



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“

---

**Анотация на материалите и разширена  
хабилитационна справка по чл. 65 (1) от Правилника  
за РАС на ПУ “Паисий Хилендарски”. Самооценка на  
приносите**

на  
**гл. ас. д-р Димитър Георгиев Божилов**  
Катедра „Органична химия“, Химически факултет, ПУ „П. Хилендарски“

във връзка с участие в конкурс за заемане на академичната длъжност

**„доцент“** по област на висше образование **4. Природни науки,**

**математика и информатика,**

професионално направление **4.2. Химически науки,**

научна специалност **Органична химия, Хроматографски анализ,**

обявен в Държавен вестник, бр. 39 от 02.05.2023 г.

## **I. Съответствие с условията за заемане на академична длъжност „доцент“ по чл. 65. (1) от правилника за развитие на академичния състав на ПУ „П. Хилендарски“**

От 2010 г. преподавам в Пловдивски университет „П. Хилендарски“ и съм част от екипа на катедра „Органична химия“. Защитих докторската си степен по научна специалност Органична химия през 2017 г. От 2018 г. заемам академичната длъжност „главен асистент“.

За участие в конкурса за заемане на академичната длъжност „доцент“ по научна специалност „Органична химия, Хроматографски анализ“ представям общо 46 научни труда, които не са използвани при процедурите за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ и за заемане на академичната длъжност „главен асистент“. Те се класифицират в следните групи (в съответствие със списъка на научните трудове):

- ❖ публикации в списания, реферирани в Scopus/Web of Science – 24 броя;
- ❖ публикации в научни специализирани списания без импакт фактор – 11 броя;
- ❖ публикации в сборници от конференции – 11 броя;

### **I. ПУБЛИКАЦИИ В СПИСАНИЯ, РЕФЕРИРАНИ В SCOPUS/WEB OF SCIENCE**

1. Georgieva, K., Dagnon, S., Gesheva, E., Bojilov, D., Mihailova, G., & Doncheva, S. (2017). Antioxidant defense during desiccation of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 114, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.02.021>

**Резюме:** Поддържането на силна антиоксидантна система е от съществено значение за предотвратяване на предизвикания от суша оксидативен стрес. По този начин, в настоящото изследване ние изследвахме ролята на някои неензимни и ензимни антиоксиданти в толерантността към изсушаване на *Haberlea rhodopensis*. Ефектите от силна светлина при изсушаване върху антиоксидантния капацитет бяха оценени чрез сравняване на отговора на сенчести и слънчеви растения. Значителното повишаване на антиоксидантния капацитет при 8% RWC съответства на огромно увеличение на съдържанието на флавоноиди. Установена е важната роля на аскорбат-глутатионовия цикъл за преодоляване на оксидативния стрес при сушенето на *H. rhodopensis*. Антиоксидантният капацитет се увеличава при дехидратиране както на сенчести, така и на слънчеви растения, но се наблюдават някои разлики в неензимните и ензимните антиоксиданти. Изследванията за ролята на полифенолите в толерантността към изсушаване са оскъдни. В настоящото изследване за първи път са получени полифенолните профили (пръстови отпечатъци) на възкръсващото растение *Haberlea rhodopensis*, включително всички компоненти на комплекса. Изяснено е, че полифенолният комплекс на *H. rhodopensis* включва само два вида гликозиди - фенилетанонидни гликозиди и хиспидулин 8-С-гликозиди. При изсушаване

съдържанието на полифенол се увеличава и се разкрива основната роля на фенилетаноидните глюкозиди в защитата на *H. rhodopensis*.

2. Dospatliev, L., Lozanov, V., Ivanova, M., Papazov, P., Sugareva, P., Petkova, Z., & Bojilov, D. (2018). Comparison of Free Amino Acid Compositions of Stem and Cap in Wild Edible Mushrooms, Bulgaria. *Oxidation Communications*, 41(4), 542–549. <http://www.scibulcom.net/ocr.php?gd=2018&bk=4>

