °С до анализите. Химичните съединения в етеричните масла се идентифицират при сравнение на тяхното време на задържане, при разделяне на газ хроматограф, с литературните данни за стандартни етерични масла и на регистрираните Мас-спектри. Изчислява се количеството на компонентите в проценти.

## 2.3. Изследване на тоталното съдържание на флавоноиди

Приготвят се двупроцентни разтвори от смлян растителен материал в дестилирана вода, 70% етанол, 96% етанол и метанол. Екстракцията се провежда при стайна температура 25°C за 24 часа. Обединените екстракти се филтрират през микрофилтър (0.25 μm) и се инжектират в HPLC системата. След елуиране с градиент от метанол, ацетонитрил и вода и регистриране на ултравиолетови и видими абсорбционни спектри, количествено се определят флавоноидите. Екстрактите са получени в Лабораторията по Фитохимия при Медицински колеж Пловдив. Анализите са извършени в Катедрата по Биоорганична химия към Фармацевтичен факултет на Медицински Университет, Пловдив.

## 3. Спектрални методи за определяне на структурата и стереохимията на съединенията

### 3.1. Определяне на елементния състав на органичните съединения

За да се състави молекулната формула на веществата е необходимо да се знае техния елементарен състав, за определянето на който се прилагат методите на качествения и количествения елементарен анализ. *Нео*-клеродановите съединения са изградени от атоми на химичните елементи, въглерод, водород и кислород. За намиране на молекулната формула на клероданите се определя процентното количествено съдържание на въглерод и водород в молекулите им. При съвременния органичен анализ с мас-спектрометри с висока резолюция се

определя молекулната маса на съединенията с точност до четвъртия знак след десетичната запета. По този начин можем да определим молекулната формула на веществото.

### 3.2. Инфрачервена спектроскопия (ИЧС)

С помощта на ИЧ спектрометрия се установяват различни функционални групи, някои фрагменти от въглеродния скелет, както и нейната идентичност при сравнение на спектъра ѝ с тези на познати органични съединения. ИЧ спектрите са регистрирани в таблетки от KBr за кристалните вещества и в капиларен слой между две таблетки KBr за маслообразните, на Perkin-Elmer 1750 FT-ИЧ спектрометър от  $4000\text{ cm}^{-1}$  to  $450\text{ cm}^{-1}$  при резолюция  $4\text{ cm}^{-1}$  с 9 скена и на Vertex 70 спектрометър от  $4000\text{ cm}^{-1}$  до  $400\text{ cm}^{-1}$  при резолюция  $4\text{ cm}^{-1}$  с 25 скена и на Bruker Tensor 27 спектрометър от  $4000\text{ cm}^{-1}$  to  $400\text{ cm}^{-1}$  при резолюция  $4\text{ cm}^{-1}$  със 70 скена. Измерванията са извършени в Катедрата по Аналитична химия при Химически Факултет на ПУ “Паисий Хилендарски“ и в лабораторията по вибрационна спектроскопия в ИОХ при БАН, София.

### 3.3. Мас-спектрометрия (МС)

Мас спектрите са измерени на Hewlett Packard 6890 GC System Plus/5973 MSD спектрометър и на ACQUITY UPLC® (Waters Corporation, Milford, MA) с Q-ToF Premier™ мас-спектрометър с детектор (Waters Corporation) в областта 50-1500 Da. Разтваря се 0.2 mg от веществата в  $100\text{ }\mu\text{L}$  MeOH, добавя се  $10\text{ }\mu\text{L}$  HCOOH и разтвора се разрежда до 1 mL. Измерванията са извършени в Биологически Факултет на ПУ“Паисий Хилендарски“ и в Катедрата по Биологична Химия и Молекулярна Биология, към Institut de Química Avançada de Catalunya, CSIC, J. Girona, Барселона, Испания.

Използването на високоразделителна мас-спектрометрия, при която масовото число на молекулния йон и/или фрагментните йони се определя с голяма точност (няколко знака след запетаята), позволява да се изчисли брутната формула на съединението.

### 3.4. Спектроскопия на ядрено-магнитния резонанс (ЯМР)

$^1\text{H}$  ЯМР ( $600.130\text{ MHz}$ ,  $500\text{ MHz}$ ,  $400.13\text{ MHz}$  и  $250.13\text{ MHz}$ ) и  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $150.903\text{ MHz}$ ,  $125\text{ MHz}$ ,  $100.61$  и  $62.91\text{ MHz}$ ) спектрите са измерени на Bruker Avance II+ 600 спектрометър, Bruker Avance 500 спектрометър, Mercury 400 спектрометър (Varian, Zug, Switzerland) и Bruker DRX-250 спектрометър в  $\text{CDCl}_3$  или  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  при стандартни 1D и 2D условия с последователни импулси. Разтваря се такова количество от веществата, в  $0.6\text{ mL}$  деутериран хлороформ или ацетон, което да осигури  $0,05\text{ M}$  концентрация за регистриране на  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите и  $0.005\text{ M}$  концентрация при  $^1\text{H}$  ЯМР спектрите. TMS е използван като вътрешен стандарт. Химичните отмествания ( $\delta$ ) са изразени в ppm, а константите на спиново взаимодействие ( $J$ ) в Hertz. Измерванията са извършени в Института по Органична химия с център по Фитохимия при Българска академия на науките; в Катедрата по Биологична Химия и Молекулярна Биология, към Institut de Química Avançada de Catalunya, CSIC, J.

Girona, Барселона, Испания и в Катедрата по Фармакогнозия към Университета на Szeged, Унгария.

#### 3.4.1. Протонен ядрено-магнитен резонанс ( $^1\text{H}$ ЯМР)

*Нео*-клероданите съдържат от 22 до 44 водородни атома, ядрата на които дават сигнали в широка област от 0.8 до 11 м.ч. в  $^1\text{H}$  ЯМР-спектъра. В  $^1\text{H}$  ЯМР спектрите на *нео*-клеродановите дитерпеноиди, с транс свързване на пръстените А и В в декалиновата подструктура на молекулата от типа ТС, присъстват характеристични сигнали за протоните: H-10, който се явява като двоен дублет в областта 2.70 – 1.7 ppm със стойност на константата на спин-спиново взаимодействие  $J$  около 10 и 4 Hz; метиловите протони H<sub>3</sub>-17 се наблюдават като дублет при около 0.90 ppm с  $J$  константа от 5.5 до 6.7 Hz; метиловите протони H<sub>3</sub>-20 резонират като синглет в областта от 0.90 до 1.25 ppm.

#### 3.4.2. Въглероден ядрено-магнитен резонанс ( $^{13}\text{C}$ - ЯМР)

При определяне на структурата и стереохимията на органичните съединения  $^{13}\text{C}$  - ЯМР спектроскопията дава възможност за директно изследване на въглеродния скелет и идентифициране на функционалните групи, съдържащи въглеродни атоми. Така например в  $\gamma$ -лактонния пръстен резонансният сигнал, за карбонилния въглероден атом, се явява в областта 172-178 ppm. Резонансните сигнали за въглеродните атоми при двойната връзка се наблюдават в областта 120-150 ppm, а този за карбонилния въглероден атом в ацетатната група при 170 ppm. Резонансният сигнал за въглерода от кетонна група се явява при 210 ppm, а този за въглерод, свързан с кислороден атом - в областта 55-85 ppm. Мястото на хидроксилните групи може да се установи по промяната на химичното отместване на съответния въглероден атом след ацетилиране с  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$ .

#### 3.4.3. DEPT (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer)

DEPT  $135^\circ$ -метода е разновидност на  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, при който се получават резонансни сигнали за първични, вторични и третични C-атоми. При този метод фазите за резонансните сигнали за  $\text{CH}_2$ -групите е противоположна на фазите на резонансните сигнали за  $\text{CH}$  и  $\text{CH}_3$ -групите, четвъртичните и непротонирани въглероди не се явяват в спектъра. При сравнение на нормално снетия  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектър, с този снет след прилагане на DEPT-метода се определят сигналите за непротонирани C-атоми и се получава информация за всички  $\text{CH}_n$ -фрагменти ( $n = 1, 2$  или  $3$ ).

#### 3.4.4. Двумерни ЯМР спектри

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Correlated Spectroscopy) спектроскопия. При двумерните  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY експерименти, известни като хомоядрено корелиране, на абцисата и на координатата са представени химичните отмествания на протоните. В двете половини на спектъра, където съществува корелация между химичните сигнали, се появява контур. Образува се графика с еднакъв спектър за всяка от двете оси и диагонал на контурите на обикновения спектър. Интерпретират се извъндиагоналните контури. Стойностите на спиновите константи на

взаимодействие не могат да бъдат определени с този метод, но от факта, че двата резонанса са свързани (колерирани) се получава информация за спин спиновото взаимодействие между протоните.

*HSQC (heteronuclear single quantum coherence) и HMBC (heteronuclear multiple bond connectivity)*. При тези експерименти се извършва корелация между две различни ядра. В спектъра няма диагонален елемент, а корелацията е обозначена в точката на кръстосване на двата сигнала с контурни линии както при топографска карта. HSQC спектрите показват корелацията през една връзка на директно свързаните водородни и въглеродни атоми. Корелационните контури за метиленовите протони са две на едно ниво (освен в случаите на изохронни ядра) и са различно оцветени от метиновите и метиловите протони, които корелират с едно контурно петно. При интерпретирането на HSQC спектрите се отнасят всички H-атоми към съответните C-атоми.

*HMBC спектъра* дава информация за H- и C-атоми, които си взаимодействат през 2, 3, 4 до 5 връзки. В него не се разграничават метиленовите протони от метиновите и метиловите протони. Често от двойката метиленови протони само единия хетероколерира с даден въглероден атом. С този метод се определят местата и на непротонираните въглеродни атоми.

*NOE (Ядрен ефект на Оверхаузер)*. При него се сравняват  $^1\text{H}$  - ЯМР спектър, който е снет при нормални условия с този снет при селективно  $^1\text{H}$  облъчване. Ако в последния спектър се наблюдава един интензивен отрицателен пик при облъчената честота и няколко по-малко интензивни положителни резонансни сигнала, то последните съответстват на протоните с увеличен интензитет предизвикан от ЯЕО.

*NOESY (Nuclear Overhauser effect spectroscopy)*. NOESY корелационни пикове свързват само резонанси от ядра които са пространствено сближени, а не свързани ядра през химични връзки. Корелацията между сигналите зависи от разстоянието на което се намират протоните, като нормално сигнал се наблюдава само ако дистанцията между тях е по-малка от 5 Å. NOESY експеримента е важно средство за установяване на стереохимията на молекулата в разтвор, за разлика от рентгеноструктурния анализ на единичен кристал, използван за изясняване на стереохимията в твърдо състояние.

## 4. Тестване на биологични активности

### 4.1. Антифидантна активност

Биологичните изпитания са проведени в петриевы стъкла (15 x 85 mm) с покрити дъна с филтърна хартия и използване на картофени дискове с 2 cm<sup>2</sup> площ по методиката описана от Belles и съавтори. Разтварят се 3.3 mg от веществата в 1 mL ацетон, което осигурява доза от 1000 ppm (33 µg/cm<sup>2</sup>) при нанасяне на 10 µL от разтвора върху 1 cm<sup>2</sup> от картофените дискове. При разреждане на разтвора се получават съответните концентрации на работните разтвори използвани при биоанализите. Горната повърхност на дисковете се третира с 20 µL ацетонови разтвори на тестваните съединения с микроспринцовка и след изпарение на разтворителя се получават третираните дискове (TD). Контролните дискове (CD) са подготвени аналогично с чист

разтворител. За стандарт са използвани скутекипрол А и клеродин, които са известни с мощното си антифидантно действие. Активността се изпитва срещу ларви на колорадския бръмбар (*Leptinotarsa decemlineata* Say), II - IV стадий на развитие, събрани от картофени полета на с Първенец, Пловдивско. Анализите се провеждат при условия на хранене с избор. Във всяко петриево стъкло се поставят четири третирани и четири контролни дискове. Новоизлюпени ларви в четвърти стадий на развитие, оставени без храна за 5 часа, се поставят по осем във всяко петриево стъкло да се хранят. През равни интервали от време 20 минути в продължение на 4-6 часа се измерват консумираните области от третирани дискове (CTD) и тези от контролните дискове (CCD). Антифидантната активност е отчетена чрез коефициент на хранене FR (feeding ratio), изчислен като съотношение между консумираната област от третирани дискове и консумираната област от контролните дискове по формулата:

$$FR = CTD/CCD.$$

#### 4.2. Антимикробна активност

Антимикробните ефекти на изследваните съединения са тествани срещу Грам-положителни бактерии *Bacillus cereus* (изолат от храна), три щама *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, ATCC 1805 и един изолат от храна), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 12344) и *Listeria monocytogenes* (ATCC 8632, изолат от храна), както Грам-негативни бактерии: три щама на *Escherichia coli* (ATCC 25922, ATCC 3397 и един клиничен изолат), три щама *Salmonella abony* (ATCC 6017, ATCC 6017 и един клиничен изолат), три щама на *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, един клиничен изолат и един изолат от развалена храна), *P. fluorescens* (изолат от храна) и *Aeromonas hydrophila* (изолат от храна), определени и систематизирани както е публикувано в изследването на Girova и съавтори. Допълнително е проведено антимикробно изследване срещу три щама *Candida albicans* (ATCC 10231, ATCC 90030 и един клиничен изолат). Бактериалните щамове са изолирани от развалени охладени хранителни продукти, както е описано от Delaquis.

Анализите са извършени в Катедрата по Микробиология на Пловдивски Университет.

#### 4.3. Цитотоксична активност.

*Колориметричен МТТ (тетразолиев) анализ.* Тестването за цитотоксична активност на дитерпени, изолирани от представители на род *Scutellaria* от семейство *Lamiaceae*, е проведено по методиката развита от Tim и съавтори. Тетразолиевата сол МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид], (Sigma Catalog № M2128) се разтваря в PBS в съотношение 5 mg/mL и се филтрира, за да се стерилизира и отстрани малкото количество от неразтворим остатък в някои партиди МТТ.

Клетките ( $0.5 \times 10^4 \div 1 \times 10^4$ ) са посяти в 125  $\mu$ L хранителна среда в 96 ямкова плака. Прибавя се от работния разтвор на веществата към хранителната среда на клетките, така че крайната концентрация да е от 300  $\div$  150, 75, 37.5, 19  $\mu$ M. Интензивността на лилавото оцветяване се измерва с четец Dynatech MR580 Microelisa, като се използва дължина на вълната от 570 nm, референтна

дължина на вълната 630 nm и настройка за калибриране 1.99 (или 1.00 ако пробите са силно оцветени). Плаките обикновено се отчитат в рамките на 1 час след добавяне на изопропанола, като се отчита МТТ-показател. Данните се обработват на програма (Graph Pad Prism), която изчислява IC<sub>50</sub> - концентрацията на веществата и регистрира резултатите в табличен вид. За контрола се използва чиста вода. Четири тествания се извършват за всяка концентрация. Анализите са извършени в Института по Молекулярна биология при БАН – София.

**Клетъчни линии:** За скрининг на инвитро цитотоксична активност са избрани две клетъчни линии: карциногенни клетки от тумори по белите дробове, означени като H1299 и нормални клетъчни линии - HUVEC (клетки от пъпна връв). Клетъчните линии са получени от BPS Bioscience. Експериментите са извършени с готови клетки, поддържани в лабораторни условия при изкуствена среда. Закупените клетки се поддържат в изкуствена среда (DMEM - HUVEC; RPMI - H1299) и често се пресяват.

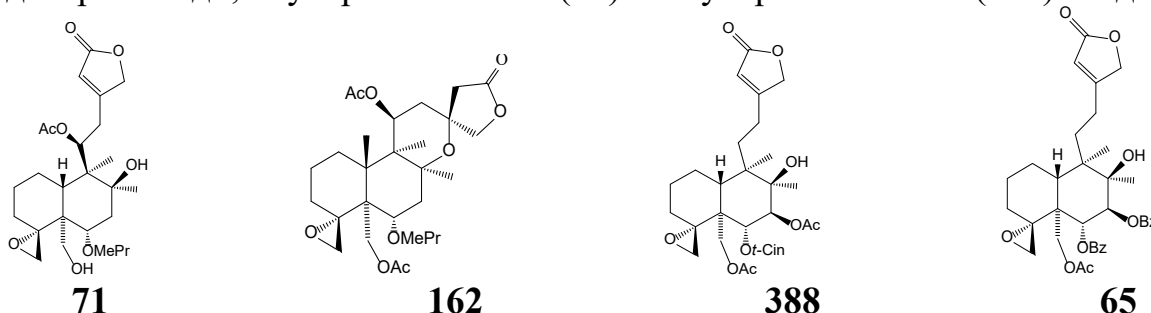
**Работни разтвори:** Пробите от разтвори, с които е извършено тестването се приготвят чрез разтваряне на 1 mg от дитерпеноидите в 50 µL DMSO (диметилсулфоксид). За получаване на тестовите разтвори, два или три µL от разтвора на съединенията в DMSO са разредени с 1 mL хранителна среда, така че концентрацията на DMSO в работните разтвори да стане 0.2 ÷ 0.3%. За биотестванията се взема толкова количество от работните разтвори, че след допълнително разреждане в хранителната среда да се получат в 125 µL концентрации от 300, 150, 75, 37.5 и 19 µM.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Определяне на структурата и стереохимията на изолираните биологично-активни вещества от видове на род *Scutellaria*, *Teucrium* и *Salvia*

#### 1.1. Фитохимично изследване на видове от род *Scutellaria* за наличие на неоклероданови дитерпеноиди

В резултат на анализирането на ацетоновия екстракт, получен от надземните части на *S. orientalis* subsp. *pinnatifida*, са доказани познатите неоклероданови дитерпеноиди, скуториенталин В (71) и скуториенталин D (162) заедно с един

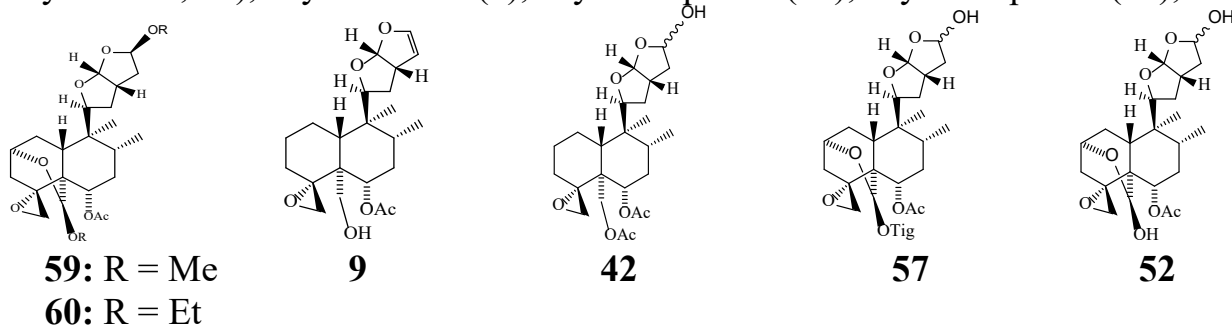


нов неоклеродан, скуториенталин Е (388), чиято структура, 7β,19-диацетокси-ба(Е)-цинамоилокси-4α,18-епокси-8β-хидрокси-неоклерода-13-ен-15,16-олид, е установена чрез спектрални изследвания и сравняване на данните с родствени съединения. На базата на елементния анализ за 388 е определена молекулна

формула  $C_{33}H_{40}O_{10}$ . Неговият ИЧ спектър показва ивици за хидроксилна група ( $3458\text{ cm}^{-1}$ ),  $\alpha,\beta$ -ненаситен  $\gamma$ -лактон ( $1780$  и  $1173\text{ cm}^{-1}$ ) и естерни групи ( $1746$  и  $1240\text{ cm}^{-1}$ ).

Данните от  $^1\text{H}$  ЯМР и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите на **388** са почти идентични с тези на скуталпин L (**65**) изолиран от de la Torre и съавтори от *Scutellaria alpina*. Наблюдаваните разлики са в съгласие с наличният в **388**, естер на (E) канелената киселина ( $\delta_{\text{H}}$  6.32 d, H-2'; 7.58 d,  $J = 16\text{ Hz}$ , H-3'; 7.51 m, 2H-5',9'; 7.38 m, 3H-6',7',8';  $\delta_{\text{C}}$  165.5 s C-1'; 117.5 d, C-2'; 146.0 d, C-3'; 134.3 s, C-4'; 128.3 d, C-5' и C-9', 128.9 d, C-6' и C-8' и 130.4 d, C-7') и ацетатна група при C-6 и C-9 вместо двете бензоатни групи представени в **65**. В  $^1\text{H}$  ЯМР и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите на **388** присъстват сигнали за две ацетатни групи при  $\delta_{\text{H}}$  1.99 s и 2.08 s /  $\delta_{\text{C}}$  169.9 s и 170.8 s и за два дублета съответстващи на аксиалните протони при C-6 $\beta$  и C-7 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H-6}\beta}$  5.30 d;  $\delta_{\text{H-7}\alpha}$  5.49 d,  $J_{6\beta,7\alpha} = 10.0\text{ Hz}$ ). Позицията на (E) канеленият естер в скуториенталин E е установена от хетерокорелациите в НМВС спектъра между карбонилния въглерод на канеления ацилен остатък ( $\delta_{\text{C}}$  165.5) и H-6 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  5.30) протона, докато карбонилните въглероди на двете ацетатни групи ( $\delta_{\text{C}}$  169.9 s и 170.8 s) корелират с H-7 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}}$  5.49) и H<sub>2</sub>-19 ( $\delta_{\text{H}}$  4.71) протоните, така че мястото на свързване на (E) канеленият естер е при C-6, а на двете ацетатни групи при C-7 и C-19. Присъствието на канелената функция се потвърждава от интензивния пик при m/z 131 в мас спектъра на скуториенталин E. Третичната хидроксилна група е локализирана при C-8 на базата на свиването на обичайния дублет за Me-17 протоните в синглет и парамагнитното им отместване при  $\delta_{\text{H}}$  1.15 s и  $\delta_{\text{C}}$  21.3 q (C-17). Също така в НМВС спектъра е налична корелация от Me-17 до непротонираният оксигенериран C-8 (78.6, C). Относителната конфигурация на **388** е установена от NOESY взаимодействията на аксиалният 6 $\beta$  протон с H-10 $\beta$ , H<sub>B</sub>-18 и ацетокси групата при C-7 $\beta$ . От друга страна Me-20 протоните хомо-корелират при NOESY експеримента с H-7 $\alpha$ , Me-17 и H<sub>2</sub>-19. От тези корелации се направи извода, че скуториенталин E притежава същата стереохимия като скуталпин L. От всички описани данни за скуториенталин E е отнесена структурата **388**. Това съединение е първият, изолиран от вид на *Scutellaria*, нео-клероданов дитерпеноид съдържащ остатък на канелената киселина в молекулата си. Абсолютната конфигурация на **388** не е доказана, но от биогенетична гледна точка може да се заключи, че съединението принадлежи към нео-клеродановата серия дитерпеноиди, изолирани от представители на род *Scutellaria*.

От *S. albida* са получени пет нео-клероданови дитерпеноида, скуталбин D (= скуполин I, **59**), скуталбин A (**9**), скутекипрол A (**42**), скутекипрол B (**57**),

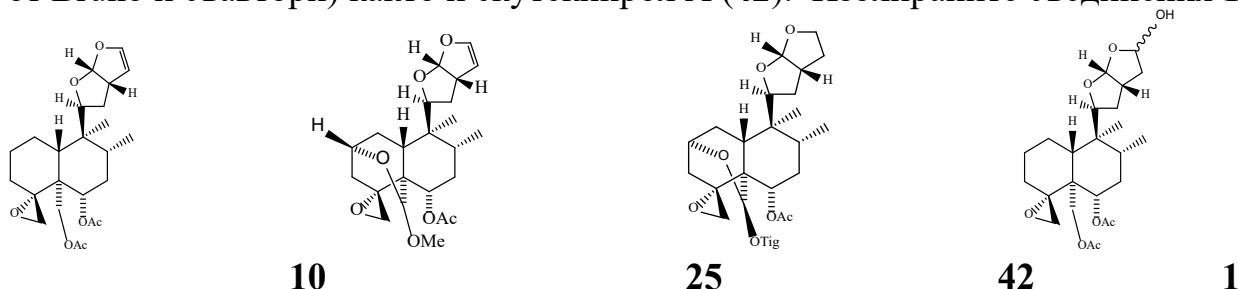




скуталтисин (= скуталбин С, **52**). Известните съединения скуталбин А, скутекипрол А, скутекипрол В и скуталтисин са идентифицирани чрез сравняване на физичните им константи (т.т.,  $R_f$  – стойност,  $[\alpha]_D^{25}$ ), ИЧ и  $^1\text{H}$  ЯМР данни с автентични проби. За скуталбин D (**59**) е определена молекулна формула  $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_8$  на базата на количествения елементен анализ и молекулния пик в мас-спектъра при  $m/z$  452  $[\text{M}]^+$ . Данните от  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите разкриват присъствието в структурата на **59** на две метокси групи ( $\delta_{\text{H}}$  3.33 s, 3H /  $\delta_{\text{C}}$  54.7 и  $\delta_{\text{H}}$  3.49 s, 3H /  $\delta_{\text{C}}$  55.2), ацетокси група ( $\delta_{\text{H}}$  2.10 s, 3H /  $\delta_{\text{C}}$  170.4 s) и характеристичните сигнали за декалинова система (Me-17 при  $\delta_{\text{H}}$  0.90 d,  $J = 6.1$  Hz /  $\delta_{\text{C}}$  16.6 q; Me-20 при  $\delta_{\text{H}}$  1.10 s /  $\delta_{\text{C}}$  14.1 q) с  $4\alpha,18$  оксиранов пръстен ( $\delta_{\text{H}}$  2.93 и 2.35 d,  $J = 4.4$  Hz;  $\delta_{\text{C}}$  48.9  $\text{CH}_2$ ) и хексахидро фурофураново ядро в страничната C-11 – C-16 верига ( $\delta_{\text{H}}$  3.99 dd,  $J = 11.5, 4.7$  Hz, H-11 /  $\delta_{\text{C}}$  48.9 CH;  $\delta_{\text{H}}$  2.96 m, H-13 /  $\delta_{\text{C}}$  40.9 CH;  $\delta_{\text{H}}$  5.70 d,  $J = 5.4$  Hz, H-16 /  $\delta_{\text{C}}$  104.9 CH). Двете метокси групи са отнесени към въглеродните атоми C-15 и C-19, образувайки два ацетални пръстена с характерни сигнали при  $\delta_{\text{H}}$  5.10 s /  $\delta_{\text{C}}$  100.2 и 5.11 br d,  $J_1 = 3.5$ ;  $J_2 < 1.0$  /  $\delta_{\text{C}}$  144.1, които са почти идентични с ЯМР данните, докладвани от Ohno през 1996 г., за съединение **60** (без тривиално наименование) с две етокси групи, изолирано от *S. discolor*, растяща в Непал. Относителната конфигурация на скуталбин D е доказана с NOE експерименти.

Облъчването на сигнала при  $\delta_{\text{H}}$  3.99 dd (H-11 $\alpha$ ) предизвиква положително NOE увеличение на сигнала при  $\delta_{\text{H}}$  0.90 d (Me-17) (7.2 %) и 1.0 s (Me-20) (8.0 %), което сочи  $\alpha$  ориентацията на тези групи. В допълнение, забележимо NOE увеличение се наблюдава между H-19 и Me-20, което разкрива  $\beta$  положението на метокси групата при C-19. Химичните отмествания на H-15 в  $^1\text{H}$  ЯМР спектъра, на C-15 в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектъра и NOE резултатите сочат  $\beta$  ориентацията и на другата метокси група (MeO-15). От анализа на спектралните данни, за скуталбин D е отнесена структура **59**.

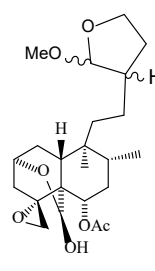
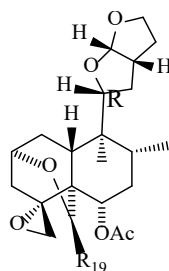
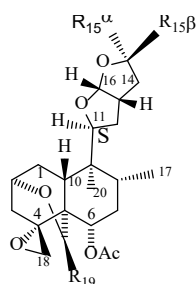
От растителен материал събран над село Балканец са доказани четири неоклероданови дитерпеноида, клеродин (**1**), скуполин Н (**10**) (изолиран от испанския вид *S. polyodon* през 1997 год. от de la Torre и съавтори), скутекиприн (**25**) (изолиран от *S. cypria elatior*, растяща в Италия, през 1993 год. от Bruno и съавтори) както и скутекипрол А (**42**). Изолираните съединения **1**,



**10** и **42** са идентифицирани чрез сравняване на температурите им на топене и ИЧ спектрите с литературните данни на автентични проби. Съединението е идентифицирано след анализирането на 1D и 2D ЯМР спектрите и е съставена молекулната му формула **25**. След определянето на структурата и стереохимията на **25** се установи, че поради непроведени 2D експерименти, в публикуваните от Bruno  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данни липсват отнасяния за сигналите на

протоните  $1\alpha$ ,  $1\beta$ ,  $3\beta$ ,  $7\alpha$ ,  $7\beta$ ,  $8\beta$ ,  $10\beta$ ,  $12\alpha$ ,  $12\beta$ ,  $14\alpha$  и  $14\beta$ ; не са отнесени еднозначно и сигналите за въглеродните атоми C-5/C-9 и C-7/C-12/C-14. В резултат на проведените от нас изследвания е обогатена литературата с тези данни за скутекиприн. Регистрирани са пълен набор от ЯМР спектри на Bruker Avance II+ спектрометър, работещ при 600.130 MHz за  $^1\text{H}$  ЯМР спектрите и при 150.903 MHz за  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите. След внимателен анализ на 2D експериментите еднозначно е отнесен сигнала на въглеродния атом C-14, който Bruno и съавтори не са разграничили от сигналите за C-7 и C-12. Отнесени са и  $^1\text{H}$  ЯМР сигналите за всички единадесет протона, за които липсват данни в литературата.

Едновременно с описаното изследване е разработена и горчивата фракция екстрахирана от *S. altissima* събрана в село Бачково. Изолирани са десет неоклероданови дитерпеноида, скуталтисини А-Г (**52**, **392** - **397**), скутеколумнин С (**23**), 11-епи-скутеколумнин С (**28**) и скуполин I (**59**) (фигура 1). Изолираният от Малаков и съавтори скуталтисин, е означен като скуталтисин А (**52**). Установи се, че скуталтисини В-Г са нови съединения, а дитерпените **23**, **28**, и **59** са доказани за първи път в този растителен вид.



	R <sub>19</sub>	R <sub>15β</sub>	R <sub>15α</sub>		R <sub>19</sub>
скутеколумнин С ( <b>23</b> ):	ОН	Н	Н	11-епи-скутеколумнин С ( <b>28</b> ):	ОН
скуталтисин В ( <b>392</b> ):	MeO	Н	Н	скуталтисин С ( <b>393</b> ):	MeO
скуталтисин А ( <b>52</b> ):	ОН	Н,ОН (15R + 15S)		скуталтисин G ( <b>397</b> ):	ОН
скуталсин А ( <b>55</b> ):	MePrO	Н,ОН (15R + 15S)			
скуталтисин D ( <b>394</b> ):	MeO	Н,ОН (15R + 15S)			
скуталтисин E ( <b>395</b> ):	ОН	MeO	Н		
скуталтисин F ( <b>396</b> ):	ОН	Н	MeO		
скуполин I ( <b>59</b> ):	MeO	MeO	Н		

Фигура 1: Изолирани неоклероданови дитерпеноиди от *S. Altissima*

Изолираната смолообразна горчива фракция е хроматографирана на стъклена колона със силика гел със смес от разтворителите петролев етер/EtOAc като елуент. Събраните елуати са обединени в 5 фракции на базата на ТСХ резултати: А, В, С, D и Е. Фракция В е рехроматографирана на КХ, получавайки подфракции В1 (**392** + **393**); суров продукт В2 и В3 (колби съдържащи 25 mg много сложна смес от по-полярни съединения, не изследвана допълнително). При прекристализация от ацетон на В2 е получена 20 mg сурова кристална маса и 59.5 mg остатъчна субстанция (В2r). Прекристализацията на кристалната маса осигури хомогенна на ТСХ субстанция, В2 (**394**, 16 mg). Остатъчният материал е разделен на препаративна ТСХ, със смес от разтворителите  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  в съотношение 98:2 като елуент, до получаване на 2 mg от **394** и две смеси от дитерпени В2r1 (29.3 mg) и В2r2 (11.2 mg).

В инфрачервения спектър на В1 присъстват ивици за оксиранов пръстен ( $3061\text{ cm}^{-1}$ ) и ацетатна група ( $1724$  и  $1262\text{ cm}^{-1}$ ). В  $^1\text{H}$  ЯМР спектър на В1 се наблюдават дублирани сигнали при  $\delta_{\text{H}}$  5.54 и 5.63 (d, H-16); 2.008 и 2.010 (s, AcO), които показват присъствието на смес от два основни клероданови дитерпена в съотношение 1:1, заедно с други минорни компоненти.  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите и спектралните характеристики на В1, и тези публикувани от Малаков и съавтори за “неделима, с различни разтворители и прекристализация, 3:7 смес от скутеколумнин С (**23**) и неговия С-11 епимер (11-епи-скутеколумнин С, **28**)”, изолирани от *S. columnae* var. *columnae*, показват голямо сродство. Допълнително, присъствието на метокси групи ( $\delta_{\text{H}}$  3.487 и 3.494) и химичното отместване за H-19 ( $\delta_{\text{H}}$  5.097 и 5.123, срещу 5.72 и 5.73 на сродните структури **23** и **28**, сходни с публикуваните стойности за 19-О-метил етер производни като скуполин Н (**10**) и скуполин I (**59**), и двете с  $\delta_{\text{H}}$  5.11), потвърждават отнасянето на В1 като смес от 19-О-метилови етери на скутеколумнин С (**392**) и 11-*epi*-скутеколумнин С (**393**).

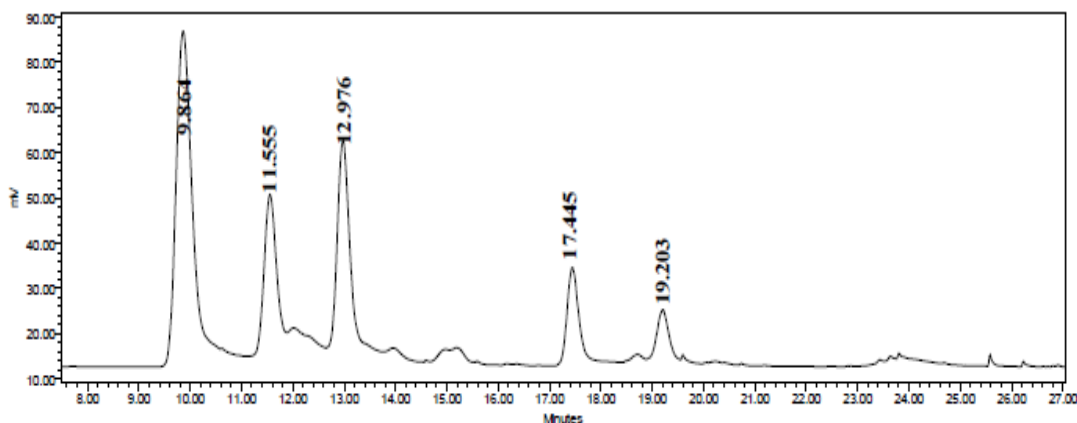
Един широк и един минорен последващ пик, с време на задържане 16.05 и 18.45 min, се наблюдават при аналитична високо ефективна течна хроматография на фракция В1. ЯМР анализите на фракциите, събрани в диапазона 14-17 min при препаративна HPLC на В1 разкриват частично разделяне на двете съединения, наименовани скуталтисин В (**392**) и скуталтисин С (**393**), (**392** се придвижва по-бързо от другия минорен представител), позволяващо отделни спектрални отнасяния, а последващият пик е идентифициран като скуполин I. Сигналите за протоните от декалиновото ядро, в  $^1\text{H}$  ЯМР спектрите на двата С-11 епимера **392** и **393**, са почти напълно еднакви. Забележимо отклонение от 0.15 ppm се наблюдава само за метиловите протони H<sub>3</sub>-17. В 11S епимера скуталтисин В метиловата група резонира при 0.90 (d, 3H,  $J = 6.2\text{ Hz}$ , H<sub>3</sub>-17), докато в 11R епимера скуталтисин С този сигнал се явява при  $\delta_{\text{H}}$  1.05 (d, 3H,  $J = 6.5\text{ Hz}$ , H<sub>3</sub>-17). В хексахидро фурофурановия пръстен най-голяма е разликата в химичното отместване на протона при хиралния епимерен център С-11. В дитерпена **392** сигналът за H-11 $\alpha$  резонира при  $\delta_{\text{H}}$  4.07 (dd, 1H,  $J = 11.1\text{ Hz}$ ,  $J = 5.7\text{ Hz}$ ) докато в епимерния клеродан **393** е отместен в силното поле с 0.42 ppm при  $\delta_{\text{H}}$  3.64 (dd, 1H,  $J = 11.8\text{ Hz}$ ,  $J = 4.9\text{ Hz}$ , H-11 $\alpha$ ). Друго забележимо отклонение в спектърта се регистрира за химичното отместване на метиленовите протони при въглерод С-15. В съединение **392** тези протони се наблюдават като мултиплет при  $\delta_{\text{H}}$  3.88. Метиленовите протони H<sub>2</sub>-15 в епимера **393** са добре разделени на t и ddd. Сигналът за единия протон е отместен с 0.09 ppm в слабото поле при  $\delta_{\text{H}}$  3.97 (t, 1H,  $J = 8.3\text{ Hz}$ , H-15<sub>B</sub>), а сигналът за другия протон е отместен с 0.08 ppm в силното поле при  $\delta_{\text{H}}$  3.80 (ddd, 1H,  $J = 13.4\text{ Hz}$ ,  $J = 8.5\text{ Hz}$ ,  $J = 4.8\text{ Hz}$ , H-15<sub>A</sub>).

В ИЧ спектърта на фракция В2 се наблюдават интензивни абсорбционни ивици при  $3380\text{ cm}^{-1}$  за хидроксилна група и при  $1730$  и  $1258\text{ cm}^{-1}$  показващи присъствие в молекулата на ацетатна функция. Отново MeO и дублиращи се сигнали се наблюдават в  $^1\text{H}$  ЯМР спектърта. При това, данните са много близки с тези докладвани за скуталтисин (**52**). На базата на  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектралните

данни е направено заключение за присъствието на С-15 епимерна смес на скуталтисин 19-О-метилов етер (наименована скуталтисин D, **394**), на основата на наблюдаваните различия за полуацеталния протон Н-19 както вече описаните по-горе сигнали ( $\delta_C$  5.101 и 5.112 срещу 5.72 and 5.73) и два MeO сигнала ( $\delta_C$  3.494, 3.496).

Аналитичният HPLC анализ (фиг. 2) на подфракция B2r1, показва пет основни пика. В резултат на препаративна HPLC на веществата от първия пик е получено частично разделяне на епимерната смес от 11-*enu*-скутеколумнин С (**23**) и скутеколумнин С (**28**). Структурите са потвърдени с ИЧ и  $^1\text{H}$  ЯМР спектри. От втория и третия пик са изолирани още две нови съединения, 15 $\beta$ -метоксискутеколумнин С (с тривиално наименование скуталтисин E, **395**) и 15 $\alpha$ -метоксискутеколумнин С (= скуталтисин F, **396**). И за двете вещества е определена молекулна формула  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_8$  на базата на псевдомолекулния позитивен йон в HR-ESIMS при  $m/z$  461.2135  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  за **395** и 461.2164 за **396**; изчислената молекулна маса за  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_8\text{Na}$  е 461.2151. Дитерпените са охарактеризирани на базата на  $^1\text{H}$  ЯМР спектрите и сравнението на отнесените спектрални характеристики с публикуваните стойности и установените

Analytical RP-HPLC with ELS detection of B2r1



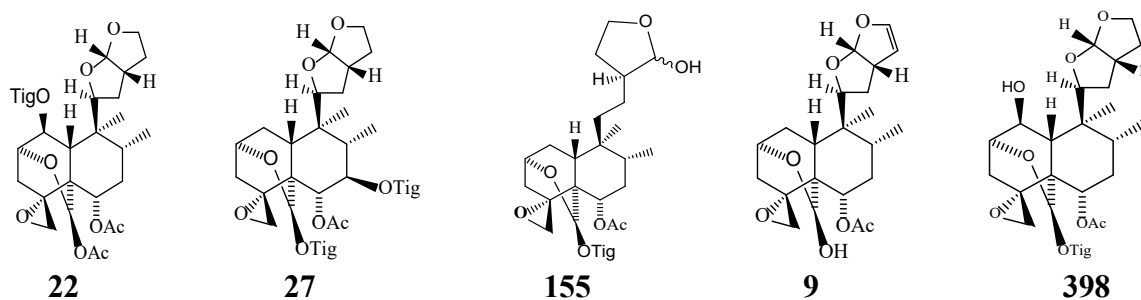
Фиг. 2. Аналитична RP-HPLC хроматограма на B2r1 с ELS детектор

правила за отнасяне на коректната конфигурация при С-15 на 15-метоксихексахидро фурофуран *нео*-клероданови дитерпеноиди. Въпреки, че MeOH е използван в TLC/HPLC процедурите при хроматографското разделяне на горчивата фракция, артефакт от тетраhydro фуро-фурановия прекурсор скуталбин А, който не е установен в сместа, е изключена тъй като не е забелязана промяна в проявените петна при хроматографиране на веществата на ТСХ.

В  $^1\text{H}$  ЯМР спектъра на четвъртия пик се установи присъствие на сигнали от две OMe и една OAc групи ( $\delta_H$  3.34, 3.49 и 2.06), един дублет отнесен за Н-16 ( $\delta_H$  4.64,  $J = 1.8$  Hz) и специфичното мултиплетно разцепване за Н<sub>2</sub>-15 протоните (Н - 15А:  $\delta_H$  3.86, td; Н-15В:  $\delta_H$  3.93, td).  $^1\text{H}$  ЯМР данните съответствуват на структура **397** (наименована скуталтисин G), произхождаща от скуталтисин А декалиновото ядро и отворена странична верига като докладваната в литературата за скутерепеносидите А<sub>1</sub>-А<sub>4</sub> (**158-161**). От *Scutellaria altissima* са изолирани и спектрално охарактеризирани 17 съединения.

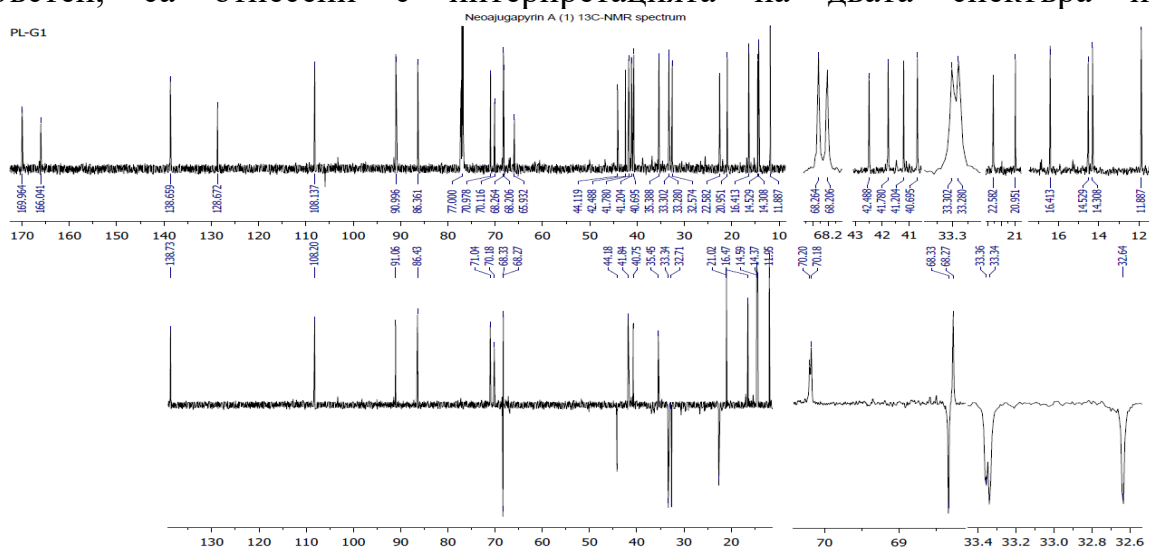
От тях 14 са *нео*-клероданови дитерпеноиди: клеродин (1), скуполин Н (10), скутекиприн (25), скутекипрол А (42), скуполин I (59), 11-*епи*-скутеколумнин С (28), skutalтисин ≡ skutalтисин А (= skutalбин С, 52) и скутеколумнин С (23) са доказани за първи път в този вид, а останалите шест клеродана, skutalтисин В (392), skutalтисин С (393), skutalтисин D (394), skutalтисин Е (395) skutalтисин F (396) и skutalтисин G (397), са нови за науката природни органични съединения. Всички дитерпени съдържат 4 $\alpha$ ,18 епоксиден пръстен спиросвързан с декалиновото ядро. С изключение на клеродин и скутекипрол А в молекулите на съединенията е склучен 2 $\alpha$ ,19 полуацетален или ацетален пръстен. При десет от дитерпеноидите е образуван хексахидрофурофуранов пръстен в С-11–С-16 подструктурата, в два дитерпеноида пръстенът е тетраhydro фурофуранов, поради наличието на двойна връзка между С-14 и С-15 и в един дитерпеноид е склучен лактолен пръстен обхващащ атомите от С-13 до С-16. Останалите три съединения, глобуларин (391),  $\beta$ -ситостерол (390а) и стигмастерол (390в) също се идентифицират за първи път в *S. altissima*.

Изследванията на *Scutellaria galericulata* започват през 2012 г. със събиране на растителен материал от растението от хабитат край град Ловеч. Горчивата смола, получена по описания начин, е разделена на пет еднородни фракции в резултат на хроматографиране на колона запълнена със силикагел при елуиране със смес от хексан/ЕtОАС с градиент 3:2 ÷ 1:1. След прекристализиране из ацетон са отделени пет кристални *нео*-клероданови дитерпеноида, 18 mg от 14,15-дихидрождодрелин Т (22), 10 mg от скутегалин А (27), 15 mg от скутегалин D (155), 16 mg от skutalбин А (9) и 15 mg от аюгапирин А (398  $\longrightarrow$  неоаюгапирин А, 399). Съединенията са идентифицирани чрез сравняване на точките на топене и на ИЧ спектрите им с публикуваните в литературата данни за тези вещества. Аюгапирин А (398) е доказан от Бонева и съавтори в българския вид *Ajuga pyramidalis*.



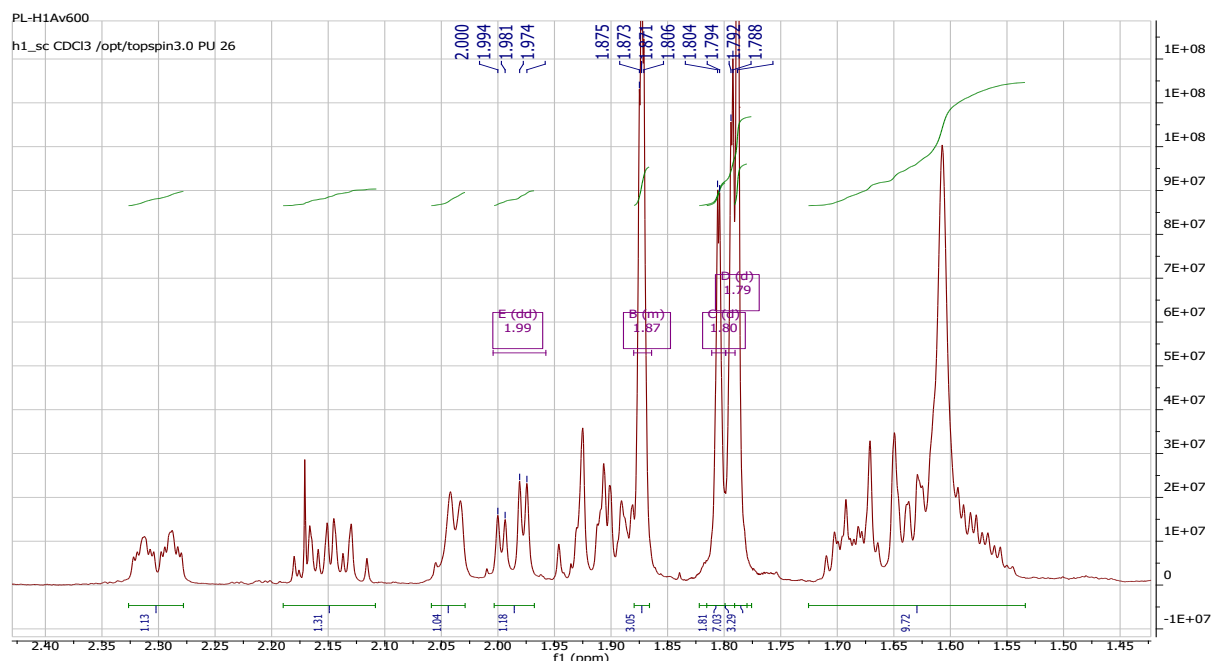
В настоящия труд, дитерпенът 398 за първи път е изолиран във вид на род *Scutellaria*, което е едно доказателство за хемотаксономичната близост на двата рода. <sup>1</sup>H ЯМР спектърът на 398, регистриран при 250 MHz, е напълно идентичен (по химичните отмествания и формата на сигналите) със спектъра на аюгапирин А заснет от Бонева при същите условия и на същия апарат. Допълнително измереният при 600 MHz спектър дава възможност за корегирание на отнасянията на някои сигнали и стойностите на някои *J* константи. В литературата липсват <sup>13</sup>C ЯМР данни за аюгапирин А. За улеснение на идентификацията на 398 при следващи изолирания е регистриран <sup>13</sup>C ЯМР

спектр. В него се съдържат 27 въглеродни сигнала и DEPT 135 спектъра разкрива 21 резонанса, 6 от тях за метиленови CH<sub>2</sub> групи, 5 за метилови CH<sub>3</sub> групи, 10 за метинови CH групи и 6 сигнала за непротонирани C-атоми. Една част от сигналите, от тиглиновата киселина и перхидро-фурофурановия пръстен, са отнесени с интерпретацията на двата спектъра и тези



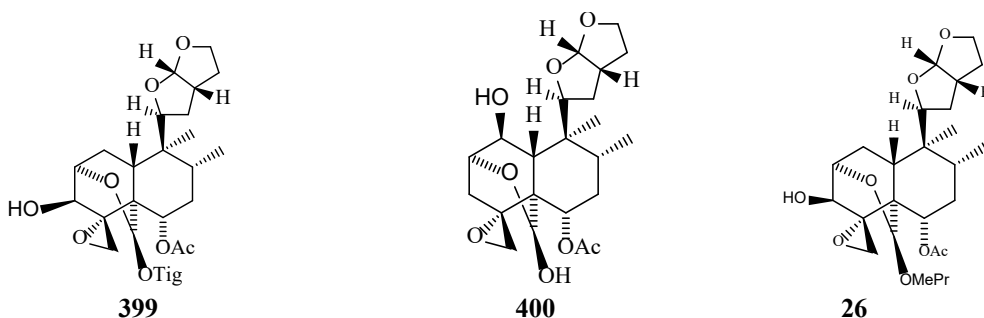
Фиг. 3: <sup>13</sup>C ЯМР и DEPT 135 спектъра на аюгапирин А (398  $\longrightarrow$  399)

отнасяния са в съгласие с данните публикувани от Bruno за сродни съединения. В <sup>1</sup>H ЯМР спектъра с висока разделителна способност на 398, сигналът за H-10 при  $\delta_H$  1.99 се явява като dd (виж фиг. 4) докато Бонева отнася сигнала за H-10 като d при  $\delta_H$  1.97. Мултиплетното разцепване на сигнала указва наличието на два съседни водородни атоми при C-1. Възниква въпроса за точното определяне на мястото на хидроксилната групата.



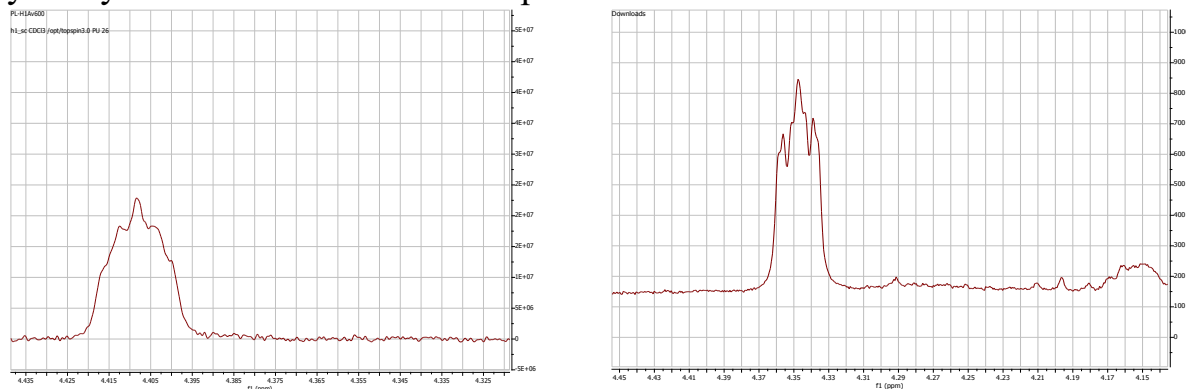
Фиг. 4. <sup>1</sup>H ЯМР спектъра на аюгапирин А (398  $\longrightarrow$  399) с разширен участък за протон H-10

За пълното отнасяне на  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектъра и изясняване на точната структура на аюгапирин А са проведени 2D ЯМР експерименти. За целта по-голямо количество от дитерпена аюгапирин А е изолирано от 2.8 kg сух материал от надземни части от *S. galericulata*, събрани край град Плевен. От него по описаният начин са получени скутеколумнин С (**23**), 53 mg от аюгапирин А (= неоаюгапирин А **399**) и две нови съединения, скутегалерин А (реалната структура **398**) и скутегалерин В (**400**). Основния дитерпеноид, неоаюгапирин А



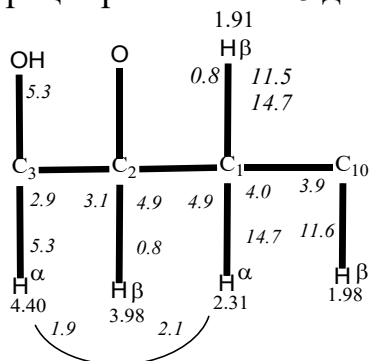
(**399**), на който отговаря структурата  $3\beta$ -хидрокси скутекиприн, е изолиран от *Ajuga pyramidalis* от Бонева и наименован аюгапирин А, но докладван като  $1\beta$ -хидрокси скутекиприн (**398**). Установено е, че предишната предложена структура не е коректна и името неоаюгапирин А е предложено за означаване на новата ревизирана структура **399**, която напълно съответства на проведените ЯМР изследвания. Тривиалното наименование скутегалерин А е дадена на реалния сега изолиран  $1\beta$ -хидрокси скутекиприн. Съединение **399** е изолирано от най-полярната фракция. ИЧ спектърът разкрива присъствието на хидроксилна и ацетатна групи и в допълнение, ивици за (E) 2-метил-2-бутеноил естер, но отсъствието на такива за лактон или фуран.

От данните на елементния анализ и преброените 27 въглеродни атома във  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектъра за съединението е съставена молекулна формула  $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_9$ . Бонева е публикувала грешна формула  $\text{C}_{17}\text{H}_{38}\text{O}_4$ , вероятно в следствие на сору/paste грешка.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и DEPT  $135^\circ$  ЯМР данните за хексахидро фурофуранова функция, тиглинов и ацетатен естер, както и за атомите от C-6 до C-10 в пръстен В на **399**, са много близки с тези за родствената система скутекиприн (**25**). Мултиплета при  $\delta_{\text{H}}$  4.40 се опростява след обмен с  $\text{D}_2\text{O}$  (фигура 5), което обуславя размяната на отнасянията на сигналите за протоните  $3\alpha/2\beta$  публикувани от Бонева за аюгапирин А.



Фигура 5: Свиване на сигнала при  $\delta_{\text{H}}$  4.40, в  $^1\text{H}$  ЯМР спектъра на **399** след обмен с  $\text{D}_2\text{O}$

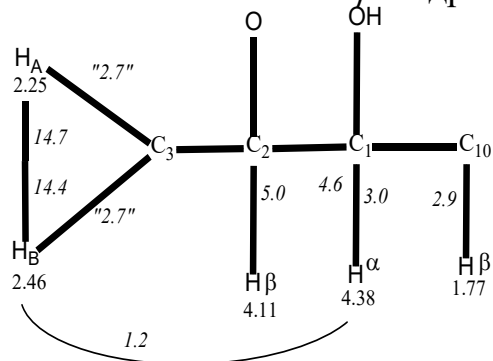
Подробен анализ на HSQC и HMBC спектрите за C-1 до C-5 установи недвусмислено моста C-2-O-C-19:  $\delta_H$  3.98 за H-2 [HMBC корелации с C-19, C-10 и реципрочно от H-19 до C-2], докато H-3 $\alpha$  ( $\delta_H$  4.40/ $\delta_C$  70.1) показва само реципрочната H-18 до C-3 корелация.



Фиг. 6: Спинова система в пръстен А на **399** (H-10-[H-1 $\alpha$ -H-1 $\beta$ ]-H-2 $\beta$ -H-3 $\alpha$ ; *J* в курсив)

позиция, докато 1 $\beta$ /3 $\beta$  NOE взаимодействие може да се очаква Освен това, широкият дублет при  $\delta_H$  2.55, отнесен за H-3 $\alpha$  в скутекиприн (**25**) не се наблюдава в спектъра на **399**. Тези отнасяния заедно с формата на сигнала за H-10 (dd) определят по-вероятно присъствие на кислороден заместител при C-3 отколкото при C-1. Допускане, което се доказва с внимателен анализ на двумерните ЯМР спектри.

Изненадващо,  $^1H$  ЯМР спектралните данни за второто изолирано съединение сочат към истинската 1 $\beta$ -хидрокси скутекипринова структура (**398**).