**Резюме:** Целта на това изследване беше да се оценят разликите в аминокиселинния състав между шапката и стеблото на *Morchella esculenta* – диворастяща ядлива гъба от Родопска планина над Батак, България. Съставът на аминокиселините бе определен с Q Exactive мас анализатор оборудван с TurboFlow LC система и IonMax II електроспрый йонизационен модул (ThermoScientific Co, USA). Събирането и обработката на данни бяха извършени със софтуерен пакет XCalibur 4.2. Двадесет свободни аминокиселини, хистидин, аргинин, аспаргин, глутамин, серин, аспарагинова киселина, глутаминова киселина, треонин, глицин, пролин, тирозин, валин, метионин, левцин/изолевцин, фенилаланин, орндихидрохлорид, триптофан, лизин, 4-хидроксипролин и  $\gamma$ -аминомаслена киселина са определени в шапката и стеблото на гъбите. Общото съдържание на свободни аминокиселини (ТАА) в шапката е  $26,17 \text{ mg kg}^{-1}$ , а това на стеблото –  $42,75 \text{ mg kg}^{-1}$ . Съотношенията на основните към общите аминокиселини на шапката и стеблото са съответно 0,15 и 0,25. Най-съществена разлика между шапката и стеблото на *Morchella esculenta* е установена при орнитин – 263%, следван от серин – 18,93% и аспаргин – 20,28%. Най-малки разлики в аминокиселинния състав между шапката и стеблото са демонстрирани при пролин – 102,77%, следван от глутамин – 104,33% и глутаминова киселина – 93,12%. От всичките 20 аминокиселини, само 6 са намерени в по-големи количества в шапката, отколкото в стеблото. Резултатите показват, че съдържанието на свободни аминокиселини в анализирания див ядливи гъби е значително и че те могат да бъдат важни съединения, допринасящи за типичния вкус на гъбите, хранителната стойност и мощните антиоксидантни свойства.

3. Dospatliev, L. K., Petkova, Z. Y., Bojilov, D. G., Ivanova, M. T., Antova, G. A., & Angelova-Romova, M. Y. (2019). A comparative study on the methods of antioxidant activity in wild edible mushrooms from the Batak Mountain, Bulgaria. *Bulgarian Chemical Communications*, 51(Special Issue A), 245–250. [http://www.bcc.bas.bg/BCC\\_Volumes/Volume\\_51\\_Special\\_A\\_2019/E-pdf-ready/BCC-51-A-2019-245-250-ZhPetkova-E2.pdf](http://www.bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_51_Special_A_2019/E-pdf-ready/BCC-51-A-2019-245-250-ZhPetkova-E2.pdf)

**Резюме:** Извършено е сравнително изследване на методите за антиоксидантна активност в метанолови екстракти от седем вида диворастящи ядливи гъби (*Boletus pinophilus*, *Cantharellus aurora*, *Cantharellus tubaeformis*, *Cantharellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Morchella esculenta* и *Tricholoma equestre*) от Родопска планина над Батак (България). Общият антиоксидантен капацитет беше оценен чрез ABTS<sup>•+</sup> (2,2'азинобис-(3-етилбензтиазолин-6-сулфонова киселина)), DPPH<sup>•</sup> (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикал), FRAP (редуктор на желязо/антиоксидант мощност) и CUPRAC (меден йон, намаляващ антиоксидантния капацитет). Общото фенолно съдържание (TPC) на гъбите бе оценено с реагент на Folin-Ciocalteu и като стандарт бе използвана галова киселина.

Стойностите на еквивалентния антиоксидантен капацитет на Trolox (TEAC) на гъбите варират от 4,10 до 69,74 mmol TE/g dw, от 1,55 до 20,23 mmol TE/g dw, от 7,72 до 35,31 mmol TE/g dw и от 7,97 до 64,25 mmol TE/g dw съответно за ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, FRAP и CUPRAC. Общото фенолно съдържание варира от 0,68 до 11,92 mg еквиваленти галова киселина (GAE)/g dw. В заключение, гъбата с най-високи стойности на TEAC е *Boletus pinophilus*, а с най-ниски е *Cantharellus cibarius*.

4. Dagnon, S., Novkova, Z., Bojilov, D., Nedialkov, P., & Kouassi, C. (2019). Development of surrogate standards approach for the determination of polyphenols in *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103231. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.06.003>