Фиг. 7: Спинова система в пръстен А на **398** (H-10—H-1 $\alpha$ —H-2 $\beta$ —[H-3 $\alpha$ -H-3 $\beta$ ]; *J* в курсив)

4.11 (H-2 $\beta$ ) със сигналите при  $\delta_H$  2.46 и 2.25 (H<sub>2</sub>-3) и на сигнала при  $\delta_H$  4.09 (H-11) със сигналите 1.65 и 1.97 (H<sub>2</sub>-12), са разделени по двойки в HSQC спектъра чрез корелация с  $\delta_C$  30.9 (първите две) и  $\delta_C$  33.6 (последните две). Следователно, те могат да бъдат определени като C-3 и C-12. Допълнително се наблюдава корелация на деекранирания в слабо поле сигнал за H-1 $\alpha$  ( $\delta_H$  4.38) със сигнала за H-2 $\beta$  ( $\delta_H$  4.11).

Допълнителни доказателства в подкрепа на стереохимията са получени от NOESY резултатите: H-C (6) корелиране с H<sub>B</sub>-C (18), H-C (8) и H-C (10) определя кофициалното  $\beta$ -положение на тези атоми, а взаимодействието на H-C (1) с H-C (20) (ориентирани от  $\alpha$ -страната на скелета) разкрива  $\beta$ -ориентацията



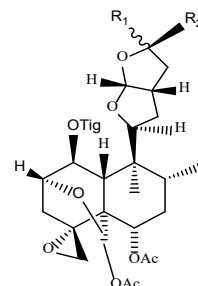
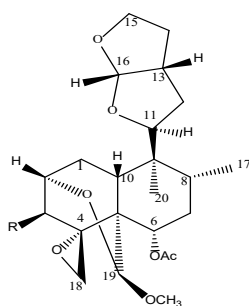
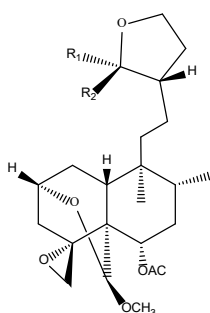
на заместителя при С-1.

Химичните отмествания и константите на свързване са коригирани на свой ред за тези на съединение **398**. Сега изолираният  $1\beta$ -хидрокси скутекиприн е наречен скутегалерин А (**398**).

$^1\text{H}$  ЯМР спектърът на третото (минорно) изолирано съединение показва повечето от данните за структурните характеристики на **398**. Забележимо различие е, че сигналите на тиглоиловия заместител не са налични, докато се наблюдава промяна за хидроксилна група като заместител при С-19 [НС (19):  $\delta_{\text{H}}$  5.61 срещу  $\delta_{\text{H}}$  6.68 ppm]. Съединението е охарактеризирано като  $1\beta$ -хидроксикутеколумнин С и е наименовано скутегалерин В (**400**).

В ИЧ спектъра на четвъртият изолиран *нео*-клероданов дитерпеноид се наблюдават ивици за хидроксилна ( $3444\text{ cm}^{-1}$ ) и ацетатна ( $1729, 1250$  и  $1093\text{ cm}^{-1}$ ) групи. Установено е пълно съвпадение на 1D и 2D ЯМР спектралните данни на веществото с докладваните в литературата стойности за скутеколумнин С (**23**). Клероданът **23** е докладван за първи път в този вид.

Фитохимичното изследване на *S. galericulata* L. продължава с търсенето на минорни *нео*-клероданови дитерпени. Горчивата фракция, получена при разработване на 5.2 kg изсушени и фино разпрашени надземни части от растението по описания метод, е разделена на пет фракции, **I** (150 mg), **II** (450 mg), **III** (140 mg), **IV** (83 mg) и **V** (250 mg). Четири неизолирани *нео*-клероданови дитерпеноида, при предишните две проучвания на този вид, се доказаха от фракции **II** и **IV**. След повторно хроматографиране на **II**, при елуиране с  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , са получени две субфракции (**IIa** и **IIb**), всяка от които показва TLC-хомогенно петно. От субфракция **IIa** са изолирани 36 mg от скуталтисин В (**392**). От **IIb** са получени 15.3 mg от 1:2 неделима (чрез TLC с използване на различни разтворители и смеси от разтворители или чрез кристализация) смес от С-16 епимери, скутегалерин С (**401**) и скутегалерин D (**402**). С препаративна ТСХ на фракция IV (EtOAc като елуент,  $\times 2$ ) се получи 8 mg от трети нов дитерпен, скутегалерин Е (**403**). Прекристализация от ацетон осигури 6 mg чист продукт **403**.



	$R_1$	$R_2$		$R$		$R_1$	$R_2$
скутегалерин С ( <b>401</b> ):	OMe	H	скуталтисин В ( <b>392</b> ):	H	скутегалерин F ( <b>404</b> ):	H	OH
скутегалерин D ( <b>402</b> ):	H	OMe	скутегалерин E ( <b>403</b> ):	OH	скутегалерин G ( <b>405</b> ):	OH	H

ИЧ спектъра на скуталтисин В (**392**) сочи наличие на абсорбционни ивици за ацетатна група ( $1732$  и  $1250\text{ cm}^{-1}$ ) и липса на абсорбция за хидроксилна функция и двойна връзка. При сравняване на  $^1\text{H}$  ЯМР спектъра на скуталтисин В със

протонните спектри на изолирани дитерпени от *Scutellaria altissima* (Bozov and Coll, 2015) се установи, че **392** е известният 11S изомер, получен по рано като неразделима смес с 11R епимера, скуталтисин С. В предишното изследване някои от  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР сигналите не са отнесени еднозначно за всеки епимер, поради еднаквото количествено съотношение на двата дитерпеноида в сместа. Сега, скуталтисин В е изолиран като чисто вещество и еднозначно са отнесени всички сигнали в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите с помощта на DEPT, HSQC, COSY и НМВС експерименти. С актуализираните  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данни е доказано, че в **392**, сигналите при  $\delta_{\text{C}}$  33.45 и 33.30 се дължат съответно на С-7 и С-12, и че са погрешни дадените преди стойности от  $\delta_{\text{C}}$  33.38/33.55 на С-7 и от  $\delta_{\text{C}}$  34.2/32.4 за С-12. Също така е коригирано химическото отместване за С-9 при  $\delta_{\text{C}}$  41.3 (42.47/41.67, публикувани по-рано).

За втората изолирана ТСХ-хомогенна субстанция е съставена молекулна формула  $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_7$ , която съответства на негативния молекулен йон  $[\text{M}-1]^-$  в HR-ESIMS при  $m/z$  437.2508 (изчислено за  $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{O}_7$ , 437.2529). Пиковите при  $m/z$  407, 378 и 347 се дължат на фрагментите  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{O}]^-$ ,  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{COOH}]^-$  и  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_3\text{O}]^-$ , които отговарят на загуба на метокси група, оцетна киселина и съответно на метокси група и оцетна киселина. В ИЧ спектъра се наблюдават ивици за ацетатна група ( $1732$  и  $1250\text{ cm}^{-1}$ ) и липса на абсорбция за хидроксилна група.

$^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите разкриват наличието на два структурно много близки *нео*-клероданови дитерпена в съотношение приблизително 1:2 (в следващата дискусия площта на протонните сигнали е дадена в скоби, така че да сумира 1.0 за двете съединения), наречени скутегалерин С (**401**) и скутегалерин D (**402**). Лесно се различават характеристичните сигнали за два  $4\alpha,18$ -епокси-*нео*-клероданови скелета (табл. 6) при  $\delta_{\text{H}}$  0.79 s/ 0.80 s (Me-20), 0.787 d/0.791 d (Me-17), 2.33 d (1H, C-18A) и 2.92 d (0.33H, C-18  $\beta$ )/2.90 d (0.67 H, C-18B). В спектъра се наблюдават сигнали за ацетатна група при  $\delta_{\text{H}}$  1.97, два синглета за С-15 метокси групите при  $\delta_{\text{H}}$  3.451/3.450 (3.1 H), 3.33 (1.08H) и 3.35 (2.07 H). Сигналите при  $\delta_{\text{H}}$  3.45 бяха отнесени за метокси групите при С-19 на базата на НМВС корелациите с  $\delta_{\text{C}}$  100.3 (С-19). Двата С-16 метоксила показват по-голяма разлика в стойността на химическото им отместване тъй като са по-близо до епимерния център.

Горепосочената дискусия заедно с някои други дублирани сигнали [ $\delta_{\text{H}}$  4.73/4.59 (d, H-16 $\beta$ ); 5.05/5.04 (s, H-19 $\alpha$ )], показват идентично декалиново ядро за съединенията от сместа, **401** и **402** със скупolini H и I [H-2 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  4.12dt/4.11 dt срещу 4.104 m/4.08 m), H-3 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.50 dt/2.51 dt, срещу 2.53dt/2.54 dt), H-6  $\beta$  (4.58 dd/4.56 dd срещу 4.62 dd/4.62 dd), Me-17 ( $\delta_{\text{H}}$  0.787d /0.791 d срещу 0.89 d/0.90 d), H<sub>2</sub>-18 ( $\delta_{\text{H}}$  2.33 d и 2.92 d /2.90 d срещу 2.37 d/2.35 d и 2.97 d/2.95 d), H-19 $\alpha$  (5.05 s/5.04 s срещу 5.11 s/5.11 s)]. Сигналите за H-19 $\alpha$  при 5.05/5.04 имат припокриващи се  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМВС кръстосани пикове с  $\delta_{\text{C}}$  68.4 / 68.3 (С-6), 66.6 /66.5 (С-2), 60.7 (С-4), 55.2 (С-19-ОСН<sub>3</sub>), 49.8/49.7 (С-18, слаба корелация,  $^4\text{J}$ ), 36.81 / 36.77 (С-3, много слаба корелация,  $^4\text{J}$ ).

Протон H-2 $\beta$  при  $\delta_{\text{H}}$  4.12/4.11 показва НМВС кръстосани пикове с  $\delta_{\text{C}}$

100.3/100.2 (C-19), 60.7 (C-4) и 41.0/41.1 (C-10) и COSY корелации с  $\delta_{\text{H}}$  2.50/2.51 (H-3 $\alpha$ ) и 1.61 (H-3 $\beta$ ). Шестчленната странична верига (атомите C-11–C-16) съдържа лактолен пръстен склучен между C-15–C-16, както е докладвано от Kizu и съавтори за скутерепиносидите A<sub>1</sub>–A<sub>4</sub>. Слаба HMBC корелация се наблюдава в съединение **401** на H-13 ( $\delta_{\text{H}}$  1.85/.92) с въглеродните атоми C-16 ( $\delta_{\text{C}}$  104.6), C-14 (29.4), C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  21.8) и C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  36.2) и в дитерпен **402** с C-16 ( $\delta_{\text{C}}$  109.8), C-15 ( $\delta_{\text{C}}$  66.5), C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  30.6), C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  25.9) и C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  35.6). Химични отмествания за метиленовите протони 12a/12b в **401** се появяват при  $\delta_{\text{H}}$  1.10/1.41, докато в **402** те са изместени в силното поле, при 0.98/1.35. Сигналът на изохронните протони H<sub>2</sub>-11, се явява при  $\delta_{\text{H}}$  1.21 и в двете съединения. Тези отнасяния са подкрепени от HMBC корелациите на H<sub>2</sub>-11 с C-9 ( $\delta_{\text{H}}$  38.84/38.77) и <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY кръстосани пикове с H<sub>2</sub>-12 при  $\delta_{\text{H}}$  0.98/1.35 за **402**.

В HMBC спектъра се наблюдават корелации от H-12a ( $\delta_{\text{H}}$  0.98) до C-16 ( $\delta_{\text{C}}$  104.6/ 109.8), C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  44.5/45.9), C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  36.2/35.6) и C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  29.4/30.6). <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY спектърът показва корелация на H-12a ( $\delta_{\text{H}}$  1.10/0.98) с H-13 ( $\delta_{\text{H}}$  1.85/1.92) и H<sub>2</sub>-11 ( $\delta_{\text{H}}$  1.21). Забележително голямото отклонение от 4.12 ppm се наблюдава в стойността на сигнала за C-12 в двата епимера, но такова отклонение е в съответствие със стойностите за скутерепиносиди A<sub>1</sub> – A<sub>4</sub>. H-13 $\beta$  в двата епимера показва <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY корелация с H-14 $\alpha$  и H-16 $\beta$ . Дитерпеноидите **401** и **402** се различават един от друг по конфигурацията на асиметричния въглероден атом C-16. В 16R епимера (**401**) този въглерод се явява при  $\delta_{\text{C}}$  104.6, а в 16S епимера (**402**) при  $\delta_{\text{C}}$  109.8, даващо отклонение на химичното отместване от 5.2 ppm. Това отклонение е много подобно на показаното при скутерепиносиди A<sub>3</sub>/A<sub>1</sub> ( $\delta_{\text{C-16}}$  104.9/110.2) и скутерепиносиди A<sub>4</sub> / A<sub>2</sub> ( $\delta_{\text{C-16}}$  105.0 / 110.3). H-16 $\beta$  в клеродан **401** резонира при  $\delta_{\text{H}}$  4.73 (<sup>3</sup>J<sub>H-16 $\beta$ , H-13 $\beta$</sub>  = 4.5 Hz), а сигналът за H-16 $\beta$  в **402** е изместен в силното поле при 4.59 (<sup>3</sup>J<sub>H-16 $\beta$ , H-13 $\beta$</sub>  = 1.7 Hz). В съответствие с уравнението на Karplus по-високата стойност на <sup>3</sup>J - константата на свързване в **401** се обуславя от диедричния торсионен ъгъл между H-16 $\beta$ – C-16–C-13–H-13 $\beta$  от около 0°. По-малката стойност на <sup>3</sup>J-константата в **402** (1.7 Hz) е в съгласие с диедричния торсионен ъгъл между H-16 $\alpha$ –C-16–C-13–H-13 $\beta$  близък до 120°. Константите, измерени за скутерепиносиди A<sub>1</sub> – A<sub>4</sub> са 4.0 Hz за 16R и средно 1.5 Hz за 16S изомера.

<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектрите показват характерни сигнали за *нео*-клероднова структура (Me-17 при  $\delta_{\text{H}}$  0.88 d,  $J$  = 6.0 Hz; Me-20 при  $\delta_{\text{H}}$  1.11 s), притежаваща 4a,18-оксиранов пръстен (H-18A при  $\delta_{\text{H}}$  2.82 d и H-18B при  $\delta_{\text{H}}$  3.01 d със свързваща константа  $J_{\text{gem}}$  = 4.6 Hz), 2 $\alpha$ ,19-ацетална част ( $\delta_{\text{H-19a}}$  5.05 s;  $\delta_{\text{H-2 $\beta$ }}$  3.89 br dd;  $\delta_{\text{C-19}}$  99.8) и C-11–C-16 хексахидро фурофуранова странична верига [ $\delta_{\text{H-11}}$  4.08 dd,  $J$  = 11.0, 5.6  $\delta_{\text{H-13}}$  2.83;  $\delta_{\text{H2-15}}$  са. 3.857/3.866 ddd;  $\delta_{\text{H-16}}$  5.62 d,  $J$  = 5.1;  $\delta_{\text{C-16}}$  108.1]. В допълнение, данните от ЯМР спектрите (табл. 6) разкриват присъствието на ацетатна ( $\delta_{\text{H}}$  2.0 s, 3H;  $\delta_{\text{C}}$  170.4 и 21.2), метокси  $\delta_{\text{H}}$  3.47 s, 3H;  $\delta_{\text{C}}$  55.2) и хидроксилна групи (при C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  70.1). Химичните отмествания на H-19 $\alpha$  при  $\delta_{\text{H}}$  5.05 s и C-19 при  $\delta_{\text{C}}$  99.8 са в съгласие със структурите **401** и **402** ( $\delta_{\text{H}}$  5.04 и 5.05;  $\delta_{\text{C}}$  100.3 и 100.2). Тези сигнали са подобни на докладваните стойности за 19-О-

метилови етерни производни като публикуваните от de la Torre и съавтори за скупolini H и I, и двете 5.11/100.3. Поставянето на хидроксилната група в положение  $3\beta$  е в съгласие с химическите отмествания на H-18A ( $\delta_H$  2.82) както при неоаюгапирин A (399), скуполин G (26) и в скупolini J (15) и K (58), всички при  $\delta_H$  2.88. Протонът H-18A резонира при  $\delta_H$  2.44 в скутекиприн (25), който е лишен от заместители при C-1 и C-3. При дитерпени със заместител при C-1, сигналът за H-18A се явява в област близо до тази на скутекиприн, като  $\delta_H$  2.46 в 14,15-дихидроджодрелин T (22) и  $\delta_H$  2.51 в скутегалерин A (398). Сигналът за  $3\alpha$ -протона, който се явява в скутекиприн при  $\delta_H$  2.55 dt, е опростен и изместен в слабото поле в 403 до  $\delta_H$  4.39 br s. В  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектъра сигналът за въглерод C-4 е отместен в слабото поле с 5,5 ppm, в сравнение с този в скутекиприн, докато сигналът за C-18 (който е в  $\gamma$  позиция спрямо хидроксилната група) е отместен в силното поле с 6.3 ppm.

Производни със заместители при C-1, като 14,15-дихидроджодрелин T (22), показват значително отместване в слабото поле (в сравнение със скутекиприн) за въглерод C-10 с около 7.5 ppm. Накрая,  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите на скутегалерин E са почти идентични с тези на неоаюгапирин A. Забележими разлики в спектрите на двете съединения са наличието на сигнали за метокси вместо тези на тиглатна група, както и химическото отместване за метокси група при  $\delta_H$  3.47 и  $\delta_C$  55.3, синглета за H-19 при  $\delta_H$  5.05 срещу 6.76 s ( $\Delta\delta$ -1.71) и отместеният в слабото поле сигнал на ацеталния въглерод C-19 при  $\delta_C$  99.8 срещу 91.0 ( $\Delta\delta$  + 8.8).

След хроматографиране с препаративна ТСХ на матерните луги от прекриста-лизацията на скутегалерин E (403) е получена субстанция даваща хомогенно петно на ТСХ. В регистрирания ИЧ-спектър се наблюдават ивици на поглъщане от карбонилна ( $1734$ ,  $1712$  и  $1269\text{ cm}^{-1}$ ) и хидроксилна група ( $3422\text{ cm}^{-1}$ ). Няма абсорбция за двойна връзка. От позитивния псевдо молекулен йон пик  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  в HR-ESIMS спектъра на изолираната субстанция при  $m/z$  587.2460 е съставена молекулна формула  $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_{11}$ . Изчислената за  $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_{11}\text{Na}$  молекулна маса е 587.2438.

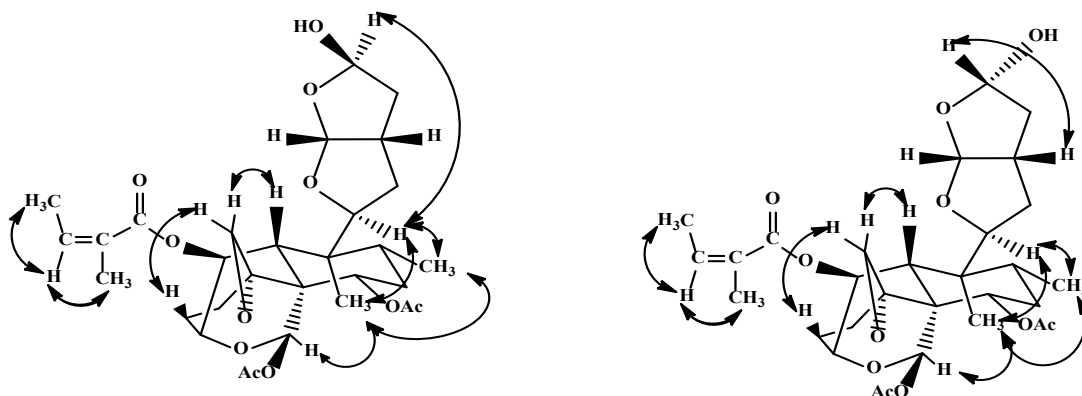
$^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данните разкриват присъствието в молекулата на декали-ново ядро, носещо две ацетатни ( $\delta_C$  170.0 /  $\delta_H$  2.14 и  $\delta_C$  169.8 /  $\delta_H$  1.96) и тиглатна групи ( $\delta_C$  166.5 /  $\delta_H$  6.81 qq). Лесно се забелязват и характерните сигнали за оксиранов пръстен между C-4 и C-18 [ $\text{H}_2$ -18 ( $\delta_H$  2.45 d и 3.05 d)] и  $2\alpha,19$  хемиацетал [ $\text{H}$ -2 $\beta$  ( $\delta$  4.41 m), H-19 $\alpha$  (56.69)]. Въпреки, че субстанцията дава хомогенно петно на ТСХ, при елуиране с различ-ни разтворители,  $^1\text{H}$  ЯМР спектърът показва присъствието на някои добре разграничени дублирани сигнали [ $\delta_H$  5.50 и 5.52 (d, H-16); 5.56 и 5.46 (m, H-15); 3.06 и 2.86 (m, H-13); 3.98 и 4.55 (dd, H-13)], указващи присъствието на приблизително 2:3 смес от два 15-епимерни нео-клероданови производни, наречени скутегалирин F (404) и G (405).

Транс свързването между пръстените A/B в декалиновото ядро на молекулата се установява чрез сигналите в  $^1\text{H}$  ЯМР спектъра за метиловите протони  $\text{CH}_3$ -17

( $\delta_{\text{H}}$  0.89 d и  $\delta_{\text{H}}$  0.92 d) и  $\text{CH}_3$ -20 ( $\delta_{\text{H}}$  1.25 s), дублета при  $\delta_{\text{H}}$  2.04 (H-10) и синглета при  $\delta_{\text{H}}$  6.69 (H-19). Тези заключения са потвърдени от наблюдаваните NOESY корелации H-18B/H-10, H-18A/H-2eq, H-19 $\alpha$ /CH<sub>3</sub>-20, CH<sub>3</sub>-17/CH<sub>3</sub>-20, CH<sub>3</sub>-17/H-11 $\alpha$  и CH<sub>3</sub>-20/H-11 $\alpha$ .

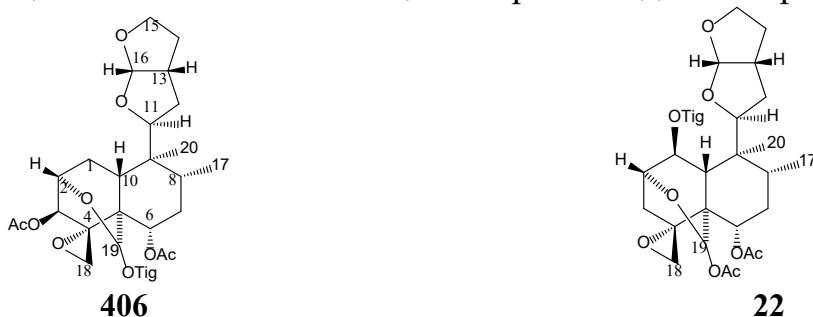
В допълнение, в <sup>1</sup>H ЯМР спектъра се наблюдават сигнали за хексахидро фуоро[2,3-b]фуранов пръстен, в шестчленната странична верига C-11–C-16 [характеристичен мултиплет за H-13 $\beta$  протона, резониращ в областта на  $\delta_{\text{H}}$  3.10–2.80 и дублет при  $\delta_{\text{H}}$  5.50 (H-16)], имащ заместител хидроксилна група при C-15 ( $\delta_{\text{H}}$  3.49 br s). Всички отнасяния на сигналите в <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектрите са в съответствие с 2D експериментите - HSQC, HMBC, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COZY. <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектралните характеристики за атомите в декалиновата подструктура са почти идентични с тези, докладвани за 14,15-дихидроджодрелин Т (**22**). Максималното отклонение за <sup>13</sup>C-сигналите е 0.3 ppm и за <sup>1</sup>H- сигналите е 0.03 ppm. Rodríguez и съавтори са отнесли сигнала при  $\delta_{\text{C}}$  66.7 за въглерод C-1 и този при 69.6 за C-2, в съединение **22**, със забележката, че те могат да бъдат разменени. Корелациите, в HSQC спектъра на скутегалирини F и G, на сигналите при  $\delta_{\text{H}}$  5.52 с  $\delta_{\text{C}}$  69.8 и на 4.40 с 66.9 са основание еднозначно да се приеме сигнала при  $\delta_{\text{C}}$  69.8 за въглерод C-1 и този при  $\delta_{\text{C}}$  66.9 за C-2. От друга страна спектралните данни за хексахидро фуорофуновия пръстен са много сходни с тези, докладвани за епимерните дитерпени 15R- и 15S-scutecuprol A. Максималното отклонение от 1.4 ppm за <sup>13</sup>C-сигналите в тези подструктури е за C-11, а за <sup>1</sup>H –сигналите то е 0.03 ppm за H-16. Основните разлики в спектралните данни на епимерите **404** и **405** са в стойностите на сигналите от хексахидро фуорофуновата част. Във <sup>13</sup>C ЯМР спектъра най-голямата разлика е за въглеродния атом C-16. Неговият сигнал в **404** се явява при  $\delta_{\text{C}}$  108.5, докато в **405** тази стойност е 110.3. В <sup>1</sup>H ЯМР спектъра най-голямата разлика е за H-11 $\alpha$  химичното отместване от 3.98 ppm в **404** до 4.55 ppm в **405**. Тези стойности са в съгласие с данните за епимерните 15R- и 15S-скутекипрол А. Установената конфигурация на епимерния център C-15 в съединенията **404** и **405** се потвърждава от корелациите в NOESY спектъра между H<sub>15 $\alpha$</sub>  и H<sub>11 $\alpha$</sub>  в епимер **404** и между H<sub>15 $\alpha$</sub>  и H<sub>13 $\beta$</sub>  в **405**.

От *Scutellaria galericulata* са изолирани и спектрално охарактеризирани 14 нео-клероданови дитерпеноида. Три съединения, 14,15-дихидроджодрелин Т (**22**), скутегалин А (**27**) и скутегалин D (**155**) са познати за това растение. Скуталбин А (**9**), скутеколумнин С (**23**) и скуталтисин В (**392**) се получават за първи път от този растителен вид. Аюгапирин А (**398**  $\longrightarrow$  неоаюгапирин А, **399**), намерен за първи път в *Ajuga pyramidalis*, е нова структура както за *Scutellaria galericulata* така и за целия род *Scutellaria*. Останалите 7 нео-клероданови дитерпеноида, скутегалерин А (реалната структура **398**), скутегалерин В (**400**), скутегалерин С (**401**), скутегалерин D (**402**), скутегалерин Е (**403**), скутегалерин F (**404**) и скутегалерин G (**405**) са нови



Фиг. 8: Ключови  $^1\text{H} \leftrightarrow ^1\text{H}$  NOESY корелации на скутегалирини F/G **404** и **405** за науката структури. Всички съединения съдържат  $4\alpha,18$  епоксиден и  $2\alpha,19$  полуацетален или ацетален пръстен в декалиновото ядро. При 10 от дитерпеноидите е формиран хексахидро фурофуранов пръстен в C-11 – C-16 подструктурата, в един дитерпеноид пръстенът е тетрахидро фурофуранов, а в три дитерпеноида е включен лактолен пръстен между атомите C-15/C-16.

От надземните части на *Scutellaria velenovskyi* Rech. fil, събрана през 2016 г. в района на Мезек, са изолирани два *нео*-клероданови дитерпеноида, познатия  $14,15$ -дихидрождодрелин Т (**22**) и новото съединение скутевелин А (**406**). Двете съединения са с много близки  $R_f$  стойности на ТСХ. ИЧ спектрите на двете съединения, които са почти еднакви, разкриват наличието на ацетокси групи, характеризиращи се с ивици на поглъщане при  $1740\text{ cm}^{-1}$  и тиглатен естер, идентифициран със силната абсорбция за карбонилна функция при  $1715\text{ cm}^{-1}$  в комбинация с интензивната ивица за спрегната двойна връзка при  $1653\text{ cm}^{-1}$ .



И за двете вещества е съставена молекулна формула  $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_{10}$ , която съответства на наблюдаваните в HR-ESIMS спектрите на позитивните псевдо молекулни йон пикове  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  при  $m/z$  571.2542 за съединение **406** и съответно 571.2515 за **22** (изчислено за  $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_{10}\text{Na}$ : 571,2519). В съответствие с наблюдаваните абсорбции в инфрачервените спектри за хидроксилна и естерни групи, мас-спектъра показва фрагментни йони при  $m/z$  489, 449 и 389, съответстващи на загубата на ацетокси, тиглоилокси група или и двете функции, съответно. Забележима разлика в спектрите на двете съединения е, че в спектъра на **406** най-интензивният фрагментен йон е при  $m/z$  449, докато в **22** най-интензивен е сигналът при  $m/z$  389. Наличието на споменатите заместители в молекулите на **406** и **22** се потвърждава от наблюдаваните в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите типични сигнали, съответстващи на тиглоилокси и ацетилокси остатъци. Отместеният в слабо поле сигнал при  $\delta_{\text{H}}$  7.07/6.81 (1H, qq,  $J = 7.1, 1.1\text{ Hz}$  /7.3, 1.8 Hz, H-3'), сигналите за метилови групи при  $\delta_{\text{H}}$  1.80/182 (3H, br d,

$J = 7.6$  Hz, H<sub>3-4'</sub>), 1.88/1.81 (3H, br s, H<sub>3-5'</sub>) и въглеродните сигнали при  $\delta_C$  166.0/166.34 (C=O), 128.50/128.14 (C-2'), 137.8/137.77 (C-3') показват наличие на тиглатна функция.

Сигнали за две ацетатни групи се явяват при  $\delta_H$  2.05/ $\delta_C$  169.48 и  $\delta_H$  1.78/ $\delta_C$  169.98 за съединение **406** и при  $\delta_H$  2.14/ $\delta_C$  169.9 и  $\delta_H$  1.97/ $\delta_C$  169.8 за съединение **22**. В допълнение, сигнали за три геминални протони с естерни групи присъстват при  $\delta_H$  4.64 (1H, dd,  $J = 11.1, 4.6$  Hz), 5.38 (1H, t,  $J = 2.2$  Hz) и 6.68 (1H, s) в <sup>1</sup>H спектъра на **406** и при  $\delta_H$  4.65 (1H, dd,  $J = 11.1, 4.6$  Hz), 5.36 (1H, t,  $J = 2.2$  Hz) и 6.77 (1H, s) в спектъра на **22**. Характеристичните сигнали за два 4 $\alpha$ ,18-епокси-нео-клероданови скелета лесно се различават при  $\delta_H$  1.14 s / 1.24 s (Me-20), 0.89 d / 0.89 d (Me-17). <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектралните данни на 14,15-дихидрожодрелин Т (**22**) съвпадат във всички отношения с тези на автентична проба и с докладваните данни в литературата. <sup>1</sup>H ЯМР спектърът на скутевелин А показва всички структурни особености характерни за **22** с очакваните разлики за сигналите, съответстващи на пръстена А в декалиновата ядро и на C-4/C-18 оксирановия фрагмент. Например, сигналите от АВ квартета, съответстващи на двата C-18 водородни атома, се наблюдават в **22** при  $\delta_H$  2.45, (1H, d,  $J = 4.6$  Hz, H-18A) и 3.05 (1H, d,  $J = 4.7$  Hz, H-18B) се изместват в **406** при  $\delta_H$  2.88 (1H, d,  $J = 4.3$  Hz, H-18A) и 2.91 (1H, d,  $J = 4.3$  Hz, H-18B). Такова събиране на сигналите за протони 18A и 18B е характерна особеност за съединения, които имат електронегативен заместител на трета позиция. Друго отклонение на сигналите в <sup>1</sup>H ЯМР спектрите на **406** и **22** е изместеният с 0.35 ppm в слабото поле мултиплет, характерен за C-2/C-19 етерната връзка ( $\delta_H$  4.07/4.42, H-2 $\beta$  m).

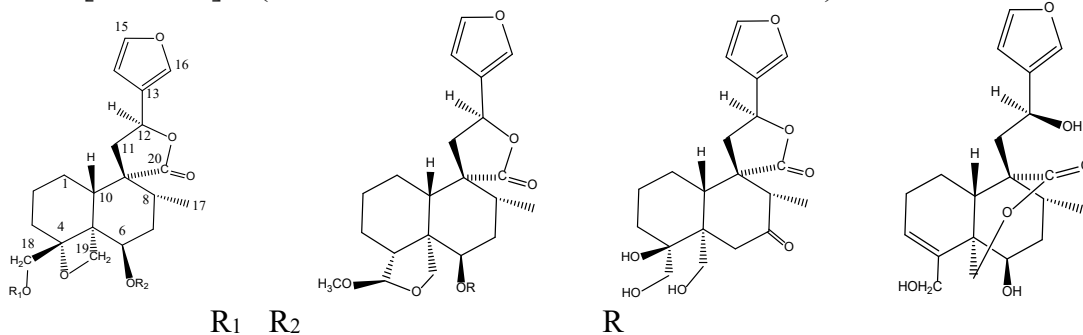
Сигналите от хексахидро фурофуновата подструктура и от пръстен В от декалиновото ядро съвпадат напълно. Измерените <sup>13</sup>C ЯМР спектри на двете съединения показват 29 сигнала и DEPT експеримента разкрива 23 резонанса за шест метилови, шест метиленови, десет мети-нови (един от тях е олефинов) и седем непротонирани въглеродни атоми (един олефинов и три карбонилни). На базата на дискутираните данни се предположи, че съединение **406** е позиционен изомер на **22** с  $\beta$ -естерна група при въглерод C-3 вместо при C-1. Това предположение се потвърждава при сравняване на техните <sup>13</sup>C ЯМР спектри с тези на скутекиприн, съединение без заместители в пръстен А, както е описано при охарактеризиране на структурата и стереохимията на неоаюгапирин А. В <sup>13</sup>C ЯМР спектъра на **406** сигналът за въглеродния атом C-4 е изместен в слабото поле с 2.89 ppm, докато този за C-18 е изместен в силното поле с 5.65 ppm. В <sup>13</sup>C ЯМР спектъра на **22** стойността на тези сигнали не се променя, но химичното отместване на въглерод C-10 се измества в слабото поле със 7,42 ppm. Приемането, че C-3 е оксигениран метинов въглероден атом, е в съгласие с наблюдаваните корелации: в HSQC спектъра, триплетът при  $\delta_H$  5.38 ppm (H-3 $\alpha$ ) взаимодейства със сигнала при  $\delta_C$  71.69; в HMBC спектъра, сигналът при  $\delta_H$  5.38 хетероколерира с  $\delta_C$  63.5 (C-4); в <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COZY спектъра, се наблюдават корелации от H-3 $\alpha$  до протоните H-1 $\alpha$ , H-2 $\beta$  и H-18B.

Накрая, мястото на свързване на тиглоилокси и двете ацетокси групи към

нео-клеродановия скелет в **406** трябва да бъде недвусмислено установено. Резонансът за карбонилна група при  $\delta_C$  169.95 (C-3') и резониращият в слабото поле дублет от дублети при  $\delta_H$  4.64 ( $J = 11.1, 4.6$ ; H-6 $\beta$ ), отнесен за метинов протон при оксигениран въглероден атом, са много често срещани структурни характеристики за клероданови дитерпеноиди с ацетатен заместител при C-6 в  $\alpha$ -позиция, както е при 14,15-дихидродределин Т. Това заключение е подкрепено и от НМВС корелациите от H-6 до C-4 ( $\delta_C$  63.49), C-5 ( $\delta_C$  42.51), C-7 ( $\delta_C$  33.40), C-19 ( $\delta_C$  90.70), C = O ( $\delta_C$  169.95) и  $^1H$ - $^1H$  COSY корелациите на H-6 с H-7 $\alpha$  и H-7 $\beta$ . Мястото на свързване на тиглатната група е C-19, определено на базата на НМВС корелацията на H-19 с C-1'. Наблюдаваните в NOESY спектъра кръстосани сигнали на H-1 с H-11, H<sub>3</sub>-17, H<sub>3</sub>-20 и на H-19 с H<sub>3</sub>-20 показват, че тези протони лежат в една равнина и са  $\alpha$ -ориентирани. Съответно, NOESY корелациите на H-6 с H-8 и H-10 разкриват неговата  $\beta$ -позиция.

## 1.2. Фитохимично изследване на *Teucrium polium* subsp. *vincentinum* (Rouy) D. Wood и *Teucrium scordium* L. subsp. *scordioides* (Shreb.) Maire et Petitmengin. за наличие на нео-клероданови дитерпеноиди.

Горчивата фракция, получена от ацетоновия екстракт на *Teucrium polium* subsp. *vincentinum* L., е разделена чрез КХ на четири субфракции (I - IV). След допълнително разделяне на I с ТСХ е получено съединение **409**, наречено поливинцин А, за което е определена молекулна формула C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub> на базата на псевдомолекулния положителен йон пик, в неговия HR-ESIMS, при  $m/z$  469.1844 [M + Na]<sup>+</sup>, (изчислено за C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>Na: 469.1838).



поливинцин А (**409**): Ac Ac    поливинцин В (**410**): Ac    поливинцин С (**411**)    теуламин В (**289**)  
 монтанин D (**312**): H H    теуполин XII (**317**): H

В ИЧ спектъра на поливинцин А присъстват абсорбции за фуранов пръстен (1508, 875 cm<sup>-1</sup>),  $\gamma$ -лактон и ацетатна естерна група (широка ивица при 1743 cm<sup>-1</sup> и втора ивица при 1246 cm<sup>-1</sup>). <sup>13</sup>C ЯМР спектърът показва наличието на двадесет и четири въглеродни атома, а DEPT експеримент идентифицира три метила, седем метилена, седем метина (три за олефинови двойни връзки) и седем непротонирани въглеродни атома, три от които са за карбонилни групи при  $\delta_C$  171.0 и 170.0 (ацетати) и 177.6 ( $\gamma$ -лактон). Наличието на фурановия пръстен в структурата на молекулата се потвърждава от сигналите при  $\delta_C$  125.0 (C-13), 108.1/ $\delta_H$  6.39 (dd, CH-14); 144.2/7.44 (t, CH-15) и 139.6/7.45 (m, CH-16) в <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H ЯМР спектрите. Отнасянето на олефиновите протони към съответните въглеродни атоми е в съгласие с данните от HSQC спектъра и наблюдаваните НМВС корелации от H-14 до C-15 и C-16, от H-15 до C-13 и от H-16 до C-14 и



C-15. В НМВС спектъра са представени допълнителни корелации от деекранираният при  $\delta_{\text{H}} 5.40$  протон Н-12 (свързан с въглерод при  $\delta_{\text{C}} 72.2$ ) до въглерод C-13 и от резониращия при  $\delta_{\text{H}} 2.33$  протон Н $\beta$ -11, който показва кръстосан пик в HSQC спектъра с въглерода при  $\delta_{\text{C}} 41.5$ , до въглеродните атоми 9 ( $\delta_{\text{C}} 51.9$ ), 10 ( $\delta_{\text{C}} 38.8$ ) и 12 ( $\delta_{\text{C}} 72.2$ ). Протонът Н $\alpha$ -11 ( $\delta_{\text{H}} 2.48$ ) показва кръстосани пикове със сигнала при  $\delta_{\text{C}} 177.7$  (карбонил C-20) и C-9. В COSY експеримента олефиновият протон при  $\delta_{\text{H}} 7.44$ , свързан с въглерода при  $\delta_{\text{H}} 144.2$  (C-15), корелира с метиновия протон при  $\delta_{\text{H}} 6.39$ , който има кръстосан пик с въглерода при  $\delta_{\text{C}} 108.1$  (C-14) в HSQC експеримента. Друг метинов протон, резониращ при  $\delta_{\text{H}} 5.40$  и свързан с оксигенирания въглерод C-12 ( $\delta_{\text{C}} 72.2$ ), корелира с двата дублет от дублети при  $\delta_{\text{H}} 2.47$  (Н $\alpha$ -11) и 2.33 (Н $\beta$ -11). Определянето на фурановата част в 12 $\beta$  позиция е в съответствие с показаните в NOESY спектъра кръстосани пикове на Me-17 ( $\delta_{\text{H}} 0.94$ ) с Н-14 ( $\delta_{\text{H}} 6.39$ ) и Н-16 ( $\delta_{\text{H}} 7.45$ ), както и на Н-1 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}} 2.19$ ) с Н-12 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}} 5.40$ ). Протона Н-6 ( $\delta_{\text{H}} 5.68$  dd) хомо-корелира, в  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY експеримента, с двата протона Н $_2$ -7 ( $\delta_{\text{H}} 2.12$  и 1.85) и взаимодейства в HSQC експеримента с въглеородния атом C-6 ( $\delta_{\text{C}} 73.0$ ), от което следва геминалното положение на Н-6 с ацетатна група. В регистрираният НМВС спектър метиленовите протони Н $_2$ -18 хетеро колерират с въглеродните атоми, C-3 ( $\delta_{\text{C}} 29.7$ ), C-4 ( $\delta_{\text{C}} 86.2$ ), C-5 ( $\delta_{\text{C}} 46.7$ ) и с карбонилния въглеороден атом C-18 $^1$  ( $\delta_{\text{C}} 170.0$ ). Метилите групи в двата ацетата се отнасят към съответния карбонилен въглерод от НМВС корелациите,  $\delta_{\text{H}} 2.06/\delta_{\text{C}} 171.0$  и  $\delta_{\text{H}} 2.10/\delta_{\text{C}} 170.0$ . Позициите на двете ацетокси групи се определят при C-6 и C-18 от НМВС корелации от Н-7 $\alpha$  до C-6 $^1$  ( $\delta_{\text{C}} 171.0$ ,  $\underline{\text{C}}=\text{O}$ ), от Н-18А до C-18 $^1$  ( $\delta_{\text{C}} 170.0$ ,  $\underline{\text{C}}=\text{O}$ ) и Н-18В до C-18 $^1$  ( $\delta_{\text{C}} 170.0$ ,  $\underline{\text{C}}=\text{O}$ ).

Поставянето на C-6 ацетокси групата в  $\beta$ -позиция, а на Н-6 в  $\alpha$ -позиция е в съответствие с малката стойност от 3.7 Hz и 2.1 Hz за константите на свързване на dd в  $^1\text{H}$  NMR спектъра при  $\delta_{\text{H}} 5.68$ , обуславящи екваториален метинов протон Н-6. Това се подкрепя от наблюдаваното в NOESY експеримента взаимодействие на Н-6 с отместеният в слабото поледублет при  $\delta_{\text{H}} 4.16$ , който е отнесен за единия от метиленовите протони (НВ-19) на оксигенирания C-19 ( $\delta_{\text{C}} 71.7$ ). Протоните НА-19 и НВ-19 НМВС хетеро-колерират до C-4, C-5, C-6 и C-10 ( $\delta_{\text{C}} 38.8$ ) и допълнително показват NOESY взаимодействие, с Н-2 $\alpha$  и съответно с Н-7 $\alpha$ . Последният оксигениран, непротониран въглеороден атом при  $\delta_{\text{C}} 86.2$  (C-4) участва във формирането на оксетанов пръстен в молекулата. Това отнасяне е подкрепено от споменатите хетерокорелации до въглерод C-4 в НМВС спектъра от НА-18, НВ-18 и НВ-19.  $^1\text{H}$  ЯМР данните на **409** са много близки до тези, публикувани от Малаков и съавтори за продукт, получен след ацетилиране на монтанин D (**312**), изолиран от *T. montanum*. Цитираните данни са:  $\delta_{\text{H}} 2.10$  и 2.05 (всеки по 3H, s) / срещу 2.10 и 2.06 в **409** за ацетатните групи; 4.05 (Н $_2$ -18) / срещу 4.06 и 4.10; 5.62 (1H, t,  $J = 4.0$  Hz, Н-6 $\alpha$ )/vs 5.68 (1H, dd,  $J = 3.7, 2.1$  Hz) и АВ тип кватер при  $\delta_{\text{H}} 5.08$  и 4.35 (1H всеки,  $J = 7.5$  Hz, Н $_2$ -19)/срещу 4.77 (1H d,  $J = 8.0$  Hz, НА-19) и 4.16 (1H d,  $J = 8.0$  Hz, НВ-19). Разликите в данните вероятно се дължат на разделителната способност на използваните спектрометри за измерване на  $^1\text{H}$  ЯМР спектрите, работещи при

600.130 MHz за **409** и цитираните 80, 100 и 220 MHz от Малаков за хеми синтетичния продукт. Също така не е ясно в какъв разтворител са разтворени пробите за регистриране на анализите. Цитирани от Малаков са  $\text{CDCl}_3$  и  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  съвместно за всички измервания, без да се уточняват условията при отделните съединения.

HR-ESIMS на съединение с тривиално наименование поливинцин В (**410**), получено от субфракция II, показва псевдомолекулен положителен йон пик при  $m/z$  441.1861  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , на базата на който е съставена молекулна формула  $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_7$  (изчислено за  $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_7\text{Na}$ : 441.1889). В ИЧ спектъра се наблюдават абсорбции, съответстващи на фуранов пръстен (3089, 1506, 1083 и  $875\text{ cm}^{-1}$ ),  $\gamma$ -лактон ( $1762$  и  $1181\text{ cm}^{-1}$ ) и ацетатна ( $1737$  и  $1246\text{ cm}^{-1}$ ) група. В  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектърът са преброени двадесет и три въглеродни атома, а DEPT експеримента идентифицира три метила, шест метиленови, девет метинови (три от фуранови двойни връзки) и пет непротонирани въглеродни атома, два от които са за карбонилни групи при  $\delta_{\text{C}}$  177.0 ( $\gamma$ -лактон) и 170.0 (ацетат). Предполагаемият фуранов остатък в молекулата се потвърждава от сигналите, в  $^1\text{H}$  NMR спектъра на **410**, за ароматни протони при  $\delta_{\text{H}}$  7.44 (brs, H-16), 7.43 (brd, H-15) и 6.38 (brs H-14).

Наблюдаваният триплет при  $\delta_{\text{H}}$  5.33/ $\delta_{\text{C}}$  71.7, отнесен за H-12 протона, е характерен сигнал за *нео*-клероданови дитерпеноиди, притежаващи фуранов пръстен (в страничната верига C-11 ÷ C-16) и  $\gamma$ -лактон включващ въглеродните атоми C-9, C-11, C-12 и C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  177.0). Тези функционални групи се потвърждават при сравнение на 1D и 2D ЯМР спектралните характеристики на дитерпеноида **410** с публикуваните данни за родствени съединения. Олефиновите метинови протони H-14, H-15, H-16 и H-12  $sp^3$  метиновият протон са отнесени към съответните въглеродни атоми, резониращи при  $\delta_{\text{C}}$  108.1, 144.1, 139.5 и 71.7 на базата на резултатите от HSQC спектъра. Многобройните корелации в  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  HMBC спектъра от H 14 до C-13, C-15, C-16, от H-15 до C-13, C-16, от H-16 до C-13, C-14, C-15, от H-11a до C-9, C-10, C-12, C-13, C-20 и от H-11 $\beta$  до C-8, C-9, C-10, C-12, C-13 потвърждават горните C–H свързвания и отнасяния на C-атоми, включително позицията на непротонирани въглеродни атоми C-13 и C-20. В COSY експеримента се наблюдават  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  корелации, между протоните H-14/H-15, H-14/H-16, H-15/H-16 и между двата метиленови протона H<sub>2</sub>-11 с H-12. За хиралния център C-12 е определена S конфигурация въз основа на наблюдаваните NOESY взаимодействия между дублета за Me-17 групата (3H,  $\delta_{\text{H}}$  0.95) и H-14 ( $\delta_{\text{H}}$  6.38) и H-16 ( $\delta_{\text{H}}$  7.44) от фурановия пръстен. Транс свързването на циклохексановите пръстени в декалиновото ядро на поливинцин В се определя от характеристичните сигнали в  $^1\text{H}$  ЯМР спектъра при  $\delta_{\text{H}}$  2.15 за метиновия протон H-10 (1H dd,  $J = 12.0, 6.0$  Hz), дублетът при  $\delta_{\text{H}}$  0.95 за Me-17 (3H d,  $J = 6.7$  Hz) и NOESY корелациите на метиленовия протон H<sub>A</sub>-19 с протони 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$  и на H<sub>B</sub>-19 с 6 $\alpha$  и 7 $\alpha$ .

Сигнали за геминални протони с кислородни атоми, резониращи във високочестотната об-ласт на спектъра, присъстват в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  спектрите за метинов протон при  $\delta_{\text{H}}$  5.36 (1H t,  $J = 2.8$  Hz, H-6 $\alpha$ )/ $\delta_{\text{C}}$  73.2 (CH) и метинов

протон при  $\delta_{\text{H}}$  4.46 (1H brs, H-18 $\alpha$ )/ $\delta_{\text{C}}$  108.7 (CH). Последният протон хетерокорелира в НМВС спектъра с C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  26.3), C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  47.1), C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  70.2) и 18<sup>1</sup> ( $\delta_{\text{C}}$  54.4). Резонансите за метиленови протони, също геминални с кислороден атом, при  $\delta_{\text{H}}$  4.14 (1H d,  $J = 10.6$  Hz, HA-19) и 3.96 (1H d,  $J = 10.7$  Hz, HB-19) показват НМВС кръстосани сигнали със C-4, C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  73.2) и C-18 ( $\delta_{\text{C}}$  108.7). Сигналят за метиловите протони при  $\delta_{\text{H}}$  3.25 (3H s, MeO-18<sup>1</sup>), свързани с въглерода при  $\delta_{\text{C}}$  54.4, корелира в НМВС спектъра с  $\delta_{\text{C}}$  108.7 (C-18). За дискутираните по-горе протони се наблюдават <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY корелациите: HA-19/HB-19, H-6 $\alpha$ /H-7 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.24), H6 $\alpha$ /H-7 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.87). Разгледаните данни, заедно с характерния сигнал за метинов протон при  $\delta_{\text{H}}$  2.18 (dd,  $J = 12.6, 3.2$  Hz, H-4) разкриват присъствието в структурата на ацетален пръстен, образуван от C-18 до въглерод C-19 хидроксиметил и метокси група. Метокси групата е прикрепена при C-18 в ендо положение по отношение на пръстен В от декалиновото ядро, на основание на кръстосания пик в NOESY спектъра между H-18A/H-3 $\alpha$  и MeO-18<sup>1</sup>/H-6 $\alpha$ . NOESY взаимодействието на протон H-10 с H-1, H-2, H-4, H-8 и H-11 протоните показва, че всички те са кофациални и  $\beta$  ориентирани. Ацетокси групата, резонираща при  $\delta_{\text{H}}$  2.08 (3H s)/170.0 (C) и 21.4 (CH<sub>3</sub>), е поставена на  $\beta$  позиция в съответствие с малката стойност на константите на свързване на геминалния екваториален 6 $\alpha$  протон, а също и на NOESY взаимодействията между H 6 $\alpha$ /7 $\alpha$ , H-6 $\alpha$ /Me-18<sup>1</sup> и H-6 $\alpha$ /19A. Освен това, в силното поле на спектъра се наблюдава мултиплет за метинов протон при  $\delta_{\text{H}}$  1.78, който е свързан с въглерод при  $\delta_{\text{C}}$  33.2 (C-8), корелиращ в <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY спектъра с H-7 $\alpha$ , H-7 $\beta$  и Me-17. Сигнали за общо седем препокрити протона са установени в обхвата от 1.38 ÷ 1.79 ppm. Спектралните данни на поливинцин В са много близки до тези на теополин XII (**317**), изолиран от *Teucrium polium* L. subsp. *polium* от Fiorentino et al. Наблюдаваните разлики са за отместеният в слабоатомното поле сигнал в <sup>1</sup>H NMR спектър за протон H-6 $\alpha$ , от  $\delta_{\text{H}}$  4.23 в **317** до  $\delta_{\text{H}}$  5.36 в спектъра на **410**, освен допълнителните сигнали в <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR спектрите на **410** за ацетокси група при  $\delta_{\text{H}}$  2.08/  $\delta_{\text{C}}$  170.0 (CO) и 21.4 (CH<sub>3</sub>).

За третия нов нео-клероданов дитерпеноид, поливинцин С (**411**), изолиран от фракция III е установена молекулна формула C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub> от отрицателния молекулен йон пик [M-H]<sup>-</sup> в HR-ESIMS спектъра при m/z 377.1599 (изчислено за C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>O<sub>7</sub>: 377.1600). В ИЧ спектъра се наблюдават абсорбции за хидроксилни (3439 cm<sup>-1</sup>), фуран (1506, 875 cm<sup>-1</sup>),  $\gamma$ -лактон и карбонилни (1759 cm<sup>-1</sup>, широка ивица) функции. Във <sup>13</sup>C ЯМР спектъра са преброени двадесет въглеродни атома, а DEPT експеримента идентифицира един метил, седем метилена, шест метина и шест непротонирани въглеродни атома, като два от тях са за карбонилни групи при  $\delta_{\text{C}}$  211.0 (кетон) и 177.9 ( $\gamma$ -лактон). Сигналите при  $\delta_{\text{C}}$  125.0 (C-13),  $\delta_{\text{C}}$  108.2 / $\delta_{\text{H}}$  6.39 br s (H-14),  $\delta_{\text{C}}$  144.1 / $\delta_{\text{H}}$  7.43 dd (H-15) и  $\delta_{\text{C}}$  139.6 / $\delta_{\text{H}}$  7.45 br s (CH-16), показват наличието на фуранов пръстен в структурата на молекулата. Прикрепянето на фурановите протони към съответните въглероди е в съгласие с HSQC спектъра и наблюдаваните НМВС корелации от H-14 до C-16, от H-15 до C-16 и от H-16 до C-13 и C-14. В НМВС спектъра са представени допълнителни корелации до въглерод C-13 от отместения в

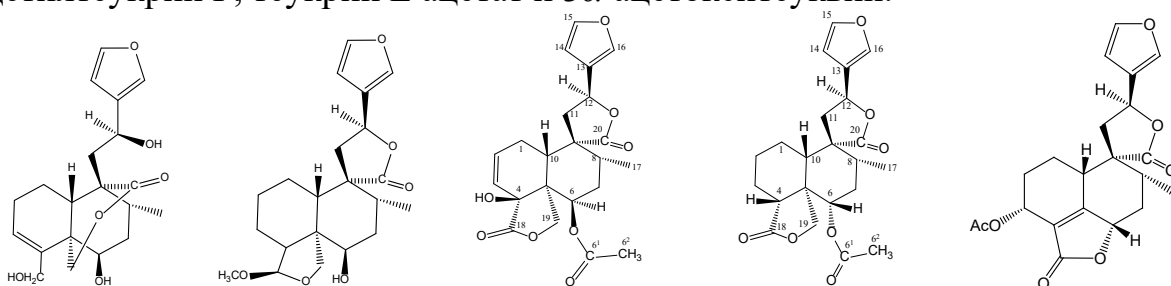
слабото, поле при  $\delta_{\text{H}}$  5.38, протон H-12 и от резониращия при  $\delta_{\text{H}}$  2.32 протон H $\beta$ -11, който показва кръстосан пик в HSQC спектъра с въглерод при  $\delta_{\text{C}}$  41.7. Два протона, H $\beta$ -11 ( $\delta_{\text{H}}$  2.32) и H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  2.07) показват кръстосан пик със сигнала при  $\delta_{\text{C}}$  177.9 (карбонил C-20). В COSY експеримента, фурановия протон при  $\delta_{\text{H}}$  7.43, който е свързан с въглерода при  $\delta_{\text{C}}$  144.1 (C-15), корелира с метиновия протон при  $\delta_{\text{H}}$  6.39, който показва кръстосан пик с въглерода при  $\delta_{\text{C}}$  108.2 (C-14) в HSQC експеримента. Друг метинов протон, резониращ при  $\delta_{\text{H}}$  5.38 и свързан с оксигенирания въглерод C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  72.2), корелира с двата дублета от дублети при  $\delta_{\text{H}}$  2.47 (H $\alpha$ -11) и 2.32 (H $\beta$ -11). Фурановия пръстен заема 12 $\beta$  положение в съответствие с представените в NOESY спектъра кръстосани пикове на Me-17 ( $\delta_{\text{H}}$  0.94) с H-14 и H-16 както и между протоните H-11 $\alpha$ /12 $\alpha$ , H11 $\alpha$ /H-1 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.13) и 12 $\alpha$ /H-1 $\alpha$ . Последният протон (H-1 $\alpha$ ) показва NOESY взаимодействие със сигнали при  $\delta_{\text{H}}$  4.04 (H $\alpha$ -19) и 4.74 (H $\beta$ -19), което показва неговата  $\alpha$ -ориентация. Останалите четири сигнала за оксигенирани въглеродни атоми, два непротонирани и два метиленови, са отнесени за въглеродните атоми в декалиновото ядро: C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  88.2, C), C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  211.0, CO), C-18 ( $\delta_{\text{C}}$  66.6, CH<sub>2</sub>) и C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  71.8, CH<sub>2</sub>). Отнасянията са в съответствие с 2D спектрите.

В HMBC спектъра се наблюдават кръстосани пикове от дублетите при  $\delta_{\text{H}}$  3.37 и 4.14, които са за водородни атоми свързани с въглерод резониращ в HSQC експеримента при  $\delta_{\text{C}}$  66.6 (C-18), до  $\delta_{\text{C}}$  88.2 (C-4), 47.6 (C-5) и до  $\delta_{\text{C}}$  30.1 (C-3), C-4, C-5. Дублетите при  $\delta_{\text{H}}$  4.04 и 4.74, които показват в HSQC спектъра връзка с въглерод резониращ при  $\delta_{\text{C}}$  71.8 (C-19), имат HMBC корелации, на свой ред до C-4, C-5 и до C-9 ( $\delta_{\text{H}}$  69.6). Сигналят за кетонна функционална група при  $\delta_{\text{C}}$  211.0, е отнесен за C-7 на базата на наблюдаваните HMBC корелации от синглетата за два протона при  $\delta_{\text{H}}$  2.63 (CH<sub>2</sub>-6) до  $\delta_{\text{C}}$  211.0 (C-7), 30.1 (C-3), 69.6 (C-9) и от дублета от дублети при  $\delta_{\text{C}}$  2.17 (H-10) до  $\delta_{\text{C}}$  53.7 (C-6) и до 211.0 (C-7). Също така, обичайният мултиплет за H-8, в дитерпеноиди с незаместен въглерод C-7, е редуциран в квартет при  $\delta_{\text{H}}$  2.07. Този опростен сигнал (H-8) показва взаимодействие в <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY спектъра, с дублета за три протона при  $\delta_{\text{H}}$  0.94 (Me-17) и HMBC крос пик до карбонилния атом при  $\delta_{\text{C}}$  177.9 (C-20). От друга страна, Me-17 протоните хетеро-корелират до  $\delta_{\text{C}}$  32.1 (C-8) и 53.7 (C-6). Взаимодействие-то между протоните H $\alpha$ -18 и H $\alpha$ -19, наблюдавано в NOESY експериментите, потвърждава  $\alpha$ -ориентацията на H-18 хидрокси метиленовата група и  $\beta$ -ориентацията на третичната хидроксилна група при C-4, съответно. Други наблюдавани NOESY взаимодействия са H-3 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.58)/H-1 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.13), H-3 $\alpha$ /H-2 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.14), 10 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.16)/1 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.80) и 10 $\beta$ /2 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.72), които показват ориентацията на съответните водородни атоми.