**Резюме:** Тази статия описва аналитичен подход за определяне на полифенолни компоненти във *Vernonia amygdalina* Del. (VA) с помощта на сурогатни стандарти, екстракти от зелено кафе и *Achillea asplenifolia* 9602 и рутин като вътрешен стандарт. Разработени са HPLC–PDA профили на пръстови отпечатъци на полифенолния комплекс на VA и сурогатни стандарти. Чрез сравнение между хроматографските и спектралните характеристики на VA и сурогатните стандарти, като се използват относителните времена на задържане спрямо рутина, беше възможно да се идентифицират полифенолните компоненти в VA. Освен това, идентификацията на компонентите беше потвърдена от HRMS спектрите, за да се провери верността на процедурите. Съдържанието на полифенолите беше определено използването вътрешен стандарт (рутин). За да се потвърди методът като много точен и приложим определихме характеристиките LOD, LOQ и RSD%,. Полифенолният комплекс на VA съдържа дикафеоилхинови киселини и лутеолинови гликозиди като основни компоненти. Метод, използващ колона Nucleosil C18, осигурява най-доброто разделяне на 1,5- и 3,5-дикафеоилхиновите киселини в VA. Количеството им достига до  $1,49 \pm 0,21 \text{ mg g}^{-1}$ . Съдържанието на 4,5-дикафеоилхинова киселина е  $0,35 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1}$ . Лутеолиновите гликозиди и лутеолинът са открити съответно при  $0,40 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1}$  и  $0,14 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ . Наличието на лутеолин 4'-О-глюкозид, апигенин 7-О-рутинозид, апигенин 7-О-глюкозид и апигенин като второстепенни съставки във VA се съобщава за първи път. Резултатите предполагат прилагането на сурогатния стандартен подход в аналитичната практика на храните като силно препоръчително.

5. Manolov, S., Ivanov, I., & Bojilov, D. (2020). N-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-2-(6-chloro-9H-carbazol-2-yl)propanamide. *Molbank*, 2020(4), M1171. <https://doi.org/10.3390/M1171>

**Резюме:** Заглавното съединение се получава чрез реакция между триптами и карпрофен, като се прилага, като "дехидратиращ" реагент, *N,N'*-дициклохексилкарбодимид. Новосинтезираното съединение е напълно анализирано и охарактеризирано чрез <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR, UV, IR и масспектрални данни.

6. Bojilov, D., Petkova, Z., Manolov, S., Antova, G., & Angelova-Romova, M. (2020). Impact of the duration of ultrasound-assisted extraction on total phenolics content and antioxidant activity of lupin seeds. *Bulgarian Chemical Communications*, 52(Special Issue D), 222–226.

[http://bcc.bas.bg/BCC\\_Volumes/Volume\\_52\\_Special\\_D\\_2020/BCC-52-D-2020-222-226-Petkova-E02.pdf](http://bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_52_Special_D_2020/BCC-52-D-2020-222-226-Petkova-E02.pdf)

**Резюме:** Влиянието на продължителността на ултразвукова екстракция върху антиоксидантната активност и общото фенолно съдържание на семената на лупина (*Lupinus angustifolius* L. сорт „Boregine“) беше изследвано за първи път. Семената на лупината са с немски произход, но са въведени в България. Те се екстрахират за 10, 20 и 30 минути с абсолютен метанол и получените екстракти се оценяват за общо фенолно съдържание и антиоксидантна активност. Установено е, че съдържанието на полифеноли в екстрактите е в диапазона от 1,65 – 2,03 mg еквиваленти на галова киселина (GAE)/g суха проба, в зависимост от продължителността на процеса на екстракция. Антиоксидантната активност беше оценена чрез ABTS<sup>+</sup> (2,2'азинобис-(3-етилбензтиазолин-6-сулфонова киселина)) (2,28 – 2,89 mmol Trolox еквивалент (TE)/g dw), DPPH<sup>•</sup> (1,1-дифенил -2- пикрилхидразил радикал) (2,01 – 2,71 mmol TE/g dw), FRAP (3,76 – 4,36 mmol TE/g dw) и CUPRAC (3,07 – 4,69 mmol TE /g dw) методи. Като цяло метаноловите екстракти с 30 минути екстракция показват най-високото общо фенолно съдържание, докато 10 минути време за екстракция е най-малко. От друга страна, антиоксидантната активност на екстрактите е най-висока при 20 минути екстракция, с изключение на метода CUPRAC, където 30 минути екстракция показва по-голям антиоксидантен капацитет.