От фракция III е изолирано второ съединение идентично във всички отношения с изолираният, през 1988 г. от Малаков и съавтори от *Teucrium lamifolium*, нео-клероданов дитерпеноид теуламифин В (289).

Спектралните данни за нео-клеродановият дитерпеноид доказан в последната фракция IV са напълно еднакви с публикуваните данни за изолираният от *Teucrium polium* L. subsp. *polium* през 2011 г. от Fiorentino et al нео-клероданов дитерпеноид, теуполин XII (317).

Фитохимичното проучване на род *Teucrium* продължи с последният неизследван за наличие на дитерпеноиди представител - *Teucrium scordium* L. subsp. *scordioides* (Shreb.) Maire et Petitmengin. При качествен анализ с ТСХ на горчивата фракция, получена от ацетоновия екстракт на растителен материал от растението, се наблюдават две ясно разграничими по полярността си групи от съединения (I и II). Шест клероданови дитерпеноида са изолирани от горчивата фракция след хроматографско разделяне на колона запълнена със силикагел и елуиране с петролев етер (12 L) и последваща смес от разтворителите CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – CH<sub>3</sub>OH с нарастваща полярност с градиент от 10:0 до 9.7:0.3. От фракция I при елуиране със смес CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – CH<sub>3</sub>OH с градиент от 10:0 до 9.9:0.1 са изолирани три фурокле-роданови дилактона **412** - **414** с тривиални наименования, 6-ацетилтеукрин F, теукрин E ацетат и 3 $\alpha$ -ацетокситеуквин.



теуламифин В (289) теуполин XII (317) 6-ацетилтеукрин F (412) теукрин E ацетат (413) 3 $\alpha$ -ацетокси-теуквин (414)

Въпреки че съединения **412** и **413** са получени по-рано, полусинтетично чрез ацетиране с оцетен анхидрид/пиридин на съответните хидрокси производни, изолирани от *Teucrium hamaedris*, в настоящото изследване те са получени за първи път от растителен произход. За съединение **412**, получено чрез ацетиране на теукрин F, всички сигнали в <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектрите са определени. Коригирани са само отнасянията за C-1 и C-2. Съединение е **413** е докладвано само с <sup>1</sup>H NMR данни. За да се улесни идентифицирането на веществата при последваща изолация, в работата са включени напълно отнесените <sup>13</sup>C ЯМР данни.

На основание на псевдо-молекуления положителен йон пик при m/z 439.1367 [M+Na]<sup>+</sup> в HR-ESIMS за съединение **412** е съставена молекулна формула C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub> (изчислено за C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>Na: 439.1369) показваща 11 степени на ненаситеност. В ИЧ спектъра на съединението се наблюдават абсорбционни ивици съответстващи на фуранов пръстен (3146, 1505, 875 cm<sup>-1</sup>), лактонна и ацетатна функция (1761 широка ивица 1178 и 1239 cm<sup>-1</sup>), и хидроксилна група (3437 cm<sup>-1</sup>). В <sup>13</sup>C ЯМР спектъра присъстват сигнали за 22 въглеродни атома, а DEPT експеримента идентифицира два метилови (единият от тях за ацетатна група), четири метиленови (единият е оксигениран, CH<sub>2</sub>-19), девет метинови (включващи три ароматни, два олефинови, два окислени) и седем непротонирани въглеродни атома (класифицирани като два кватернерни, един олефинов, един оксигениран и три за карбонилни групи – една от ацетат и две от  $\gamma$ -лактонни пръстени. Спектралните ЯМР данни потвърждават присъствието в молекулата на изолираният дитерпен на фуранов пръстен, установен от сигналите в <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектрите, при  $\delta_C$  124.6 (C-13), 108.0/ $\delta_H$  6.41 (dd, CH-14), 144.3/7.46 (t, CH-15) и 139.6/7.47 (m, CH-16). Отнасянето на ароматните

олефинови протони към съответстващите въглеродни атоми е в съгласие с данните от HSQC спектъра и наблюдаваните HMBC корелации от H-14 до C-15 и C-16, от H-15 до C-13 и от H-16 до C-14 и C-15. В HMBC спектъра се наблюдават допълнителни корелации от сигнала при  $\delta_{\text{H}}$  5.42 t (протон H-12, който хетероколерира в HSQC спектъра с въглероден атом резониращ при  $\delta_{\text{C}}$  72.1) до въглеродите C-13, C-14, C-16 и от сигналите при  $\delta_{\text{H}}$  2.57 и 2.47 (за метиленовите протони H<sub>2</sub>-11, които показват кръстосани пикове в HSQC спектъра с въглеродния сигнал при  $\delta_{\text{C}}$  42.5) до C-13. В COSY експеримента се наблюдават корелации между H-14/H-15, H-12/H-11 $\alpha$ , H-12/H-11 $\beta$ . Сигнали за два  $\gamma$ -лактонни пръстена склучени между C-20 – C-12 и C-18 – C-19, са представени в <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектрите: за карбонилни групи при  $\delta_{\text{C}}$  177.5 (C-20) и 176.0 (C-18), за оксигенирани метинова и метиленова групи при  $\delta_{\text{C}}$  72.1/ $\delta_{\text{H}}$  5.42 t (CH-12) и  $\delta_{\text{C}}$  69.0/ $\delta_{\text{H}}$  4.54 d и 4.12 d (CH<sub>2</sub>-19). Тези заключения са в съгласие с наблюдаваните в HMBC спектъра хетерокорелации. За C-20 – C-12  $\gamma$ -лактонния пръстен, от H-11 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.47 dd) до C-12, от H-11 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.57 dd) до C-12 и C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  177.5), от H-12 до C-11, от H-10 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.61 ov) до C-20, от метиновия протон H-8 $\beta$  (2.13 m) до C-20 и от двата метиленови протона H<sub>2</sub>-1 (2.08 ov и 2.61 ov) до C-20. За C-18 – C-19  $\gamma$ -лактонния пръстен, от H-1 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.61 ov) до C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  75.9) и C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  47.8), от H-7 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.69 dt) до C-5, от H-10 $\beta$  до C-4 и C-5, от H-19A ( $\delta_{\text{H}}$  4.54, d) до C-4 и C-18 ( $\delta_{\text{C}}$  176.0) и от H-19B ( $\delta_{\text{H}}$  4.12, d) до C-18. В COSY спектъра се наблюдават кръстосани пикове между H-11 $\alpha$ /H-12 $\beta$ . Свързването на ацетилокси групата с C-6 се установи от HMBC корелациите от H-6 $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}}$  5.41, dd) до b<sup>1</sup> ( $\delta_{\text{C}}$  170.2, C=O) и от b<sup>2</sup> ( $\delta_{\text{H}}$  2.04, 3H) до C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  68.0). Поставянето на ацетиловия естер в  $\beta$ -позиция и H-6 в  $\alpha$ -позиция е в съгласие с малката стойност от 4.2 и 2.0 Hz за свързващите константи на dd при  $\delta_{\text{H}}$  5.41, в <sup>1</sup>H ЯМР спектъра, дължащ се на метиновия протон H-6. Това заключение се потвърждава от наблюдаваните взаимодействия в NOESY експеримента на H-6 с отместеният в слабото поле дублет при  $\delta_{\text{H}}$  4.54, който бе отнесен за единия (H-19A) от метиленовите протони на окисления C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  69.0). Двата олефинови въглерода, резониращи при  $\delta_{\text{C}}$  129.9 и 125.6, са метинови атоми. Този факт определя възможност двойната връзка да бъде формирана между C-1 – C-2 или между C-2 – C-3. На основание на мултиплетността и стойността на свързващите константи на сигнала за H-3 (dq,  $J = 9.7, 1.3, < 1.0$ ) ние заключихме, че  $\Delta^2$  олефинова връзка е представена в декалиновия пръстен на съединение **412**. В случай на присъствие на  $\Delta^1$  двойна връзка сигналът за H-1, който е еквивалентен на H-3 в съединения с  $\Delta^2$  олефинова връзка, ще бъде по-сложен в следствие на присъствието на допълнителен съседен протон (H-10). Това заключение се потвърждава от силните HMBC корелации от H-1 $\beta$  до C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  51.6), C-20 и C-11. Също така, в NOESY спектъра е представено взаимодействие между H-1 $\beta$ /H-12 $\alpha$ . Последният окислен непротониран въглероден атом при  $\delta_{\text{C}}$  75.9 е отнесен за C-4 на основата на HMBC хетерокорелации до C-4 от H-1 $\beta$ , H-10 $\beta$  and H-19A. Относителната конфигурация на **412** е установена чрез наблюдаваните в NOESY спектъра хомо корелации H-1 $\beta$ /H-12 $\alpha$ , H-11 $\alpha$ /H-12 $\alpha$ , H-11 $\beta$ /H-14,

H-11 $\beta$ /H-16, Me-17/H-11 $\beta$ , Me-17/H-14 и Me-17/H-16 показващи, че фурановият пръстен е в  $\beta$ -конфигурация. Допълнително, корелациите на H-6 с H-7 $\alpha$ , H-19A, на H-1 $\alpha$  с H-19B и на H-7 $\alpha$  с H-19A, показват тяхното ко-фициално сродство и са отнесени в  $\alpha$ -позиция.

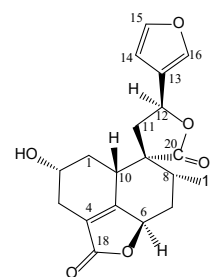
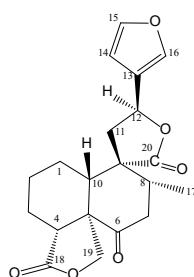
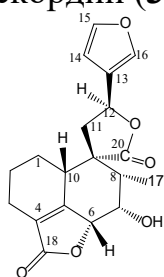
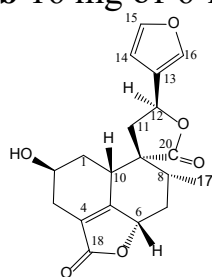
В HR-ESIMS спектъра на съединение **413**, с тривиално наименование теукрин E ацетат, е регистриран псевдо-молекулен позитивен йон пик при  $m/z$  403.1757  $[M+H]^+$ , който определя молекулна формула  $C_{22}H_{26}O_7$ , (изчислено за  $C_{22}H_{26}O_7H$ : 403.1753). В сравнение със съединение **412**, молекулната формула на теукрин E ацетат съдържа два водородни атома в повече, респективно 10 степени на ненаситеност, и един кислороден атом по-малко. В ИЧ спектъра на **413** се наблюдават абсорбции разкриващи присъствието в молекулата на фуранов пръстен (3147, 1506, 1113 и 875  $cm^{-1}$ ), лактонна и ацетатна група (1764 широка ивица, 1180 и 1240  $cm^{-1}$ ) и липсват ивици на поглъщане за олефинова двойна връзка и хидроксилна група. Във  $^{13}C$  ЯМР спектъра присъстват сигнали за 22 въглеродни атома, а DEPT експеримента идентифицира два метилови, шест метиленови, осем метинови (три от фуранови двойни връзки) и шест непротонирани въглеродни атома, два от които са кватернерни, един е за олефинов въглерод, а останалите три за въглерод от карбонилни групи (при  $\delta_C$  176.5 и 178.5 за  $\gamma$ -лактони и 170.8 за ацетат).  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР спектралните данни за **413** са много сходни с тези на дитерпеноид **412**. Малките разлики са в липсата на олефинова двойна връзка и хидроксилна група -характеристичните сигнали в ЯМР спектрите на **412** за два олефинови метинови въглерода при  $\delta_C$  129.9,  $CN/\delta_H$  6.10 ddd и  $\delta_C$  125.6,  $CN/\delta_H$  5.55 dq и за непротониран въглероден атом при  $\delta_C$  75.9 (C-4), не се явяват в ЯМР спектрите на **413**. Вместо тях, се наблюдават характеристични сигнали за C-4/H $\beta$  метинова група при  $\delta_C$  46.01,  $CN/\delta_H$  2.18 br s. Направените отнасяния са в съгласие с данните от HSQC спектъра. H-6 $\beta$ /8 $\beta$  и H-6 $\beta$ /10 $\beta$ . Фурановия пръстен е поставен в  $\beta$ -позиция съгласно наблюдаваните в NOESY спектъра корелации на H-12 $\alpha$  с H-1 $\beta$  и H-11 $\alpha$ , на H-11 $\beta$  с H-14 и H-16 и на Me-17 с H-11 $\beta$ , H-14 и H-16. Взаимодействията на водород H-6 с H-4, H-8 и H-10 показват че тези протони лежат в една равнина и са  $\beta$ -ориентирани. От друга страна взаимодействията на H-7 $\alpha$  с H-19a, H $_3$ -6 $^2$  и H $_3$ -17 и на H-19b с H-2 $\alpha$  подчертават тяхната  $\alpha$ -позиция. Въз основа на разгледаните спектрални данни за теукрин E ацетат е отнесена структура **413**.

За третият изолиран дитерпен, от *Teucrium scordium* L. subsp. *scordioides*, 3 $\alpha$ -ацетокси-теуквин (**414**) е установена молекулна формула  $C_{21}H_{22}O_7$  от псевдо-молекуления позитивен йон пик, в неговия HR-ESIMS спектър, при  $m/z$  403.1757  $[M+Na]^+$ , (изчислено за  $C_{21}H_{22}O_7Na$ : 403.1753). Молекулната формула показва 11 степени на ненаситеност. Нечетният брой въглеродни атома предполага структура с 19-*нор*-клероданов скелет или присъствие в молекулата на метокси група. В ИЧ спектъра на **414** се наблюдават абсорбции разкриващи присъствието в молекулата на фуранов (3146, 1506, 1069, 875  $cm^{-1}$ ) и лактонен пръстен и ацетатна група (1761 широка ивица, 1178 и 1240  $cm^{-1}$ ). Във  $^{13}C$  ЯМР спектъра са представени сигнали за 22 въглеродни атома, които са

класифицирани с помощта на DEPT експеримента на два метилови, четири метиленови, осем метинови (три от които са ароматни и три окислени) и седем непротонирани (включващи три карбонилни при  $\delta_C$  174.9 от  $\gamma$ -lactone, 170.7 от  $\alpha,\beta$ -ненаситен  $\gamma$ -lactone, 170.5 от ацетат; три олефинови при  $\delta_C$  124.1, 124.7, 167.5 и един кватернерен при  $\delta_C$  53.6) въглеродни атома. Не се наблюдават характеристични сигнали за метокси група в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите. Описаните спектрални данни определят съединение **414** като дитерпеноид с 19-*нор*-фуроклерода-дилактонов скелет с един ацетилокси заместител. Спектралните данни за C-11 – C-16 подструктурата са много близки до тази за дитерпените **412** и **413**. Сигналите при  $\delta_C$  124.7 и 167.5, за непротонирани олефинови въглеродни атоми са отнесени за C-4 и C-5. Те са част от  $\alpha,\beta$ -ненаситен  $\gamma$ -лактон склучен между C-18 и C-6. В спектъра са представени допълнително корелации до C-6 от метиленовите протони H<sub>2</sub>-1 и от метиловите протони H<sub>3</sub>-17. Свързването на кислородния атом с C-6 с  $\alpha$ -връзка е установено от NOESY корелацията на H-6 $\beta$  с H-10 $\beta$ .

Мястото на ацетилокси групата при C-3 е определено на базата на  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY хетерокорелациите на геминалния на ацетатната група протон H-3 $\beta$  ( $\delta_H$  5.601) с H-6 $\beta$  ( $\delta_H$  4.815) и с H-10 $\beta$  ( $\delta_H$  2.685). Това заключение се подкрепя от HMBC корелациите от H-1 $\alpha$  ( $\delta_H$  2.13) до C-3 ( $\delta_C$  60.39) и от H-2 $\alpha$  ( $\delta_H$  2.16) до метиловия въглерод на ацетилокси групата C-3<sup>2</sup> ( $\delta_C$  21.17). Бета-ориентацията на заместителя е установена от ниската стойност на свързващите константи на сигнала (br s) за екваториалния H-3 при свързването му със съседните протони H-2 $\alpha$  и H-2 $\beta$ . Това предположение се потвърждава и от взаимодействието в NOESY спектъра на H-3 с H-2 $\alpha$  и с H-2 $\beta$  показващо, че H-3 е в екваториално положение, в случая  $\beta$ -ориентиран. NOESY взаимодействията между протоните H-6/H-8, H-6/H-10 и H-8/H-10, определят протоните H-6, H-8 и H-10 като копланарни и  $\beta$ -ориентирани. Съединение **414** беше определено като 3 $\alpha$ -ацетилно производно на теуквин (**355**), изолиран от Fujita и Uchida от *Teucrium viscidurn* var. *miquelianum*.

При елуиране на фракция **II** със смес от CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – CH<sub>3</sub>OH с градиент от 9.8:0.2 до 9.7:0.3 са изолирани две хомогенни на ТСХ подфракции **IIa** и **IIb**. След прекристализиране от ацетон са получени от подфракция **IIa** 12 mg смес от позиционните изомери скордидесин (**415**) / теукрин А (**356**) и от субстанция **IIb** 16 mg от 6-кетотеускордин (**361**).



скордидесин А (**415**)    теукрин А (**356**)    6-кетотеускордин (**361**)    теукрин H<sub>4</sub> (**345**)

От наблюдаваният положителен псевдомолекулен йон пик при  $m/z$  367.1171 [M+Na]<sup>+</sup> в HR-ESIMS за подфракция **IIa** беше установена молекулна формула C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> (изчислено за C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>Na: 367.1158). Нечетния брой въглеродни атоми



в молекулата на субстанция **Па** указва наличие на съединение с 19-*нор*-клероданов скелет. Наблюдаваните абсорбционни пикове в ИЧС на **Па** указват наличието на фуранов пръстен (1505, 1076 и 874  $\text{cm}^{-1}$ ), лактонни пръстени (1746 широка ивица и 1180  $\text{cm}^{-1}$ ) и 3435  $\text{cm}^{-1}$  (хидроксилна група). В  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите на субстанция **I** присъстват различаващи се двойни сигнали за всички водородни и въглеродни атоми, указващи наличието на близо 7:8 неделима смес от два структурно близки 19-*нор*-клероданови производни (**415/356**).  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данните за съединението в по-голямо количество **356** са идентични във всеки аспект с тези на охарактеризирания преди дитерпеноид теукрин А. При директно сравняване на  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР кривите на съединение **356** с тези публикувани от Elmastas et al. за теукрин А показват тяхната очевидна еднаквост. По този начин се изключват сигналите за теукрин А и останалите сигнали се интерпретират индивидуално за другия компонент (**415**) на сместа **I**. Същата молекулна формула е съставена за дитерпена **415** на базата на двата HR-ESIMS – регистрирани при положителни и негативни условия.  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектъра разкрива присъствието на 19 въглеродни атома, а DEPT експеримента установява един метилов ( $\delta_{\text{C}}$  16.5,  $\text{CH}_3$ -17), четири метиленови, осем метинови [от които три ароматни при  $\delta_{\text{C}}$  140.4 (C-16), 144.4 (C-15), 108.5 (C-14), пет окислени – при  $\delta_{\text{C}}$  58.2 (C-2), 77.7 (C-6), 71.7 (C-12), 144.4 (C-15) и 140.4 (C-16)] и шест непротонирани [включително два карбонилни, при  $\delta_{\text{C}}$  175.6 за  $\gamma$ -лактон (C-20) и 171.6 за  $\alpha,\beta$ -ненаситен  $\gamma$ -лактон (C-18); два олефинови при  $\delta_{\text{C}}$  126.7 (C-4) и 166.1 (C-5), един ароматен  $\delta_{\text{C}}$  125.5 (C-13) и един кватернерен при  $\delta_{\text{C}}$  53.6 (C-9)] въглеродни атома. Отнасянето на водородните атоми към съответните въглеродни атоми е в съгласие с резултатите от HSQC експеримента. Наличието на фуран в молекулата е потвърдено от корелациите между сигналите при  $\delta_{\text{C}}$  108.5/ $\delta_{\text{H}}$  6.55 dd (CH-14), 144.4/7.62 t (CH-15) и 140.4/7.72 dt (CH-16). Коректността на отнасянията е потвърдена от наблюдаваните HMBC корелации от H-14 до C-13, C-15 и C-16, от H-15 до C-13 (125.5) и от H-16 до C-14 и C-15. Други HMBC корелации в спектъра са от сигнала за H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  5.62 t) до въглеродите C-13, C-14, C-16 и от сигналите на метиленовите протони H<sub>2</sub>-11 ( $\delta_{\text{H}}$  2.78 и 2.85) до C-13. В COSY експеримента се наблюдават взаимодействия между H-14/H-15, H-14/H-16 и H-11A/H-12. Присъствието на два  $\gamma$ -лактонни пръстена, формирани между C-20 и C-12, също както между C-18 и C-6, се потвърди от специфичните сигнали в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите – за карбонилни групи при  $\delta_{\text{C}}$  175.6 (C-20) и 171.6 (C-18) и за окислени метинови групи при  $\delta_{\text{C}}$  71.7/ $\delta_{\text{H}}$  5.62 t (CH-12) и при  $\delta_{\text{C}}$  77.7/ $\delta_{\text{H}}$  4.88 m (CH-6). Протоните са отнесени към съответните въглероди анализирайки резултатите от HSQC спектъра. За C-20 – C-12  $\gamma$ -лактонния пръстен са представени HMBC хетеро-корелации от H-11A ( $\delta_{\text{H}}$  2.78 ov m) до C-12 и C-20, от H-12 до C-11 и от метиновия протон H-8 $\beta$  (2.12 ov m) до C-20. За C-18 – C-6  $\alpha,\beta$ -ненаситения  $\gamma$ -лактонен пръстен, от H-3 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.04) до C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  126.7) и C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  166.1), от метиленовите протони H<sub>2</sub>-7 ( $\delta_{\text{H}}$  2.25 и 2.18) до C-5 и C-6, от H-8 $\beta$  до C-5 и C-6 и от метиловите протони H<sub>3</sub>-17 ( $\delta_{\text{H}}$  1.09) до C-6. Ориентирането на фурановия пръстен в  $\beta$ -положение се установява от NOESY взаимодействията

на метиловите протони H<sub>3</sub>-17 с H-14 и с H-16 и на H-12 с H-11A. Наблюдаваните NOESY корелации на H-6β с H-8β и с H-10β показват α връзката между C-6 и кислородния атом от лактонния пръстен. <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектралните данни на **415** са подобни на данните на теукрин А (**356**). Значимо различие се наблюдава в <sup>1</sup>H ЯМР спектъра за H-6 сигнала (δ<sub>H</sub> 4.93 ddd) в **356**, който е отместен в силното поле в **415** при 4.88 и е с по-сложна мултиплетна структура вследствие на присъствието на допълнителен съседен протон (H-7α).

Сигналът за H-7β при δ<sub>H</sub> 4.09 ddd в съединение **356** не се наблюдава сред сигналите на дитерпен **415**. Вместо него се появява отместен в слабото поле br s при δ<sub>H</sub> 4.42. Хидроксилната група в **415** е свързана с окисления C-2 (δ<sub>C</sub> 58.1). Този възглед е в съгласие с наблюдаваните HMBC корелации – от H-1β (δ<sub>H</sub> 1.95) до C-2 и C-10, от H-3α до C-2, от COSY корелациите между H-1β/H-2α и от NOESY взаимодействията между H-1α/H-2α, H-1β/H-2α и H-2α/H-3α,. NOESY взаимодействията на H-2α с аксиалните протони 2α и 3α подчертават екваториалното положение на протона H-2α. <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектралните данни на **415** са много близки до тези докладвани преди за теукрин H<sub>4</sub> (**345**). Забележимата разлика се наблюдава за сигнала на H-6 който се явява в **345** при δ<sub>H</sub> 5.98 а в дитерпена **415** е отместен с 1.10 ppm в силното поле при δ<sub>H</sub> 4.88. Ориентирането на H-6 в β-позиция в **415** се потвърждава от наблюдаваните NOESY корелации на H-6 с H-8β и с H-10β. Друго различие, между двете съединения, е установено за метиновата група CH-2 и за съседните CH<sub>2</sub>-1 и CH<sub>2</sub>-3 метиленови групи. В съединение **345** тези сигнали са докладвани при δ<sub>C</sub> 68.6 (CH-2) / δ<sub>H</sub> 4.44 dddd ( $J_{1\alpha(ax), 2\beta(ax)} = 10.4$ ,  $J_{1\beta(eq), 2\beta(ax)} = 3.7$ ,  $J_{2\beta(ax), 3\alpha(ax)} = 9.5$ ,  $J_{2\beta(ax), 3\beta(eq)} = 6.5$ ) за аксиалния протон H-2β. Цитираните сигнали за съседните метиленови групи са при δ<sub>C</sub> 34.3 (C-1)/δ<sub>H</sub> 1.96 dddd ( $J_{1\alpha, 1\beta} = 11.8$ ,  $J_{1\alpha, 10\beta} = 10.1$ , H-1α), δ<sub>H</sub> 2.76 dt ( $J_{1\beta, 10\beta} = 3.7$ , H-1β) and δ<sub>C</sub> 30.4 (C-3)/δ<sub>H</sub> 2.39 dddd ( $J_{3\alpha, 3\beta} = 17.9$ , H-3α), δ<sub>H</sub> 3.00 br dd (H-3β). В съединение **415** сигналът за протон H-2 (δ<sub>H</sub> 4.42 br s) се свива в сравнение с dddd при δ<sub>H</sub> 4.44 в теукрин H<sub>4</sub> (**345**). Малката стойност на константите на спин-спиново взаимодействие за водород H-2 in **415** изисква протонът да бъде в екваториална позиция, в случая α-ориентиран. Този извод се потвърждава от NOESY взаимодействията на H-2α с H-1α и с H-3α, указващи че тези протони лежат в една равнина и са α-ориентирани. Такива взаимодействия не са въз-можни, ако H-2 е в аксиално положение, в случая β-ориентиран. Също така, не се наблюдава взаимодействие в NOESY спектъра между H-2 и H-10β, каквото ще се очаква, ако H-2 би бил в бета (аксиал) положение. На базата на всички описани данни за скордидесин А е отнесена структура **415**.

Регистрираните <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектри разкриват субстанция **II** като самостоятелно съединение (**361**). На базата на положителния позитивен йон пик при m/z 381.1308 [M+Na]<sup>+</sup> в HR-ESIMS за съединение **361** е установена молекулна формула C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> (изчислено за C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>Na: 381.1314) указваща 10 степени на водороден дефицит. В ИЧ спектъра се наблюдават абсорбции за фуранов пръстен (1504 и 875 cm<sup>-1</sup>), лактонни (1786, 1760, 1182 cm<sup>-1</sup>) и хидроксилна група (3436 cm<sup>-1</sup>). Във <sup>13</sup>C ЯМР спектъра са представени двадесет въглеродни атома, а DEPT експеримента идентифицира един метилов, шест

метиленови (един от тях окислен, CH<sub>2</sub>-19), седем метинови (включващи три ароматни, три окислени) и шест непротонирани (включително два кватернерни, един ароматен и три за карбонилни групи – една за кетон и две за  $\gamma$ -лактони) въглеродни атома. Фурановият пръстен в молекулата е потвърден от сигналите при  $\delta_C$  124.5 (C-13),  $\delta_C$  107.8/ $\delta_H$  6.40 (br s, CH-14),  $\delta_C$  144.5/ $\delta_H$  7.47 (br s, CH-15) и  $\delta_C$  139.7/ $\delta_H$  7.48 (br s, CH-16) във <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H ЯМР спектрите. Отнасянето на водородните атоми към съответните въглеродни атоми е съгласие с данните от HSQC спектъра и от корелациите в HMBC спектъра от H-14 до C-15 и C-16, от H-15 до C-13 и от H-16 до C-14 и C-15. Допълнителни корелации се наблюдават от сигналите при  $\delta_H$  5.44 t (H-12) до въглеродите C-13, C-14, C-16 и от сигналите за метиленовите протони при  $\delta_H$  2.54 и 2.46 (CH<sub>2</sub>-11) до C-13. Хомокорелации между H-14/H-15, H-12/H-11A, H-12/H-11B присъстват в COSY спектъра. Наличието на два  $\gamma$ -лактонни пръстена C-20 – C-12 както и C-18 – C-19, се потвърждава от специфичните сигнали в <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектрите: за карбонилните функции сигналите са при  $\delta_C$  177.4 (C-20) и 176.8 (C-18), за окислените метинови групи – при  $\delta_C$  72.1/ $\delta_H$  5.44 t (CH-12) и окислените метиленови групи – при  $\delta_C$  69.3/ $\delta_H$  4.80 d и 4.49 d (CH<sub>2</sub>-19). Тези отнасяния са в съгласие с представените HMBC корелации: за C-20 – C-12  $\gamma$ -лактонния пръстен, от H<sub>2</sub>-11 ( $\delta_H$  2.46 br t) до C-12 и C-13, от H-12 до C-11 ( $\delta_C$  41.0), C-13, C-14 и C-16, от H-10 $\beta$  ( $\delta_H$  2.86 dd) до C-20, както и за C-18 – C-19  $\gamma$ -лактонния пръстен, от H-7 $\beta$  ( $\delta_H$  2.39 dd) до C-5 ( $\delta_C$  55.4), от H-19A ( $\delta_H$  4.80, d) до C-18 и от H-19B ( $\delta_H$  4.49, d) до C-4 ( $\delta_C$  49.2). В COSY спектъра се наблюдават корелации между H<sub>2</sub>-11/H-12, H<sub>2</sub>-11/H-8, H-2 $\beta$ /H-4, H-3 $\alpha$ /H-4.

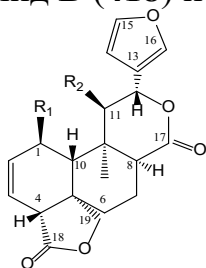
Кетонната група ( $\delta_C$  208.1) е отнесена при C-6 на базата на отместването в слабото поле на сигналите за метиленовите протони H<sub>2</sub>-7 при  $\delta_H$  3.41 t и  $\delta_H$  2.39 dd, които са с по-проста мултиплетна структура от обичайните dt и ddd в дитерпеноиди с хидроксилна група при at C-6, вследствие на липсата на съседни протони при C-6. Този извод се потвърждава от наблюдаваните HMBC корелации до C-6 от протоните H-7 $\alpha$ , H-7 $\beta$ , H-19A и H-19B. Стереохимията на **361** е установена от NOESY експеримента. Корелациите между H-12/1 $\alpha$ , H-12/1 $\beta$ , Me-17/H-14, Me-17/H-16, указват  $\beta$ -конфигурацията на фурановият пръстен. Наблюдаваните взаимодействия на H-4 с H-10 и на H-8 с H-10 показват тяхната копланарност и бяха отнесени в  $\beta$ -позиция. NOESY корелациите на H-1 $\alpha$  с H-19A, на H-7 $\alpha$  с H<sub>3</sub>-17 и H-19B потвърждават  $\alpha$ -ориентацията на тези протони.

Установи се, че <sup>1</sup>H спектралните данни на съединение **361** са идентични с тези докладвани преди от Папанов и Малаков за 6-кетотеускордин. <sup>13</sup>C ЯМР данните на 6-кетотеускордин не са били публикувани до сега, за това те са включени в таблица 16 за да се улесни идентификацията на този дитерпен при последващи изолирания.

### 1.3. Фитохимично изследване на видове от род *Salvia* за наличие на дитерпеноиди

При хроматографиране на горчивата фракция, получена от *Salvia splendens* Ker.-Gawl. събрана в Пловдив, на колона запълнена със силикагел при елуиране

със смес от хексан/ $\text{CHCl}_3$  (градиент от 10 : 2 до 2 : 1), са получени четири фууро-нео-клерода дилак-тонови дитерпеноида – салвиарин (**416**), спленолид А (**417**), спленолид В (**418**) и сплендидин (**419**).



салвиарин (**416**):  $R^1 = R^2 = \text{H}$

спленолид А (**417**):  $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{H}$

спленолид В (**418**):  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OAc}$

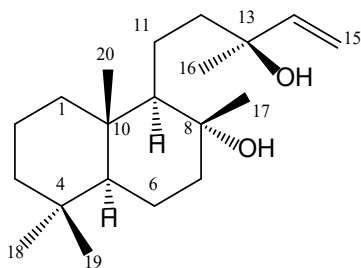
сплендидин (**419**):  $R^1 = R^2 = \text{OAc}$

Структурата на съединенията е доказана чрез сравняване на получените спектралните данни с публикуваните в литературата за тези терпеноиди. ИЧ спектрите на съединенията са в съответствие с наличието на  $\gamma$ -лактон ( $1780\text{-}1754\text{ cm}^{-1}$ ),  $\delta$ -лактон ( $1736\text{-}1714\text{ cm}^{-1}$ ), естерни групи за съединения **418** и **419** ( $1736\text{ br}$ ,  $1729\text{ br}$ ,  $1289$ ,  $1228\text{ cm}^{-1}$ ) и олефинова двойна връзка ( $1653\text{ - }1601\text{ cm}^{-1}$ ). Спектралните  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данни за дитерпените, отнесени с помощта на 2D експериментите - HSQC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY и HMBC, потвърждават структурата и относителната стереохимия на съединенията.  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите на салвиарин, спленолид В и сплендидин са много сходни по между си. Наличието в спектъра на сигнал само за една метилова група (синглет в областта от  $\delta_{\text{H}} 0.97\div 1.02$ ,  $\text{CH}_3\text{-}20$ ) предполага, че въглеродните атоми С-18, С-19 и С-20 са окислени и са включени в състава на  $\gamma$ - и  $\delta$ -лактонен пръстен. Фуроклерода дилактонен скелет с двойна връзка между С-2 – С-3, в пръстен А на декалиновото ядро, лесно се установява от наблюдаваните сигнали в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите при  $\delta_{\text{H}} 5.83\div 5.96$  (1H dddd, H-2) /  $\delta_{\text{C}} 129.2\div 129.6$  (C-2) и  $\delta_{\text{H}} 5.58\div 5.68$  (1H ddd, H-3) /  $\delta_{\text{C}} 121.8\div 122.9$  (C-3) за двойната връзка; при  $\delta_{\text{H}} 6.34\div 6.36$  (1H dd, H-14) /  $\delta_{\text{C}} 108.7\div 108.9$  (C-14), при  $\delta_{\text{H}} 7.35\div 7.36$  (1H t, H-15) /  $\delta_{\text{C}} 144.2\div 144.7$  (C-15), при  $\delta_{\text{H}} 7.40\div 7.43$  (1H dd, H-16) /  $\delta_{\text{C}} 140.0\div 142.1$  (C-16) и при  $\delta_{\text{C}} 121.9\div 125.2$  (C-13) за фурановия пръстен; при  $\delta_{\text{H}} 2.73\div 2.82$  (1H dddd, H-4 $\beta$ ),  $4.20\div 4.32$  (1H d, 19A),  $4.09\div 4.14$  (1H dd, 19B) /  $\delta_{\text{C}} 51.8\div 53.3$  (C-4),  $41.8\div 43.4$  (C-5),  $174.4\div 175.8$  (C-18) и  $\delta_{\text{C}} 70.4\div 70.9$  (C-19) за  $\gamma$ -лактон и при  $\delta_{\text{H}} 5.22\div 5.83$  (1H, dd, H-12 $\beta$ ),  $2.41\div 2.74$  (1H ddd, H-8 $\beta$ ) /  $\delta_{\text{C}} 49.5\div 50.6$  (C-8),  $\delta_{\text{C}} 169.5\div 171.8$  (C-17) и  $\delta_{\text{C}} 70.4\div 71.9$  (C-12) за  $\delta$ -лактон. Съединенията се различават по заместителите при въглеродните атоми С-1 и С-11. В  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите на **416** отсъстват сигнали за ацетатна група и не се наблюдава отместен в слабото поле сигнал за геминален протон на хидроксилна или ацетатна група. В протонния спектър на спленолид А геминалният на хидроксилната група протон Н-1 $\alpha$  резонира при  $\delta_{\text{H}} 4.29$  (1H dddd,  $J = 2.4, 2.0, 2.1, 10.0$ ) и се наблюдава отместен в слабото поле сигнал за въглероден атом свързан с кислород при  $\delta_{\text{C}} 66.15$  (C-1).

В  $^1\text{H}$  ЯМР спектъра на спленолид В (**418**) се явява синглет за три протона при  $\delta_{\text{H}} 1.94$ , отговарящ на резонанс за метилови протони от ацетатна група и отместен в слабото поле сигнал за геминалният на ацетата протон при  $\delta_{\text{H}} 5.14$  (1H d,  $J = 10.8$ , H-11). Съответно в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектъра се явяват допълнителни

сигнали при  $\delta_C$  169.4 ( $\underline{C=O}$ ) и 21.2 ( $\underline{CH_3}$ ). В  $^1H$  ЯМР спектъра на сплендидин (**419**) присъстват два синглета, всеки по за три протона, при  $\delta_H$  2.00 и  $\delta_H$  1.86 отговарящи на две ацетатни групи в молекулата и съответно отместените в слабото поле сигнали за два протона при  $\delta_H$  5.44 (1H dddd,  $J = 2.6, 1.3, 2.6, 9.3$ , H-1) и  $\delta_H$  5.33 (1H d,  $J = 11.2$ ). В  $^{13}C$  ЯМР спектъра се наблюдават допълнителни сигнали при  $\delta_C$  170.4 ( $\underline{C=O}$ ) и 22.2 ( $\underline{CH_3}$ ) и при  $\delta_C$  170.1 ( $\underline{C=O}$ ) и 20.4 ( $\underline{CH_3}$ ). Изолираните от *Salvia splendens* Ker.-Gawl. съединения до сега не са били изолирани от български растителни видове.

От надземните части на *Salvia nemorosa* L. са изолирани две познати съединения,  $\beta$ -ситостерол и лабдановия дитерпеноид склареол (**420**). За съединение **420** е съставена молекулна формула  $C_{20}H_{36}O_2$  кореспондираща с позитивния псевдо молекулен йон пик в HR-ESIMS при  $m/z$  331.2616  $[M+Na]^+$ , (изчислено за  $C_{20}H_{36}O_2Na$ , 331.2613). ИЧ спектърът показва абсорбции за хидроксилни групи при  $3430\text{ cm}^{-1}$  и за олефинова двойна връзка при  $1642\text{ cm}^{-1}$ .



склареол (**420**)

Няма спектрални ивици за карбонилна функционална група което се потвърждава от  $^1H$  ЯМР спектъра.  $^1H$ -broadband-decoupled  $^{13}C$  ЯМР и DEPT-135 спектрите на **420** разкриват сигнали за 20 и съответно 16 въглеродни атоми, 5 за  $CH_3$ , 8 за  $CH_2$ , 3 за  $CH$  групи и 4 за непротонирани C-атоми, което разкрива дитерпеновата природа на веществото. Една  $CH_2$  група резонира при  $\delta_C$  111.2 (C-15) и един

олефинов метин  $CH$  при  $\delta_C$  145.9 (C-14), от което следва наличието в структурата на съединението на винилова група в страничната C-11–C-16 въглеродна верига. Последната група се потвърждава от  $^1H$ - $^1H$  COSY корелациите на сигнала при  $\delta_H$  5.93 (H-14) с  $\delta_H$  5.22 ( $H_{trans}$ -15) и с  $\delta_H$  5.02 ( $H_{cis}$ -15). В допълнение, мултиплетната структура на сигнала при  $\delta_H$  5.93 (1H, dd) показва, че виниловата група е свързана с непротониран въглероден атом C-13. От този извод и от резонанса на C-13 в слабото поле при  $\delta_C$  73.6 следва, че с той е свързан с третична хидроксилна група. Трите олефинови протона хетероколерира в НМВС спектъра с  $\delta_C$  73.6 (C-13). Сигналът при  $\delta_H$  5.93 (H-14) показва допълнително две силни НМВС корелации с  $\delta_C$  44.9 (C-12) и  $\delta_C$  27.2 ( $CH_3$ -16). Сигналите при  $\delta_C$  73.6 и  $\delta_C$  74.8 се дължат на третични въглеродни атоми, свързани с хидроксилна група, което е в съответствие с двата кислородни атома „ $O_2$ “ в молекулната формула. В  $^1H$  ЯМР спектъра се наблюдават само синглети за петте метилови групи, което показва, че те са свързани с непротонирани въглеродни атоми. Три синглета, за четвъртични въглеродни атоми, се явяват при  $\delta_H$  0.78, 0.78, 0.85 и два са изместени в слабото поле, при  $\delta_H$  1.15 ( $H_3$ -17) и 1.27 ( $H_3$ -16), поради геминалните им ОН групи. Последният сигнал показва три силни НМВС корелации до сигналите при  $\delta_C$  145.9 (C-14), 73.6 (C-13) и 44.9 (C-12), както и много слаби до  $\delta_C$  19.1 (C-11) и  $\delta_C$  111.2 (C-15). Всички споменати взаимодействия потвърждават приетата C-13 позиция на една от хидроксилните групи. Друг метилов сигнал при  $\delta_H$  1.15 показва три силни НМВС корелации до  $\delta_C$  74.8 (C-8), 61.5 (C-9) и 44.3 (C-7),

които недвусмислено определят положението на втората хидроксилна група при C-8 и сигнала при  $\delta_c$  1.15 за метиловите протони H<sub>3</sub>-17. Отнасянето на всички протонни сигнали към съответните вълеродни атоми е в съответствие с HSQC експеримента. Химичните отмествания, за непротонираните деекранирани въглеродни атоми, при  $\delta_c$  74.8 (C-8) и 73.6 (C-13) са типични за третични въглеродни атоми, свързани с кислороден атом. На базата на всички 1D- и 2D спектрални данни, за изолираното съединение е отнесена структурата на склареол (**420**). Предложената формула за **420** се потвърждава при сравнение на спектралните  $\delta$  характеристики с публикуваните литературни данни за склареол.

Изследван е ацетоновият екстракт от надземни части на *S. amplexicaulis* LAM. за наличие на дитерпеноиди. Екстракта е разработен по описания обичаен начин. Не е установено наличие на дитерпеноиди.

## **2. Тестване на антифидантната активност на екстракти от видове на род *Scutellaria* и на нео-клероданови дитерпеноиди срещу ларви на *Leptinotarsa decemlineata* Say**

Изследвано е потискането на храненето и възпирането на развитието на ларвите на *Leptinotarsa decemlineata* (Say) от екстракти от осем вида на род *Scutellaria*. Третирането на листа от картофи с малки количества екстракти (концентрация 10 000, 1 000 и 100 ppm, което е доза от 333.33  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 33.33  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  и 3.33  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), показва от добра до много добра активност. Антифидантното действие на екстрактите се отдава на съдържащите се в тях нео-клероданови дитерпеноиди. Коджима и Като подчертават, че присъствието в молекулата на субструктурите тетра- или хексахидро фурофуран, в страничната C-11 – C-16 верига, е предпоставка за значителна активност. Други автори приписват активността на тези вещества на съдържащият се в тях декалинов пръстен с C-4 – C-18 спиро свързан оксиранов пръстен и две ацетатни групи при C-6 и C-19. От изследваните растения в *S. hastifolia* и *S. orientalis* не са открити съединения, които да съдържат тетра- или хексахидро фурофунова част, докато в останалите видове присъстват дитерпени с такива субструктури.

Резултатите от биоанализа (таблица 1) за антифидантна активност на осемте растителни екстракта, срещу ларви на *Leptinotarsa decemlineata*, показват, че повечето от тях показват добро до много добро действие. Както се вижда от таблицата, е установено ниско анти-фидантно действие за екстракта на *S. hastifolia* ( $\text{FR}_{50} = 0.36$  при доза 10 000 ppm), което се дължи на отсъствието на нео-клеродани в този вид. Най-голямо потискащо действие на храненето на ларвите се констатира при екстракта от *S. albida* ( $\text{FR}_{50} = 0.04$ ), и се наблюдава значим ефект при концентрация 100 ppm ( $\text{FR}_{50} = 0.22$ ). С много добра активност са екстрактите от *S. altissima* ( $\text{FR}_{50} = 0.08$ ) и *S. galericulata* ( $\text{FR}_{50} = 0.08$ ) следвани от *S. alpina* ( $\text{FR}_{50} = 0.13$ ). Екстрактите от *S. columnae* ( $\text{FR}_{50} = 0.19$ ) и *S. velenovskyi* ( $\text{FR}_{50} = 0.21$ ) проявяват умерен ефект. Интересно е, че екстрактът от *S. alpina* не показва пълно инхибиране на храненето при 10 000 ppm, но запазва

висока активност при 1 000 и 100 ppm. Това се обяснява с по-голямото количество *нео*-клероданови дитерпеноиди в този вид. Постигнатите при това изследване резултати са добра обосновка за провеждане на фитохимични изследвания на представители на род *Scutellaria* в търсене на нови *нео*-клероданови инсект-антифиданти.

Изследван е антифидантният ефект, при условия на хранене с избор, на седем природни *нео*-клероданови дитерпена, изолирани от *Scutellaria alpina* (скуталпин А, **384**; скуталпин Е, **385**; скуталпин F, **386**; скуталпин О, **43**) и *Salvia splendens* (салвиарин, **416**; спленолид В, **418**; сплендидин, **419**). За стандарт е използван скутекипрол А (**42**) – съединение известно с високата си антифидантна активност. От изследваните съединения, скуталпин О (**43**) има много близка структура със стандарта скутекипрол А (**42**). Единствената разли-

Таблица 1. Коефициенти на хранене (FR) на тестваните екстракти

екстракти	Доза (ppm)	N	FR <sub>50</sub> ± SE	FR <sub>75</sub> ± SE
<i>S. alpina</i>	10 000	6	0.13 ± 0.01	0.19 ± 0.02
	1 000	6	0.16 ± 0.02	0.21 ± 0.02
	1 00	5	0.30 ± 0.06	0.33 ± 0.05
<i>S. galericulata</i>	10 000	6	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.02
	1 000	5	0.36 ± 0.07	0.38 ± 0.01
	100	5	0.56 ± 0.02	0.60 ± 0.03
<i>S. altissima</i>	10 000	6	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.03
	1 000	5	0.32 ± 0.03	0.34 ± 0.03
	100	5	0.43 ± 0.04	0.49 ± 0.02
<i>S. albida</i>	10 000	6	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.01
	1 000	5	0.10 ± 0.05	0.17 ± 0.08
	100	5	0.22 ± 0.03	0.30 ± 0.04
<i>S. columnae</i>	10 000	5	0.19 ± 0.02	0.27 ± 0.04
	1 000	4	0.47 ± 0.05	0.52 ± 0.02
	100	4	0.55 ± 0.04	0.57 ± 0.02
<i>S. velenovskyi</i>	10 000	4	0.21 ± 0.03	0.31 ± 0.05
	1 000	4	0.41 ± 0.03	0.46 ± 0.04
	100	4	0.59 ± 0.06	0.63 ± 0.04
<i>S. orientalis</i>	10 000	3	0.28 ± 0.03	0.36 ± 0.05
	1 000	3	0.39 ± 0.01	0.51 ± 0.02
	100	3	0.63 ± 0.04	0.68 ± 0.04
<i>S. hastifolia</i>	10 000	3	0.36 ± 0.04	0.41 ± 0.06
	1 000	3	0.49 ± 0.02	0.56 ± 0.04
	100	3	0.68 ± 0.03	0.75 ± 0.05

N - брой повторения, SE – стандартна грешка, FR = CTD/CCD x 100%, (CTD и CCD представляват консумираните площи от третираните и контролните дискове)

ка е заместването на ацетатната група при С-19 с метилбутиратна. Останалите 6 съединения принадлежат към две ясно различими от структурна гледна точка групи: фууро-*нео*-клеродан дилактонови производни (**416**, **418**, **419**) и *нео*-клероданови дитерпени с 13-спиро-γ-лактонен пръстен свързан с β → α връзка с перхидро-пиранозен пръстен (**384** - **386**).

Всички тествани природни дитерпеноиди (табл. 2) показват много добро възпиране на ларвите на *Leptinotarsa decemlineata* Say да се хранят при доза от 1000 ppm (≈33 μg / cm<sup>2</sup>). Съединение (**43**) показва най-силно действие от

всички тествани вещества и поддържа висока активност при 30 ppm, което се отдава на присъствието на характеристичните структурни фрагменти като при стандартното съединение **42**. Различната антифидантна активност в двете групи съединения **384 - 386** и **416, 418, 419** е свързана с техните заместители, тъй като веществата в тях имат еднакви въглеродни скелети. В групата от съединения **416, 418** и **419**, заместването на един или два водорода при C-1 и C-11 с ацетокси група води до по-висока активност. В групата от съединения **384 - 386** активността намалява, когато 2-метилбутиратната група при C-6 в дитерпена **384** е заместена с (E)-2-метил-2-бутеноилокси група в клеродана **385** и се увеличава, когато е заместена с ацетокси група при **386**, съответно. Двете различни основни структури (серии **416, 418, 419** и **384 - 386**) показват сходни коефициенти на хрананене. В първата серия най-висока е активността на сплендидин (**416**), а във втората на скуталпин F (**386**). От постигнатите резултати се вижда, че висока антифидантна активност проявяват неоклеродани с хексахидро фурофуранов пръстен в C-11 – C-16 страничната верига и с декалинов пръстен, в C-1–C-10 подструктурата, носещ 4 $\alpha$ ,18-оксиран и две естерни групи при C-6 и C-19. Голяма е активността и на дитер-

Табл. 2. Коефициенти на хрананене на клеродани изолирани от *Scutellaria alpina* и *Salvia splendens*

Съединение	Доза (ppm)	N	FR <sub>50</sub> ± SE	FR <sub>75</sub> ± SE
<b>42</b>	1000	5	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01
	300	5	0.03 ± 0.05	0.04 ± 0.04
	30	6	0.05 ± 0.06	0.07 ± 0.03
<b>ов43</b>	1000	5	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01
	300	5	0.03 ± 0.05	0.04 ± 0.04
	30	6	0.05 ± 0.06	0.07 ± 0.03
<b>384</b>	1000	5	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	300	5	0.05 ± 0.04	0.05 ± 0.02
	30	5	0.07 ± 0.02	0.04 ± 0.02
<b>385</b>	1000	5	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.02
	300	5	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.03
	30	5	0.07 ± 0.06	0.08 ± 0.03
<b>386</b>	1000	5	0.08 ± 0.06	0.11 ± 0.05
	300	5	0.14 ± 0.21	0.19 ± 0.03
	30	5	0.24 ± 0.01	0.32 ± 0.00
<b>416</b>	1000	5	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.02
	300	5	0.12 ± 0.03	0.16 ± 0.02
	30	5	0.20 ± 0.08	0.23 ± 0.01
<b>417</b>	1000	5	0.07 ± 0.04	0.10 ± 0.03
	300	5	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.05
	30	5	0.16 ± 0.05	0.21 ± 0.05
<b>418</b>	1000	5	0.08 ± 0.05	0.10 ± 0.05
	300	5	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.03
	30	5	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.05
<b>419</b>	1000	5	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	300	5	0.07 ± 0.03	0.10 ± 0.03
	30	6	0.10 ± 0.06	0.12 ± 0.05
<b>ацетон</b>		6	0.50 ± 0.01	0.75 ± 0.01



пени с  $\alpha$ ,  $\beta$ -ненаситен  $\gamma$ -лактонов пръстен или с 13-спиро-свързан  $\gamma$ -лактонов пръстен с перхидро пиранозен пръстен в C-11–C-16 частта на молекулата, както и съединения с  $\gamma$ -лактон сключен между C-18–C-19 в декалиновото ядро. Поради недостатъчно данни не може да се определи влиянието на конфигурацията на C-13 в съединения **384** и **386** спрямо **385**.

Единадесет природни *нео*-клероданови дитерпеноида (табл. 3), изолирани от *Scutellaria galericulata*, са тествани за инсект-антифидантна активност срещу ларви на *Leptinotarsa decemlineata* Say, при опити с хранене по избор. Девет от съединенията са в индивидуално състояние - skutalbin A (**9**), 14,15-дихидроджодрелин Т (**22**), скутеколумнин С (**23**), скутегалин А (**27**), скутегалин D (**155**), скутегалерин А (**398**), *нео*-аюгапирин А (**399**), скутегалерин В (**400**) и скутегалерин Е (**403**), а две образуват епимерна смес при C-16, скутегалерин С (**401**) и скутегалерин D (**402**). Всички, тествани *нео*-клероданови дитерпеноиди притежават 2 $\alpha$ ,19-полуацетална или ацетална функция в декалиновия пръстен, C-4–C-18 спиро епоксид и ацетатна група при въглерод C-6. В подструктурата C-11–C-16 на седем клеродана се съдържа хексахидро фуро[2,3-*b*]фуранов пръстен, а в съединение **9**, пръстена е тетрахидро фуруранов.

Табл. 3. Коефициенти на хранене на клероданови дитерпени изолирани от *Scutellaria galericulata*

Съединение	Доза (ppm)	N	FR <sub>50</sub> ± SE	FR <sub>75</sub> ± SE
14,15-дихидроджодрелин Т ( <b>22</b> )	1000	3	0.03 ± 0.00	0.04 ± 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 ( <b>399</b> )	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 ( <b>398</b> )	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 ( <b>400</b> )	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 ( <b>401</b> )	1000	5	0.30 ± 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 ( <b>403</b> )	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 ( <b>23</b> )	1000	3	0.14 ± 0.03	0.20 ± 0.03
	100	3	0.25 ± 0.10	0.29 ± 0.12
	10	5	0.59 ± 0.14	0.43 ± 0.11
скутегалин А ( <b>27</b> )	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 ( <b>155</b> )	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
skutalbin А ( <b>9</b> )	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

В дитерпените **155**, **401** и **402** присъства полуацетал или ацетал между C-15 и C-16. Отделните съединения се различават помежду си с промяната на заместителя при C-19, хидрокси (ОН), ацетокси (ОAc), метокси (OMe), E-2-

метил-2-бутеноилокси (OTig) група. Допълнителен заместител в някои дитерпени е наличен при С-1, С-3 и С-7. Съединенията **398** и **399** са позиционни изомери, докато **401** и **402** са епимери при С-16. Данните за антифидантната активност (таблица 3) показват, че повечето от тестваните природни дитерпеноиди действат като мощни репресори на храненето на ларвите на Колорадския бръмбар ( $FR_{50} \approx 0.1$ ) при доза 1000 ppm ( $33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), с изключение на съединенията **155**, **401** и **402**. Ниската активност на тези три клеродана се отдава на липсата на фурофуранова С-11–С-16 подструктура в основния клероданов скелет.

Някои от веществата запазват силна активност при доза от 100 ppm ( $3.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). От позиционните структурни изомери - скутегалерин А (**398**) и нео-Таблица 4. Коефициенти на хранене на нео-клероданови дитерпени изолирани от *Scutellaria altissima*.

Съединение	Доза (ppm)	N	$FR_{50} \pm SE$	$FR_{75} \pm SE$
клеродин ( <b>1</b> )	1000	7	$0.03 \pm 0.02$	$0.05 \pm 0.02$
	100	7	$0.11 \pm 0.03$	$0.17 \pm 0.05$
	10	5	$0.33 \pm 0.10$	$0.39 \pm 0.08$
скуполин Н ( <b>10</b> )	1000	5	$0.11 \pm 0.02$	$0.15 \pm 0.03$
	100	5	$0.26 \pm 0.03$	$0.32 \pm 0.05$
	10	5	$0.39 \pm 0.08$	$0.48 \pm 0.09$
скутекипрол А ( <b>42</b> )	1000	6	$0.09 \pm 0.01$	$0.14 \pm 0.02$
	100	5	$0.18 \pm 0.03$	$0.25 \pm 0.05$
	10	5	$0.34 \pm 0.06$	$0.44 \pm 0.07$
скутеколумнин С ( <b>23</b> )	1000	5	$0.11 \pm 0.06$	$0.16 \pm 0.05$
	100	5	$0.27 \pm 0.08$	$0.34 \pm 0.10$
	10	5	$0.53 \pm 0.11$	$0.71 \pm 0.09$
11-епи-скутеколумнин С ( <b>28</b> )	1000	7	$0.05 \pm 0.02$	$0.09 \pm 0.01$
	100	7	$0.13 \pm 0.07$	$0.21 \pm 0.08$
	10	6	$0.38 \pm 0.04$	$0.46 \pm 0.06$
скуталтисин А ( <b>52</b> )	1000	7	$0.08 \pm 0.03$	$0.12 \pm 0.04$
	100	6	$0.22 \pm 0.07$	$0.29 \pm 0.11$
	10	6	$0.33 \pm 0.14$	$0.41 \pm 0.10$
скуталтисин В ( <b>392</b> )	1000	7	$0.07 \pm 0.04$	$0.11 \pm 0.06$
	100	6	$0.27 \pm 0.10$	$0.30 \pm 0.08$
	10	6	$0.48 \pm 0.11$	$0.69 \pm 0.12$
скуталтисин С ( <b>393</b> )	1000	5	$0.14 \pm 0.04$	$0.17 \pm 0.06$
	100	5	$0.32 \pm 0.10$	$0.38 \pm 0.08$
	10	5	$0.66 \pm 0.11$	$0.81 \pm 0.12$
скуталтисин D ( <b>394</b> )	1000	5	$0.10 \pm 0.02$	$0.13 \pm 0.07$
	100	5	$0.18 \pm 0.10$	$0.22 \pm 0.13$
	10	5	$0.40 \pm 0.12$	$0.52 \pm 0.14$
скуталтисин E ( <b>395</b> )	1000	6	$0.09 \pm 0.01$	$0.11 \pm 0.03$
	100	6	$0.15 \pm 0.09$	$0.23 \pm 0.04$
	10	5	$0.40 \pm 0.08$	$0.59 \pm 0.10$
скуталтисин F ( <b>396</b> )	1000	6	$0.09 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.03$
	100	5	$0.16 \pm 0.06$	$0.20 \pm 0.10$
	10	5	$0.42 \pm 0.10$	$0.61 \pm 0.11$
скуталтисин G ( <b>397</b> )	1000	5	$0.32 \pm 0.04$	$0.42 \pm 0.08$
	100	5	$0.50 \pm 0.05$	$0.67 \pm 0.11$
	10	5	$0.81 \pm 0.10$	$0.98 \pm 0.12$
скутекиприн ( <b>25</b> )	1000	7	$0.06 \pm 0.01$	$0.09 \pm 0.03$
	100	7	$0.13 \pm 0.03$	$0.19 \pm 0.05$
	10	6	$0.36 \pm 0.09$	$0.41 \pm 0.08$
скуполин I ( <b>59</b> )	1000	5	$0.13 \pm 0.04$	$0.17 \pm 0.09$
	100	5	$0.19 \pm 0.10$	$0.24 \pm 0.13$
	10	5	$0.44 \pm 0.12$	$0.54 \pm 0.14$

аюгапирин А (399), по-голяма активност показва първият. Съединение 398 е с най-силна активност сред тестваните нео-клероданови дитерпеноиди след 14,15-дихидродрождрелин Т (22), от който се отличава по заместителя при С-1, хидроксилна вместо тиглатна естерна група.

Тествана е инсект-антифидантната активност на четиринадесет нео-клероданови дитерпеноида изолирани от *S. altissima*: клеродин (1), скуполин Н (10), скутекипрол А (42), скутеколумнин С (23), 11-*enu*-скутеколумнин С (28), скуталтисин А (скуталбин С, 52), скуталтисин В (392), скуталтисин С (393), скуталтисин D (394), скуталтисин Е (395), скуталтисин F (396), скуталтисин G (397), скуполин I (59), и скутекиприн (25) срещу ларви на *Leptinotarsa decemlineata* Say. Използването на дискове от картофени листа, третирани с малкиколичества от съединенията (доза от 1000, 100, 10 ppm) води до добра и много добра антифидантна активност (табл. 4). Клеродин (1), скутекиприн (25) и 11-*enu*-скутеколумнин С (28) показват силно инхибиране на храненето на ларвите при доза от 1000 ppm и проявяват значителна антифидантна активност при доза 100 ppm. Всичките четиринадесет изследвани нео-клеродановии дитерпеноиди притежават С-4–С-18 спироепоксид и ацетатна група в  $\alpha$ -позиция при С-6 в декалиновия пръстен. В дванадесет от тях присъства 2 $\alpha$ ,19-хемиацетална или ацетална функция, която не е структурна черта само в скутекипрол А (42) и в клеродин (1). Шестте атома от страничната верига С-11–С-16 образуват много често срещания в клероданите, изолирани от видовете *Scutellaria*, тетра- или хексахидро фуро-[2,3-*b*]-фуранов пръстен, с изключение на скуталтисин G (397), в който присъства лактолов пръстен склучен между С-15–С-16, както е докладвано за скутерепиносидите А<sub>1</sub>-А<sub>4</sub> (158-161). Въглеродният атом С-11 приема необичайната R-конфигурация в клероданите 11-*enu*-скутеколумнин С (28) и скуталтисин С (393). С изключение на тези две съединения, само в 11-*enu*-скутекиприн (29), изолиран от Малаков и Папанов, С-11 е с R-конфигурация. Скуталтисин Е (395) и скуталтисин F (396) са С-15 епимери, докато двойките съединения скутеколумнин С (23)/11-*enu*-скутеколумнин С (28) и скуталтисин В (392)/скуталтисин С (393) са С-11 епимери. Резултатите от биологичните тествания показват, че тестваните дитерпеноиди проявяват много добра до отлична (FR<sub>50</sub> < 0.1) антифидантна активност спрямо ларвите на *L. decemlineata* при доза от 1000 ppm (~ 33  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), с изключение на скуталтисин G (397). Слабото потискане на храненето на ларвите от съединение 397 може да бъде отдадено на отсъствието на фурофурановата субструктура в С-11–С-16 фрагмента на основния клероданов скелет. Биологичните тестове показват разлика в резултатите за епимерните двойки при С-11 и при С-15. Изомерите 28 и 392 с С-11 R-конфигурация проявяват по-голяма активност от изомерите с С-11 S-конфигурация (23 и 393), докато съединенията с различна стереохимия при С-15 (395 и 396) показват близка активност. Може да се заключи, че стереохимията при С-15 е структурна характеристика на молекулата, която не оказва влияние на биологичната активност, докато епимерите при С-11 показват забележима разлика в антифидантното си действие. Също така може да се види, че антифидантното

действие намалява при вещества с метоксилна вместо хидроксилна или естерна група при С-15 или С-19.

Тествана е антифидантната активност на десет дитерпеноида, изолирани от два вида на род *Teucrium* – *polium* и *scordium* (таблица 5). Скордидесин А (415), теукрин А (356), 3 $\alpha$ -ацетокси-теуквин (414) са с *нор*-клероданов скелет, а останалите съединения са *нео*-клероданови дитерпеноиди. Всички тествани клеродани съдържат фуранов пръстен във С-11-С-16 страничната верига. В теуламифин В (289) е образуван  $\delta$ -лактон, в който участват С-5, С-9, С-10, С-19 и С-20 въглеродните атоми. Във всички други тествани терпеноиди присъства  $\gamma$ -лак-тон, включващ въглеродните атоми С-9, С-11, С-12 и С-20. В поливинцин В (410) и теуполин XII (317) е сключен ацетал между С-18 – С-19. В поливинцин А (409)

Таблица 5. Коефициенти на хранене на клеродани, изолирани от *T. polium* и *T. scordium*

Съединение	Доза (ppm)	N	FR <sub>50</sub> ± SE	FR <sub>75</sub> ± SE
поливинцин А (409)	1000	3	0.15 ± 0.04	0.20 ± 0.05
	100	5	0.22 ± 0.04	0.28 ± 0.03
	10	5	0.31 ± 0.09	0.42 ± 0.10
поливинцин В (410)	1000	3	0.23 ± 0.03	0.32 ± 0.06
	100	5	0.31 ± 0.08	0.43 ± 0.11
	10	5	0.46 ± 0.10	0.49 ± 0.12
поливинцин С (411)	1000	3	0.32 ± 0.04	0.39 ± 0.07
	100	5	0.37 ± 0.07	0.44 ± 0.03
	10	5	0.43 ± 0.12	0.47 ± 0.07
теуламифин В (289)	1000	3	0.31 ± 0.05	0.37 ± 0.04
	100	5	0.37 ± 0.07	0.46 ± 0.07
	10	5	0.43 ± 0.10	0.49 ± 0.11
теуполин XII (317)	1000	3	0.25 ± 0.06	0.29 ± 0.08
	100	5	0.30 ± 0.11	0.42 ± 0.10
	10	5	0.38 ± 0.13	0.49 ± 0.12
6-ацетилтеукрин F (412)	1000	3	0.15 ± 0.04	0.23 ± 0.05
	100	5	0.21 ± 0.04	0.29 ± 0.03
	10	5	0.30 ± 0.09	0.37 ± 0.10
теукрин Е ацетат (413)	1000	3	0.16 ± 0.03	0.24 ± 0.06
	100	5	0.22 ± 0.08	0.31 ± 0.11
	10	5	0.32 ± 0.10	0.39 ± 0.12
3 $\alpha$ -ацетокси-теуквин (414)	1000	3	0.10 ± 0.04	0.18 ± 0.07
	100	5	0.17 ± 0.07	0.21 ± 0.03
	10	5	0.26 ± 0.12	0.37 ± 0.07
скордидесин А (415) / теукрин А (356)	1000	3	0.12 ± 0.05	0.18 ± 0.04
	100	5	0.19 ± 0.07	0.25 ± 0.07
	10	5	0.28 ± 0.10	0.29 ± 0.11
6-кетотеускордин (361)	1000	3	0.13 ± 0.06	0.20 ± 0.08
	100	5	0.20 ± 0.11	0.27 ± 0.10
	10	5	0.29 ± 0.13	0.35 ± 0.12

е образуван оксетанов пръстен включващ въглеродите С-4, С-5 и С-19. В клеродановия пръстен на съединенията скордидесин А (415), теукрин А (356) и 3 $\alpha$ -ацетокси-теуквин (414) присъства  $\alpha,\beta$ -ненаситен С-18 – С-6  $\gamma$ -лактон, а в 6-кето-теускордин (361), 6-ацетилтеукрин F (412) и теукрин Е ацетат (413) наситен С-18–С-19  $\gamma$ -лактон. В клеродана 412 е налична рядко срещаната  $\Delta^{2,3}$  двойна връзка. Както е показано в таблица 21, всички тествани дитерпеноиди проявяват добро възпиране на храненето на ларвите на *Leptinotarsa decemlineata* Say. с FR<sub>50</sub> < 0,3 при доза от 1000 ppm (~ 33  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) с изключение на съединения 289 и 411. В *нео*-клеродана 289 С-20 – С-12  $\gamma$ -лак-лактонът е

заменен с С-19 – С-20  $\delta$ -лактон. И в двата *нео*-клеродана липсва втори лактонен пръстен както и ацетален или оксетанов пръстен.

Изследвано е потискането на храненето и възпирането на развитието на ларвите на *Leptinotarsa decemlineata* (Say) от екстракти на осем вида на род *Scutellaria* и на 43 *нео*-клероданови дитерпеноида изолирани от видове на род *Scutellaria* - 30 клеродана, от *Salvia splendens* - 3 клеродана и от представителите на род *Teucrium* – 10 клеродана. Последните 13 съединения са фууро-*нео*-клероданови лактони. Във всичките тествани дитерпени, от видове на род *Scutellaria*, се съдържа  $4\alpha,18$  спиро свързан оксиранов пръстен. В 23 клеродана е заключен  $2\alpha,19$  полуацетален или ацетален пръстен. Съединенията се различават по заместителите в клеродановото ядро при С-1, С-3, С-6, С-7 и С-19 и по подструктурите в С-11 – С-16 страничната верига. В три *нео*-клеродана (**1**, **9**, **10**) е представен тетраhydro фуурофуранов пръстен, в 21 хексахидро фуурофуранов, в три дитерпена (**384**, **385**, **386**) е образуван спиро-свързан  $\gamma$ -лактон (в **384** и **386** с 13S и в **385** с 13R конфигурация), а в четири (**155**, **397**, **401**, **402**) лактолов пръстен – полуацетал в клеродана **155** и ацетал в съединения **397**, **401** и **402**.

Получените резултати потвърждават изказаната теза от Kojima и Kato, че наличието в структурата на дитерпена на декалиново ядро носещо  $4\alpha,18$  спиро свързан епоксид и естерни групи при С-6 и С-19 е предпоставка за мощно действие като инсект-антифидант. От друга страна, много добър антифидантен ефект с  $FR_{50}$  стойност от 0.03, се наблюдава при дитерпеноидите скуталпин А (**384**) и сплендидин (**419**). Във С-11 – С-16 подструктурата на **384** е образуван  $\gamma$ -лактон спиро-свързан при С-13 със С-8 – С-13 оксанов пръстен, а в **419** са заключени фуранов пръстен между С-15 – С-16,  $\delta$ -лактонен пръстен между С-12–С-17 и в допълнение е образуван С-18 – С-19 в декалиновото ядро вместо оксиранов пръстен и ацетатна група. Активността на клероданите изолирани от представители на род *Teucrium* е по-слаба от тази на съединенията изолирани от родовете *Scutellaria* и *Salvia*. Намалването на активността се дължи на замяната на фуурофурановата функция или 13-спиро-свързания  $\gamma$ -лактон с фураново ядро в клероданите изолирани от род *Teucrium*.

### 3.3. Тестване на антимикробната активност на клероданови дитерпеноиди срещу патогенни и хигиенно-индикаторни микроорганизми

Изследвана е противомикробната активност на двадесет и два клероданови дитерпеноида, изолирани от ацетоновите екстракти от надземните части на видове от род *Scutellaria*, *Salvia* и *Teucrium* (Lamiaceae), срещу деветнадесет щамове, принадлежащи към единадесет различни вида патогенни бактерии в хранителни продукти, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgari*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella abony* и *Staphylococcus aureus*, както и срещу два щамове дрожди, принадлежащи към видове на *Candida albicans*.

Три от изследваните съединения скуталпин А (**384**), скуталпин Е (**385**), скуталпин F (**386**) проявяват умерена антимикробна активност (табл. 6) срещу използваните при тестовете микробни щамове. Дитерпените съдържащи

фураново ядро, **345, 356, 415, 416, 417, 418, 419**, проявяват слаба активност. Останалите съединения са неактивни в рамките на изследваните концентрационни граници. Сред всички тествани съединения е установена най-висока антимикробна активност за скуталпин А срещу *Staphylococcus aureus* (MIC 25 µg/mL). Нео-клероданови дитерпеноиди съдържащи тетра- или хексахидро фуро-[2,3-b]-фуран в С-11–С-16 страничната верига не проявяват антибактериална и антикандидална активност. С най-добра активност от изследваните съединения са клероданите съдържащи спиро-свързани при С-13 γ-лактонен и оксанов пръстени.

На основа на получените резултати може да се заключи, че различните видове биологични дейности се дължат на различни химични функции в структурата на съединенията и поради тази причина няма корелация между антифидантната, антимикробната и противогъбичната активност на едно и също изследвано съединение.

Таблица 6: Антимикробна активност на клероданови дитерпени срещу патогенни и хигиенно-индикаторни микроорганизми

Тествани микроорганизми	Източник	MIC, µg/mL								
		384	385	386	416	417	418	419	356/315	445
<i>B. cereus</i>	Minced meat	50	100	100	200	200	200	200	-	-
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	25	50	50	100	100	200	200	-	-
<i>S. aureus</i>	ATCC 1805	-	-	-	-	-	-	-	500	500
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 12344	-	-	-	-	-	-	-	250	250
<i>L monocytogenes</i>	ATCC 8632	-	-	-	-	-	-	-	500	500
<i>E. coli</i>	ATCC 3397	-	-	-	-	-	-	-	500	500
<i>S.aureus</i>	Pork fillet	25	50	50	100	100	200	200	-	-
<i>L.monocytogenes</i>	Chicken breasts	100	200	200	200	200	200	200	-	-
<i>A.hydrophila</i>	Fish	100	200	200	200	400	400	400	-	-
<i>E.coli</i>	ATCC 25922	200	400	400	400	400	800	800	-	-
<i>E.coli</i>	Clinical isolate	200	400	400	400	400	800	800	-	-
<i>S. abony</i>	ATCC 6017	200	400	400	400	400	800	800	500	500
<i>S. abony</i>	Clinical isolate	200	400	400	400	400	800	800	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	ATCC 27853	400	800	800	800	800	800	800	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	Clinical isolate	400	800	800	800	800	800	800	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	Minced meat	400	800	800	800	800	800	800	-	-
<i>P.fluorescens</i>	Chicken breasts	400	800	800	800	800	800	800	-	-
<i>C.albicans</i>	ATCC10231	100	200	200	200	200	400	400	1000	1000
<i>C. glabrata</i>	ATCC 90030	-	-	-	-	-	-	-	1000	1000
<i>C.albicans</i>	Clinical isolate	100	200	200	200	200	400	400	-	-

Както се вижда от таблица 6 сред антимикробно активните съединения, скуталпин А се характеризира с най-силна антибактериална и антикандидална активност, последвано от скуталпин Е и скуталпин F, салвиарин и спленолид А, спленолид В и сплендидин. Много вероятно е спиро свързаният γ-лактон да е отговорен за по-високата антимикробна активност на съединения **384-386** в сравнение със съединения **416-419**, съдържащи фуранов пръстен. Съединения **384-386** се различават по заместителя при С-6. Най-активното вещество скуталпин А, което съдържа метилбутират при С-6, показва по-висока

активност в сравнение със скуталпин Е и скуталпин F, които съдържат съответно тиглатен и ацетатен естер. Съединения **416-419** се характеризират с почти еднаква антимикуробна активност, което означава, че видът заместители при С-1 и С-11 изглежда не оказва влияние върху антимикуробната активност на тези съединения.

### 3.4. Тестване на цитотоксичната активност на изолирани *нео*-клероданови дитерпеноиди спрямо канцерогенни клетки от тумори по белите дробове (H1299) и нормални клетки от пъпна връв (HUVES)

Дванадесет природни *нео*-клероданови дитерпеноида, 14,15-дихидроджодрелин **Г (22)**, *нео*-аюгапирин **А (399)**, скутегалерин **А (398)**, скутеколумнин **С (23)** и скутегалин **Д (155)** изолирани от *Scutellaria galericulata L.*; скутекипрол **А (42)**, скуполин **Н (10)**, клеродин **(1)** и скуталтисин **Г (397)** получени от *Scutellaria altissima L.*; скуталпин **А (384)**, скуталпин **Е (385)** и скуталпин **F (386)** изолирани от *S. alpina*; са тествани за цитотоксичност срещу две клетъчни линии, карциногенни клетки от човешки тумори на белите дробове, означени като H1299 и нормални клетки от пъпна връв (HUVES), използвайки МТТ (3-/4,5-диметилтиазол-2-ил/-2,5-дифенил тетра-золиев бромид) анализа. В съответствие с целта на изследването съединенията са разделени по два признака: **1.** според функционалните заместители в декалин-новото ядро на две групи, **А** - съдържащи 2 $\alpha$ ,19 полуацетал или ацетал и **В** - лишени от 2 $\alpha$ ,19 кислороден мост; **2.** въз основа на представените С-11–С-16 подструктури, клероданите са разделени на четири групи **I-IV**. Отнасянето на дитерпените към групи **I-III** е същото както направеното при анализа на антимикуробната активност. В съединения **155** и **397**, образуващи група **IV**, е образуван С-15–С-16 лактолен пръстен. Отделните съединения се различават едно от друго и по заместителите при позициите С-1, С-3, С-6, С-7, С-16 и С-19.

Цитотоксичната активност на *нео*-клеродановите дитерпеноиди е оценена като IC<sub>50</sub> стойност (табл. 7). Три съединения, скуталпини А, Е и F, проявяват слаба до умерена цитотоксичност срещу двете клетъчни линии. Сред всички тествани съединения най-висока активност е установена за скуталпин **А (384)**, с IC<sub>50</sub> стойности от 21.35 и 23.9.

Останалите съединения са неактивни в рамките на изследваните концентрационни граници. В молекулите на трите съединения проявяващи цитотоксичен ефект е представен 13-спиро свързан  $\gamma$ -лактон с С-8–С-13 оксанов пръстен. Дитерпеноидите се различават помежду си по стереохимията на С-13 и по заместителя при въглерод С-6.

Таблица 7. Цитотоксична активност на *нео*-клеродани срещу H1299 и HUVES клетъчни линии

Съединение	IC <sub>50</sub> values		Съединение	IC <sub>50</sub> values	
	H1299	HUVES		H1299	HUVES
<b>22</b>	242.21	244.43	<b>1</b>	236.35	236.84
<b>399</b>	288.65	287.59	<b>384</b>	21.35	23.89
<b>398</b>	452.01	458.00	<b>386</b>	26.62	31.28
<b>23</b>	667.44	665.79	<b>385</b>	34.24	32.48
<b>42</b>	335.76	365.32	<b>155</b>	888.35	883.47
<b>10</b>	578.71	574.55	<b>397</b>	892.02	892.22

Най-активният сред тях скуталпин А (**384**), съдържа 2-метилбутират, докато по-малко активните скуталпин F (**386**) (с IC<sub>50</sub> стойности от 26.62 и 31.28) и скуталпин E (**385**) (с IC<sub>50</sub> стойности от 34.24 и 32.48) 2-метилбутиратът е заместен с ацетатен и с (E) 2-метил-2-бутенолатен (тиглатен) естер. Не е сигурно, че само промяната на функцията 2-метилбутират с тиглатна причинява по-голямо намаление в активността на клеродана **385** отколкото при **386**, тъй като конфигурацията на асиметричния център C-13 в дитерпена **386** е S, както в най-активното съединение **364**, докато в *нео*-клеродановият дитерпеноид **365** конфигурацията на хиралният център C-13 е R.

#### 4. Изолране и охарактеризиране на други вторични метаболити

##### 4.1. Определяне на химичния състав на етеричното масло на *A. laxmanii* Benth, *S. amplexicaulis* Lam., и *Stachys cretica* subsp. *bulgarica* Rech. fil.

Анализиран е химическият състав на етеричните масла от български растения от семейство Lamiaceae - *Salvia amplexicaulis* Lam., *Ajuga laxmanii* Benth. и *Stachys cretica* subsp. *bulgarica* Rech. fil. Паралелно са изследвани надземни части от *Salvia amplexicaulis* Lam. и *Ajuga laxmanii* Benth. Установената влага в дрогата от *S. amplexicaulis* е 11.80 %, а за *A. laxmanii* – 10.99 %. Добивът на етерично масло, % в абсолютно суха маса е съответно 0.08 % и 0.02 %. От химичните съставки на маслото от *S. amplexicaulis* са идентифицирани 26 компонента, представляващи 85.5% от общото съдържание. От тях 22 са в концентрации над 1%, а останалите 4 компонента са в концентрации под 1 %. Съставките на маслото в количество над 3 % са,  $\gamma$ -муролен (29.20%); наонадекан (5.58%), хенеикозан (5.48%), спатуленол (5.14%), аромадендренов оксид-2 (4.09%) и октадекан (3.57%). От *A. Laxmanii* са идентифицирани 27 съединения, представляващи 86.32% от общото съдържание в маслото, 18 от тях са в концентрации над 1%, а останалите 9 са в концентрации под 1%. Основните съставки (над 3%) от маслото са ейкозан (11.21%), фитол (7.25%), хексахидро фарнезилацетон (7.34%), октадекан (7.02%), хеникозан (6.57%), тетракозан (4.97%), E-2-хексенил бензоат (4.09%), хептакозан (3.94%), трикозан (3.71%), пентакозан (3.63%), кариофилен оксид (3.61%), 7-изопропил-1,1,4а-триметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октахидро фенантрен (3.54%) и докозан (3.15%). Резултатите се различават от данните за тези видове на род *Salvia* от Сърбия и от род *Ajuga* от Турция. Разликата в химичния състав на проведените изследвания и публикуваните данни вероятно се дължи на почвено-климатичните различия на околната среда, при които растението е израснало, както и на различия в апаратурата и условията на анализа.

Сескитерпеновите въгледороди (48.01%) са доминираща група в маслото от *S. amplexicaulis*, следвани от въгледороди (30.11%), оксигенирани сескитерпени (18.01%), фенил пропаноиди (2.92%) и кислородни производни на въгледородите (0.95%).

Въгледороди (55.34%) са доминиращата група в маслото от *Ajuga laxmanii*, следвани от кислород съдържащите сесквитерпени (15.23%), фениловите пропаноиди (8.84%), дитерпените (8.40%), кислородни производни на въгле-



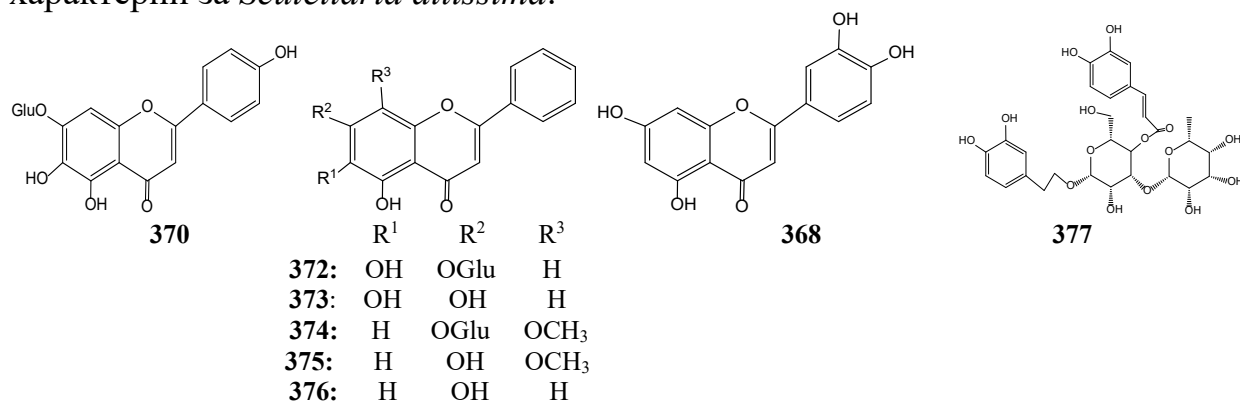
водородите (5.32%), сескитерпенови въглеводороди (4.02%) и оксигенирани монотерпен (2.85%).

Ацетоновите екстракти от *Salvia amplexicaulis* Lam. и *Ajuga laxmanii* Benth. са изследвани и за наличие на ди- и тритерпеноиди, но такива не са установени. Анализирани са химичния състав на етеричното масло от надземните части на *Stachys cretica* subsp. *bulgarica* Rech. fil (*Lamiaceae*), ендемичен Български вид, чрез използване на GC / MS. Влажността на дрогата е 64.83%. Добивът на етерично масло,% в абсолютно сухата маса е 0.04%. Идентифицирани са 20 компонента, които са 89.20% от общото съдържание на съединения в маслото. Пет от тях са в концентрации над 1%, а останалите 15 са в концентрации под 1%. Основните съединения, с по-висока концентрация от 3%, са гераниллиналол (66.36%), гермакрен D (9.01%) и геранилгеранилацетат (4.88%). Общите окис-лени монотерпени представляват най-високия процент от компонентите на етеричното масло, съставляващи 71,24% в маслото. Изследван е ацетоновия екстракт от надземните части на растението за наличие на дитерпеноиди, но такива не са открити. Изследван е ацетоновия екстракт от надземни части на вида *S. leucoglosa* Griseb. за наличие на дитерпеноиди. Не са открити дитерпеноиди и в този вид *Stachys*. Качествени реакции определят флавоните като характерни вторични метаболити във видовете на род *Stachys*.

От *A. Laxmanii* са идентифицирани 27 съединения, които са 86.32% от общото съдържание в маслото. Въглеводороди (55.34%) са доминиращата група в маслото от *A. laxmanii*. Идентифицирани са 20 компонента, които са 89.20% от общото съдържание на съединения в маслото от *S. cretica* subsp. *bulgarica*. Окислени монотерпени представляват най-висок процент от компонентите на етеричното масло, съставляващи 71.24% в маслото.

#### 4.2. Количествено определяне на флавоноиди в *Scutellaria altissima*

Изследвано е количественото съдържание на полифеноли в екстракти от *Scutellaria altissima* събрана в района на Мезек, България, с матрично високоефективна течна хроматография с градиентно елуиране и диодно регистриране на веществата. Определено е количественото съдържание на флавоноидите, скутеларин (370), байкалин (372), байкалеин (373), вогонозид (374), вогонин (375), кризин (376), лутеолин (368) и вербаскозид (377), които са характерни за *Scutellaria altissima*.



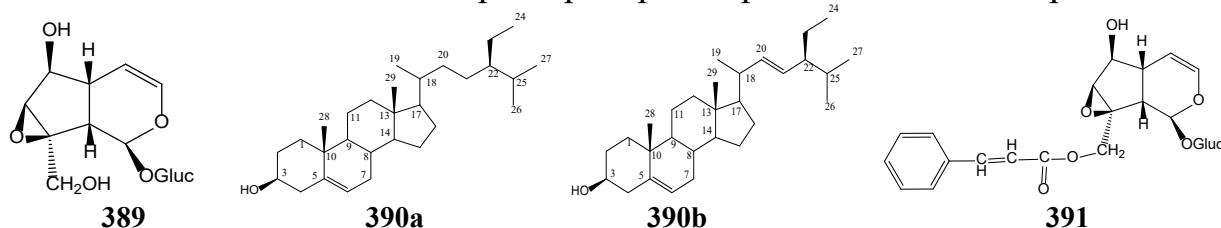
До сега е изследван флавоноидния състав на различни видове от род *Scutellaria* и е доказано присъствието на байкалин, байкалеин, скутеларин и

кризин в диворастващи *Scutellaria galericulata*, байкалин, байкалейн и вогонин в тинктури, получени от *Scutellaria lateriflora* и *Scutellaria baicalensis*, както и байкалин в коренни от *Scutellaria barbata*. Grzegorzcyk- Karolak et al. са определили освен характерните за този род байкалин и вогонозид също лутеолин и вербаскозид в *Scutellaria altissima*.

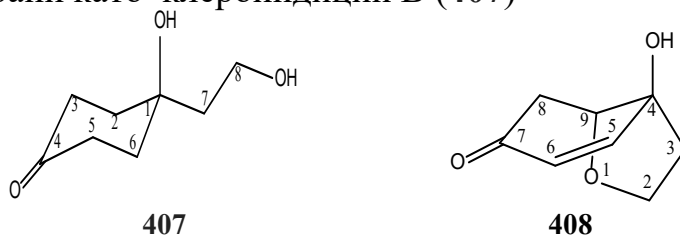
#### 4.3. Изолиране и охарактеризиране на стероли, глюкозидно свързани иридоиди и клероиндицини

От биологично-активната фракция на *Scutellaria albida* е изолиран глюкозидно свързан иридоид, сигналите в <sup>1</sup>H МР спектъра на който съвпадат напълно с публикуваните данни в литературата за каталпол (389).

От растителен материал от *Scutellaria altissima*, събран над село Балканец са изолирани широко разпространените в растителния свят  $\beta$ -ситостерол (390a), стигмастерол (390b) и глюкозидно свързаният иридоид - глобуларин (391). Двата стерола са изолирани като смес в съотношение 1:1. След допълнително хроматографско разделяне  $\beta$ -ситостеролът е получен в индивидуално състояние. Веществата са охарактеризирани чрез анализ на спектралните данни.



Продължавайки търсенето на *нео*-клероданови антифиданти е изследвана *Scutellaria hastifolia* L. От ацетоновия екстракт, получен от надземните части на растението и разработен по обичайния начин, са изолирани две масловидни вещества. След анализиране на спектралните данни съединенията бяха идентифицирани като клероиндицин В (407)



и клероиндицин F (408). EIMS, 1D и 2D ЯМР спектрите на веществата 407 и 408 са включени в приложение 23. Клероиндицини В и F са нови съединения както за вида *Scutellaria hastifolia* L., така и за род *Scutellaria* и за семейство Lamiaceae.

## ИЗВОДИ И ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД

### ИЗВОДИ

#### I. При изолиране и охарактеризиране на структурата и стереохимията на клеродановите дитерпеноиди:

1. Установено е, че във видовете на род *Scutellaria*, растящи на територията на България, биогенетично се синтезират само дитерпеноиди с транс *нео*-

клероданов скелет от типа ТС с 4 $\alpha$ ,18 спиро свързан епоксиден пръстен и  $\alpha$  ориентирана естерна функция при С-6. За разлика голяма част от *нео*-клероданите, идентифицирани в азиатски видове *Scutellaria*, С-19 е винаги окислен. При атомите С-10, С-17 и С-20 няма заместители.

2. Във всички изолирани дитерпеноиди от *S. galericulata* и *S. altissima*, се съдържа 2 $\alpha$ /19 полуацетален или ацетален пръстен.
3. Скуториенталин Е е първият *нео*-клероданов дитерпеноид, изолиран от вид на род *Scutellaria*, който се съдържа цинамоилов естер като заместител.
4. Скуталтисин С е третият доказан до сега *нео*-клеродан с необичайната С-11R конфигурация.
5. Неоаюгапирин А е единственият *нео*-клероданов дитерпеноид с 2 $\alpha$ ,19 ацетален или полуацетален пръстен в молекулата, изолиран от вид на род *Ajuga*. Изолирането на този клеродан от *Ajuga pyramidalis* L. и от *S. galericulata* L. потвърждава хемотаксономичната свързаност на двата рода. Във видовете на двата рода са разпространени *нео*-клероданови дитерпеноиди съдържащи С-13–С-16 фуурофуранов пръстен.
6. Във видовете на род *Teucrium* и род *Salvia* не се биосинтезират клеродани с фуурофуранов пръстен. За дитерпените от тези два рода е характерен фуранов пръстен в С-11–С-16 страничната верига.
7. Дитерпените доказани в род *Salvia* съдържат само ацетатни естерни групи както тези от род *Teucrium*, за разлика от *нео*-клеродановите дитерпени разпространени в род *Scutellaria* и род *Ajuga*, които съдържат разнообразни естерни функции.
8. Съединения като 3 $\alpha$ -acetoxy-teucvin с *trans*-фуроклерода-10 $\beta$ -18,6 $\alpha$ ;20,12-дилактонна структура не са били доказвани до сега в *T. scordium* L. subsp. *scordium*. Синтезираните в *T. scordium* L. subsp. *scordioides* и *T. scordium* L. subsp. *scordium* фуроклероданови съединения с *trans*-10 $\beta$ -18,19;20,12-дилактонни функции показва хемотаксономичната близост на двата подвида.
9. Не се биосинтезират дитерпеноиди в българските видове *S. hastifolia* (L), *Salvia amplexicaulis* LAM, *S. cretica* L. subsp. *bulgarica* rech. fil.

## II. **Изводи относно взаимовръзката строеж / антифидантна активност на клеродановите дитерпеноиди:**

1. Най-силно потискащо действие на храненето на ларвите на Колорадския бръмбар е констатирано при екстракта от *S. albida*. С много добра активност са екстрактите от *S. altissima*, *S. galericulata* и *S. alpina*. Екстрактът от *S. alpina* не показва пълно инхибиране на храненето при доза 10 000 ppm, но запазва висока активност при 1 000 и 100 ppm. Това се обяснява с по-голямото количество *нео*-клероданови дитерпеноиди в този вид. Екстрактът от *S. Hastifolia* не проявява антифидантно действие поради отсъствието на *нео*-клероданови дитерпеноиди.
2. Силно антифидантно действие проявяват *нео*-клероданови дитерпеноиди, които съдържат лактонов пръстен в декалиновото ядро. Антифидантната активност на съединенията, скуталпини А и О, неоаюгапирин А и

скутегалерин А е близка с тази на стандартното съединение 14,15-дихидродрелонин Т. Дитерпеноидите съдържащи фуранов пръстен в С-11–С-16 подструктурата проявяват по-слаба активност. Замяната на тетраhydro фурофурановия пръстен с лактолен пръстен в скутегалерин С, скутегалерин D и скутегалин D, причинява драстично намаляване на антифидантната активност.

3. Антифидантната активност на *нео*-клеродановите дитерпеноиди, намалява при заместване на естерните групи при С-1, С-3, С-7 и С-19 в дека-линовия пръстен на *нео*-клероданите, с хидроксилна и метокси група, а се увеличава, когато присъства двойна връзка между С-14 и С-15.
4. Антифидантната активност на изолираните от *Salvia splendens* фуро-*нео*-клероданови дилактони, салвиарин, спленолид А, спленолид В и сплендидин, нараства при наличие на ацетокси заместител при С-1 или С-11. С най-висока активност е сплендидин, в молекулата на който има две ацетатни естерни групи.
5. Дитерпеноидите, 11-епи-скутеколумнин С и skutaltisin С, които са с R-конфигурация на С-11 проявяват по-силна активност от съответните епимери скутеколумнин С и skutaltisin В, които са с 11S конфигурация. С-15 епимерите, skutaltisin Е и skutaltisin F, не проявяват различие в активността.

### III. *Изводи относно антимикробната и цитотоксична активност на клеродановите дитерпеноиди:*

1. Дитерпеноиди съдържащи тетра- или хексахидро фуро-[2,3-b]-фуран при С-9 не проявяват антибактериална и антикандидална активност, тези съдържащи фуранов пръстен или  $\alpha,\beta$ -ненаситен  $\gamma$ -лактон в С-11–С-16 подструктурата проявяват слабо антибактериално и антикандидално действие. В дитерпените с най-добра антимикробна активност, skutalpin А, Е и F е образуван 13-спиро свързан  $\gamma$ -лактон с С-8–С-13 оксанов пръстен.
2. Най-чувствителните щамове към skutalpin А, който е с най-силно изразено антибактериално и антикандидално действие, принадлежат към вида *Staphylococcus aureus* (MIC 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), а най-устойчивите щамове принадлежат към рода *Pseudomonas* (MIC 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Като цяло грам-положителните бактерии са по-чувствителни в сравнение с грам-отрицателните бактерии. Резистентността на двата вида дрожди е сравнима с тази на грам-положителните бактерии.
3. Цитотоксичност проявяват клеродани с 13-спиро свързан  $\gamma$ -лактон в С-11–С-16 страничната верига с С-8–С-13 оксанов пръстен. Skutalpin А е най-активен с IC<sub>50</sub> - 21.35  $\mu\text{M}$  срещу карциногенни клетки H1299 и 23.9  $\mu\text{M}$  срещу нормални клетки HUVES. Неговата активност е по-висока от тази публикувана от Kurimoto за дитерпеноидите със същия скелет - скутефолиди G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, Q (IC<sub>50</sub> от 36.2 до 82.5  $\mu\text{M}$ ), изолирани от *S. coleifolia* (Япония).

#### IV. При изолиране и идентифициране на други природни органични съединения

1. Доказано е, че добивът на етерично масло (% в абсолютно суха маса), във видовете *S. amplexicaulis* Lam., *A. laxmanii* Benth. и *S. cretica* subsp. *bulgarica* Rech. fil. от семейство *Lamiaceae* е съответно 0.08 %, 0.02 % и 0.04%, следователно те са бедни на етерично масло. Установено е, че сескитерпените въглеродороди (48.01%) са доминиращи съединения в етеричното масло от *S. amplexicaulis* Lam, а висшите мастни въглеродороди (55.34%) са доминиращи в маслото от *A. laxmanii* Benth. Кислородсъдържащите монотерпени са основните терпеноиди (71,24%) в етеричното масло на *S. cretica* subsp. *bulgarica*.
2. Флавоноидният състав на *S. altissima* L. растяща в България не се различава от този публикуван за същия вид в Полша. За първи път от този вид са изолирани  $\beta$ -ситостерол, стигмастерол и глюкозидно свързаният иридоид глобуларин. Изолираният от *S. albida* L. глюкозидно свързан иридоид каталпол е ново съединение за вида.
3. Клероиндицин В и клероиндицин F, изолирани от *S. hastifolia*, са нови вещества както за род *Scutellaria* така и за сем. *Lamiaceae*.

### ОРИГИНАЛНИ НАУЧНИ ПРИНОСИ

#### I. При изолиране на клероданови дитерпеноиди:

1. Проведен е фитохимичен анализ за наличие на клероданови дитерпеноиди в 15 български растителни вида от 5 рода на сем. *Lamiaceae* (8 от *Scutellaria*, 3 от *Salvia*, 2 от *Teucrium*, 1 от *Ajuga* и 1 от *Stachys*). Изолирани и спектрално са охарактеризирани 48 дитерпеноида. Един от тях е с лабданов скелет (склареол), три са с 19-нор-клероданов скелет, а останалите 44 са нео-клероданови дитерпеноиди. С нови за науката структури са 22 дитерпена: два с 19-нор-клероданов скелет и двадесет с нео-клероданов скелет. Други 13 дитерпеноида са доказани за първи път в изследваните видове.
2. Коригирана е структурата на аюгапирин А (докладван като 1 $\beta$ -хидроксискутекип-рин) на 3 $\beta$ -хидроксискутекип-рин (неоаюгапирин А). Изолирана и спектрално е охарактеризирана реалната структура 1 $\beta$ -хидроксискутекип-рин, с тривиално наименование скутегалерин А.
3. При 11 клероданови дитерпеноида е доказано наличието на епимерни двойки. При пет от тях са охарактеризирани спектрално и двата изомера: 15R,15S-14,15-дихидро-15-хидроксиаюгахин А; 15R,15S-скутеки-прол А; 15R,15S-скутекипрол В; 15R,15S-скуталтисин А; 15R,15S-скутал-тисин D; 15R,15S-скуталтисин G; скутеко-лумнин C/11-*enu*-скутеколумнин C; скуталтисин В/ скуталтисин C; скуталтисин E/скуталтисин F; скутегалерин C/скутегалерин D; скутегалерин F/ скутегалерин G.
4. Изолиран е нео-клеродан (скуталтисин C) с необичайната C-11R конфигурация. За първи път частично е разделена епимерната смес от скутеколумнин C (с 11S конфигурация) и 11-*enu*-скутеколумнин C (с 11R

конфигурация), публикувана по-рано като “неделима с различни разтворители и прекристализация смес в съотношение на епимерите 3:7“.

## II. При доказването на строежа на изолираните клеродани и отнасянето на сигналите в $^1\text{H}$ - и $^{13}\text{C}$ ЯМР спектри:

1. Скутекиприн е получен в кристално състояние. Определена е температурата му на топене. Обогатени са литературните с пълен набор от 1D и 2D ЯМР спектри. Отнесени са сигналите в  $^1\text{H}$  ЯМР спектър за протоните  $1\alpha$ ,  $1\beta$ ,  $3\beta$ ,  $7\alpha$ ,  $7\beta$ ,  $8\beta$ ,  $10\beta$ ,  $12\alpha$ ,  $12\beta$ ,  $14\alpha$ ,  $14\beta$  и във  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектър за C-5/C-9 и C-7/C-12/C-14.
2. Корижирани са сигналите за атомите C-1 и C-2 във  $^{13}\text{C}$  - ЯМР спектър на скутегалерини F и G. В литературата тези сигнали са разменени в съединения със същите фрагменти в декалиновата подструктура.
3. Корижирана е публикуваната структура на аюгапирин A ( $1\beta$ -хидроксискутекиприн) на  $3\beta$ -хидроксискутекиприн с тривиалното наименование неоаюгапирин A. На базата на стойностите на  $J$  константите и мултиплетността на сигналите са корижирани отнасянията на сигналите при  $\delta_{\text{H}}$  1.81 за Me-4' и  $\delta_{\text{H}}$  1.87 за Me-5' в неоаюгапирин A, които са разменени в аюгапирин A.
4. Корижирани са публикуваните сигнали при  $\delta_{\text{H}}$  3.98/4.40 за протоните  $3\alpha/2\beta$  в клеродани с ОН-група при C-3, като скуполини G, H и I, аюгапирин A и други. След обмен с  $\text{D}_2\text{O}$  мултиплета при  $\delta_{\text{H}}$  4.40 се наблюдава като t, на основа на което тези сигнали са разменени: в неоаюгапирин A сигналът при  $\delta_{\text{H}}$  4.40 е отнесен за H- $3\alpha$ , а този при  $\delta_{\text{H}}$  3.98 за H- $2\beta$ .
5. На всички изолирани дитерпени е извършено пълно отнасяне на сигналите в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектри. Попълнени са липсващите в литературата  $^{13}\text{C}$  ЯМР данни за аюгапирин A ( $\Rightarrow$  неоаюгапирин A), както и за б-кетотеускордин.
6. Доказана е конфигурацията на всички асиметрични въглеродни центрове в изолираните съединения, чрез интерпретация на свързващите  $J$  константи и на NOESY изследванията.

## ПРИНОСИ С ПРАКТИЧЕСКА НАСОЧЕНОСТ

1. Тествана е антифидантната активност на екстракти от 8 вида на род *Scutellaria* и на 43 клероданови дитерпеноида изолирани от *S. alpina*, *S. galericulata*, *S. altissima*, *S. splendens*, *T. polium* и *T. scordium* срещу ларви на Колорадски бръмбар.
2. За първи път е изследвана антифидантната активност на нео-клероданови дитерпеноиди с необичайна R-конфигурация на C-11.
3. Тествана е цитотоксичната активност на 12 нео-клероданови дитерпеноида, изолирани от представители на род *Scutellaria* срещу две клетъчни линии: карциногенни клетки от човешки тумори по белите дробове, означени като H1299 и нормални клетки от пъпна връв (HUVES).
4. Тествана е антимикробната активност на 22 клероданови дитерпеноида срещу деветнадесет щама, принадлежащи към единадесет различни вида

патогенни и хигиенно-индикаторни микроорганизми в хранителни продукти и срещу два щама дрожди.

### ПРИНОСИ ПРИ ИЗОЛИРАНЕ НА ДРУГИ ОРГАНИЧНИ СЪЕДИНЕНИЯ

1. Чрез хидродестилация е екстрахирано етерично масло от три растителни вида: в *S. amplexicaulis* Lam. са идентифицирани 26 природни органични съединения (85.5% от общото съдържание на съединения в маслото), в *A. laxmanii* Benth. 27 (86.32% от общото съдържание в маслото), а в *S. cretica* subsp. *bulgarica* Rech. fil. 20 (89.20% от общото съдържание в маслото).
2. От *S. altissima* са идентифицирани количествено 8 полифенолни съединения - 7 флавоноида (скутеларин, байкалин, вогонин, вогонозид, байкалейн лутеолин, кризин) и кафеоилфенилетаноидния гликозид - вербаскозид.
3. Изолирани и охарактеризирани са 2 стерола, 2 глюкозидно свързани иридоида, 2 клероиндицина.

### ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР

#### I. *Относно взаимовръзката структура / антифидантна активност:*

1. Потвърдена е хипотезата на японските изследователи Kojima и Kato, че присъствието в клеродановата структура на спиро епоксид при C-4 $\alpha$ ,18 и две естерни групи при C-6 и C-19, заедно с хексахидро- или тетрахидро фурофуранов пръстен при C-9, са предпоставка за висока антифидантна активност.
2. Потвърди се отличната активност на съединения, в които фурофуранова-та система е заменена с  $\gamma$ -лактонов пръстен спиро-свързан при C-13 с оксанов пръстен, сключен между C-8–C-13, както е установено от италианските химици Rassuglia и съавтори при тестване на антифидантното действие на хастифолините A-G, изолирани от *S. hastifolia*.

#### II. *Относно взаимовръзката структура / цитотоксична активност:*

1. И трите нео-клероданови дитерпеноида, проявяващи цитотоксичност, skutalпини A, E и F имат  $\gamma$ -лактонен пръстен в молекулата си, 13-спиро свързан с оксанов пръстен, сключен между C-8 и C-13, също както е публикувано за поредица дитерпеноиди, изолирани от азиатски видове на род *Scutellaria* – *coelefolia*, *rivularis*, *caerulea*, *formosana*.

### СПИСЪК

на научните трудове на автора по темата на дисертационният труд не участвали в процедурата за придобиване на ОНС „доктор“

(общ импакт фактор 14.921)

- I. Научни публикации, рецензирани във връзка със заемане на академичната длъжност „доцент“ (2015 г.):

**I.A. Публикации в научни издания, реферирани и индексирани в световно-известни бази данни с научна информация (ISI Web of Knowledge и/или SCOPUS)**

1. Malakov P., **Bozov P.** and Papanov G., (1997). A neo-clerodane diterpenoid from *Scutellaria orientalis* subsp. *pinnatifida*, *Phytochemistry*, vol. 46, № 3, pp. 587 – 589. **Q-1; IF –1.165**
2. **Bozov P.**, Penchev P. and Coll J., (2014). Neo-Clerodane Diterpenoids from *Scutellaria galericulata*, *Natural Product Communications*, v. 9, (3), pp. 347-350. **Q-2; IF – 1.082**
3. **Bozov P.**, Vasileva T. and Iliev I., (2014). Structure and antifeedant activity relationship of neo-clerodane diterpens against Colorado potato beetle larvae, *Chemistry of Natural Compounds*, v. 50 (4), pp. 762-764. **Q-3; IF – 0.5**
4. **Bozov P.**, Penchev Pl., Vasileva T., Iliev I., (2014). Diterpenoids from *Scutellaria galericulata*, *Chemistry of Natural Compounds.*, v. 50, (3), 554–556. **Q-3; IF – 0.5**
5. Yoana P. Georgieva, Rumen D. Mladenov and **Petko I. Bozov**, (2014). Chemical constituents of *Scutellaria altissima*, *Chemistry of Natural Compounds*, v. 50, № 6, pp. 1146-1147. **Q-3; IF – 0.5**
6. Plamen N. Penchev, Stefka R. Nachkova, Tonka A. Vasileva and **Petko I. Bozov**, (2014), <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Analysis of the neo-Clerodane Diterpenoid Scuteocyprin, *Natural Product Communications*, v. 9, (8), pp. 1065-1068. **Q-2; IF – 1.082**
7. **Petko I. Bozov** and Josep Coll, (2015). neo-Clerodane Diterpenoids from *Scutellaria altissima*, *Natural Product Communications*, v. 10, (1), pp. 13-16. **Q-2; IF – 1.001**

**I.B. Публикация в реферирано издание, цитирана в научно издание, реферирано и индексирано в световно-известни бази данни с научна информация (ISI Web of Knowledge и/или SCOPUS)**

8. **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. BioSci Biotech., SPECIAL EDITION / ONLINE* (2014) pp. 161-164.

Цитирана в:

Raju Sripathi and Subban Ravi, (2017). Ethnopharmacology, Phytoconstituents, Essential Oil Composition and Biological Activities of the genus *scutellaria*, *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol. 9, (3), 275-287. **IF - 0.3**

<https://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/vol9Issue03/jpsr09031703.pdf>



### **I.B. Публикации в реферирани издания**

9. Malakov P., **Bozov P.** and Papanov G., (2001). Chemical constituents of the aerial parts of *Scutellaria albida*, Annuaire de L'Universite de Sofia "St. KlimentOhridski", Faculte de Chimie, vol. 91, pp. 133-137
10. Merkova S., **Bozov P.** and Iliev I., (2011). Chemical constituents of the aerial parts of *Salvia splendenes*, Annuaire de L'Universite de Sofia "St. KlimentOhridski", Faculte de Chimie, vol. 102/103, pp. 279-284.
11. **Bozov P.**, (2012). Antifeedant activity of stem extracts from species of genus *Scutellaria* L. Against Colorado potato beetle larvae, Annuaire de L'Universite de Sofia "St. KlimentOhridski", Faculte de Chimie, vol. 104, pp. 125-130.

### **II. Научни публикации, извън представените в процедури за получаване на ОКС „доктор“ и за заемане на академичната длъжност „доцент“:**

#### **II.A. Публикации в научни издания, реферирани и индексирани в световно-известни бази данни с научна информация (ISI Web of Knowledge и/или SCOPUS)**

12. **P. Bozov**, T. Girova, N. Prisadova, Y. Hristova, V. Gochev, (2015). Antimicrobial Activity of *neo*-Clerodane Diterpenoids isolated from Lamiaceae Species against Pathogenic and Food Spoilage Microorganisms, Natural Product Communications, 10 (11), 1797-1800. **Q-2; IF – 1.001**
13. Plamen N. Penchev, Josep Coll, Katia H. Nicolova, Ilia N. Iliev and **Petko I. Bozov**, (2016). Minor diterpenoids from *Scutellaria galericulata*, Phytochemistry letters, 15, 103-107. **Q-2; IF - 1.542**
14. **Petko I Bozov**, Yoana P Georgieva, (2017). Antifeedant Activity of Neo-clerodane Diterpenoids from *Scutellaria altissima* against Colorado Potato Beetle Larvae, Natural Product Communications, 12, (3), 327-328. **Q-2; IF - 0.852**
15. Katia H. Nicolova<sup>1</sup>, Norbert Kursz, Judit Hohmann, Mladen M. Naydenov, **Petko I. Bozov**, (2018). Two new *neo*-Clerodane Diterpenes from *Scutellaria galericulata*, Chemistry of Natural Compounds, v. 54, No 1, pp. 77-80. **Q-3; IF - 0.567**
16. K. H. Nikolova, I. T. Stoykov and **P. I. Bozov**, (2018). Responsible Structural Features for Cytotoxic, and other kind activity of neo-clerodane diterpenes from genus *Scutellaria*, Bulgarian Chemical Communications, v. 50, Special Issue C, pp. 7 – 13. **Q-4; IF – 0.349**
17. **Petko I. Bozov** and Plamen N. Penchev, (2019). *Neo*-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium* subsp. *vincentinum* (rouy) D. Wood, Phytochemistry Letters, 31, 237-241. **Q-2; IF -1.338**
18. **P. I. Bozov**, P. N. Penchev, (2019). *Neo*-Clerodane Diterpenoids from *Scutellaria velenovskyi* Rech. fil., Bulgarian Chemical Communications, Volume 51, Special issue D pp. 103 – 106. **Q-4; IF - 0.640**

19. Y. Georgieva, M. Katsarova, K. Gercheva, **P. Bozov**, S. Dimitrova, (2019). HPLC analysis of flavonoids from *Scutellaria altissima*, Bulgarian Chemical Communications, v. 51, Special issue D, pp. 119 – 123. **Q-4; IF - 0.640**
20. **Petko I. Bozov**, Plamen N. Penchev, Yoana P. Georgieva and Velizar Gochev, (2020). Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium scordium* L. subsp. *scordioides* (Shreb.) Maire et Petitmengin, Bulgarian Chemical Communications, v. 52, issue 4, pp. 453-459. **Q-4; IF -0.640**
21. **P. I. Bozov** (2020) Clerodane diterpenoids, isolated from Bulgarian species of genus *Teucrium* (Lamiaceae), Bul. Chem. Communications., v. 52 (2) pp. 250-258. **Q-4; IF – 0.640**
22. **Petko I. Bozov**, Plamen N. Penchev, Tania D. Girova and Velizar K. Gochev, (2020). Diterpenoid constituents of *Teucrium scordium* L. subsp. *scordioides* (Shreb.) Maire et Petitmengin, Natural Product Communications, 15 (9):1–6. **Q-2; IF - 0.580**

### **II.B. Публикации в реферирани издания**

23. **P.I. Bozov**, Y. P. Georgieva, R.D. Mladenov (2014) Diterpenoids with neo-clerodane skeleton of *Scutellaria altissima*, Annual of Sofia University “Str. Kliment Ohridski” Faculty of Chemistry and Pharmacy, 106, 53-58.
24. **P.I. Bozov**, T. Atanasova, P. Merdzhanov, A. Stoyanova, (2016). Chemical composition of the essential oils of *Salvia amplexicaulis* lam. and *Ajuga laxmanii* benth. from Bulgaria., Journal of Food and Packaging Science, Technique and Technologies, 10, 14-17.
25. Stanka Damyanova, Albena Stoyanova, Teodora Atanasova, **Petko Bozov**, (2016). Chemical composition of essential oil from *Stachys cretica* subsp. *bulgarica* Rech. fil. Biotechnologies and food technologies, Volume 55, book 10.2, 71-74.
26. **P. I. Bozov**, (2016) Neo-Clerodane Diterpenoids From Species Of Genus *Scutellaria* (Lamiaceae), Annual of Sofia University “st. Kliment Ohridski” Faculty of Chemistry and Pharmacy, 107/108, 41-48.
27. P. N. Penchev, M. M. Naydenov, **P. I. Bozov**, (2016). Constituents of *Salvia nemorosa*., Annual of Sofia University “st. Kliment Ohridski” Faculty of Chemistry and Pharmacy, 107/108, 1-6.

### **II.B. Публикации от конференции**

28. Y. Georgieva, M. Katsarova, S. Dimitrova, **P. Bozov**, (1-3 June, 2018). Химичен състав и биологична активност на растения от род *Scutellaria* L. – Мини обзор, National Scientific Conference “15 Years of Pharmacy in Medical University - Plovdiv”, 267-275.

### **Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд Международни научни форуми**

1. **P.I. Bozov**, T. Atanasova, P. Merdzhanov, A. Stoyanova, Chemical composition of the essential oils of *Salvia amplexicaulis* lam. and *Ajuga laxmanii* benth. from Bulgaria, Development of the Science, Technologies and Techniques for the

Manufacture, Packaging, Labeling, Storage and Distribution of Foods, 3-4 June, 2016, Burgas, Bulgaria.

2. 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 - Plovdiv: 11<sup>nt</sup> – 13<sup>th</sup> October, 2018, Plovdiv, Bulgaria.
3. 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.
4. 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), 4-th Balkan Scientific Conference on Biology: 1st - 3rd November, 2017, Plovdiv, Bulgaria.
5. S. Dimitrova, Y. Georgieva, M. Katsarova<sup>1</sup>, K. Gercheva, P. Denev, **P. Bozov**, Study on the flavonoid composition and antioxidant activity of four *Scutellaria* species from the region of South Bulgaria, 4<sup>th</sup> World Congress & Expo on Pharmaceutics and Drug Delivery Systems, March, 25-26, 2019 Milan, Italy.

#### Национални научни форуми

1. **Бозов П.**, Стоянов Пл., И., Младенов Р., Василева Т., (2011), Antifeedant activity of natural neo-clerodanes, isolated from *Scutellaria alpina* и *Salvia splendens* Ker.-Gawl. and four synthetic derivatives against Colorado Potato Beetle Larvae (Доклад). Научен Семинар „Биологически науки за по-добро бъдеще“ (50 години ПУ), 28-29 Октомври 2011, Пампорово.
2. 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.
3. Stanka Damyanova, Albena Stoyanova, Teodora Atanasova, **Petko Bozov**, Chemical composition of essential oil from *Stachys cretica* subsp. *bulgarica* Rech. fil., 56-та Научна Конференция РУ & СУ '17 „Индустрия 4.0 и конвенционалните бизнес модели“ Русенски Университет “Ангел Кънчев”, 27-28.10.2017.

4. Y. Georgieva, M. Katsarova, K. Gercheva, **P. Bozov**, S. Dimitrova, "HPLC Analysis of Flavonoids from *Scutellaria altissima*" 11th Chemistry Conference Plovdiv (11cc), 11 -13 October 2018.
5. **Petko I. Bozov**, Plamen N. Penchev, Two cleroidicins from *Scutellaria hastifolia* – first time isolated from Lamiaceae family species, 10<sup>th</sup> Chemistry Conference Plovdiv (10cc), 09 -11 October 2016.
6. Plamen N. Penchev, **Petko I. Bozov**, Neo-Clerodane Diterpenoids from *Scutellaria velenovskyi* Rech. fil., 11<sup>th</sup> Chemistry Conference Plovdiv (11cc), 11 -13 October 2018.
7. Й. Георгиева, М. Кацарова, С. Димитрова, **П. Бозов**, Постер - Химичен състав и биологична активност на растения от род *Scutellaria* L. Национална научна конференция "15 години фармация в Медицински университет - Пловдив"- 01-03 юни 2018 г., гр. Девин.

**По данни на Scopus публикациите са цитирани 141 пъти. Неизползваните цитирания в други процедури са 76. На автора на дисертационния труд е отчетен H-индекс – 7.**

#### **Дисертацията включва труда на:**

*моите дипломанти:* Катя Николова, Павлина Средкова, Тихомира Динева, Стела Памукова, Йоана Георгиева.

*моите докторанти:* д-р Катя Николова, докторант Йоана Георгиева.

#### **БЛАГОДАРНОСТИ**

Благодаря най-сърдечно на всички, които са ме подкрепяли и помагали при изработването и реализирането на настоящия дисертационен труд:

➤ На проф. Георги Папанов и доц. Петър Малаков, които ме въведоха в химията на терпените.

➤ На всички колеги, с които сме работили съвместно или са ме насочвали с конструктивни предложения, съвет или градивна критика.

➤ Благодаря на семейството си за разбирането, търпението и подкрепата, която винаги съм получавал.

➤ Този труд е осъществен с активното участие на проф. дхн Пламен Пенчев