7. Bojilov, D., Dagnon, S., Kostadinov, K., & Filipov, S. (2020). Polyphenol composition of lettuce cultivars affected by mineral and bio-organic fertilization. *Czech Journal of Food Sciences*, 38(6), 359–366. <https://doi.org/10.17221/97/2020-CJFS>

**Резюме:** Три вида растения *Lactuca sativa* L. (зелени марули *Batavia* cv. *Maritima* и cv. *Winter Butterhead*, червена маруля *Lolo rosa* cv. *Tuska*) са изследвани за техния полифенолен състав. Салатите са отглеждани в полиетиленови оранжерии и са третирани с различни торове. Качественият и количественият полифенолен състав беше оценен според използването на минерални, органични (*Italpollina* и *Arkobaleno*) и био (*Lombricompost* и *EKOprop NX*) торове. Отделните полифенолни компоненти (кофеоил производни и кверцетин гликозиди) бяха определени чрез високоефективна течна хроматография и разликите в пробите бяха оценени. Разликите в съдържанието на полифеноли в сортовете зелена салата в зависимост от торенето са много по-големи от тези в червения сорт. Като цяло червеният сорт *Lolo rosa* cv. *Tuska* се характеризира с най-високо съдържание на полифеноли. Най-високо съдържание на всички компоненти е установено в пробите от червена салата с използване на органичен тор Аркобалено. При червената маруля и зелената салата cv. *Winter Butterhead* органичното торене води до по-високо съдържание на полифеноли в сравнение с минералното торене и неторените проби. Изключение се наблюдава при cv. *Maritima*, където неторените проби показват по-високо съдържание на полифеноли в сравнение с торените проби.

8. Mollova, S., Fidan, H., Antonova, D., Bozhilov, D., Stanev, S., Kostova, I., & Stoyanova, A. (2020). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subspecies essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 44(4), 371–378. <https://doi.org/10.3906/tar-1909-34>

**Резюме:** Изследвани са химичният състав и антимикробната и антиоксидантна активност на етерични масла от два подвида *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don, отглеждани в България. В резултат на това чрез GC/MS са открити 95 съединения с концентрации над 0,05% и са идентифицирани 46 от тях, главно моно- и сесквитерпени, представляващи 79,81% и 85,51% от общото съдържание на пробите. Основните съставки на етеричното масло от *Helichrysum italicum subsp. microphyllum* (растителен произход от Босна) са монотерпен  $\alpha$ -пинен (20,84%) и сесквитерпен  $\gamma$ -куркумен (16,53%), следвани от  $\beta$ -селинен (5,59%), *ar*-куркумен (4,39%), *trans*-кариофилен (4,35%),  $\beta$ -дикетон италидион I (4,32%),  $\alpha$ -селинен (4,28%) и нерил ацетат (3,81%). Сесквитерпените въглеродороди са доминиращите групи химични съставки в етеричното масло, следвани от кислород съдържащи алифатни въглеродороди. Основните съставки в етеричното масло от *H. italicum* (растителен произход от Франция) са нерил ацетат (33,87%),  $\gamma$ -куркумен (8,84%), розифолиол (5,46%), геранил пропионат (4,98%), *ar*-куркумен (4,31%), италидион I (3,56%),  $\alpha$ -еудесмол (3,19%) и лимонен (3,02%). Основният клас химични съединения са кислород съдържащи монотерпени, следвани от сесквитерпените въглеродороди. Етеричното масло от *H. italicum* от Франция показва по-изразена антимикробна активност срещу грам-положителните бактерии *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* и гъбичките *Aspergillus brasiliensis*, както и по-силен антиоксидантен потенциал.

9. Manolov, S., Ivanov, I., & Bojilov, D. (2021). N-(2,2-Diphenylethyl)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanamide Stanimir. *Molbank*, 2021(3), M1257.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/M1257>

**Резюме:** N-(2,2-Дифенилетил)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропанамид се получава при реакция на 2,2-дифенилетан-1-амин и напроксен с висок добив. Новополученото производно на напроксен беше напълно анализирано и характеризирано чрез  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , UV, IR и масспектрални данни.

10. Dragoev, S., Vlahova-Vangelova, D., Balev, D., Bozhilov, D., & Dagnon, S. (2021). Valorization of waste by-products of rose oil production as feedstuff phytonutrients. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 27(1), 209–219.

<https://doi.org/10.31220/osf.io/cdf9b>

**Резюме:** Цветовете на розата (*Rosa damascena* Mill.) се характеризират със силен антиоксидантен капацитет и антибактериална активност. Поради това се предполага, че страничните продукти и отпадъците от маслодайна роза могат да се разглеждат като естествени източници на антиоксиданти. От тази гледна точка целите на това изследване бяха да се определят възможностите за валоризация на сухо пресовани дестилirани розови листенца като фитонутриенти във фуражите в животновъдството, да се проучи химичният състав и активността за отстраняване на радикалите на полифенолния комплекс в розата (*Rosa damascena* Mill.) отпадъчни продукти, за идентифициране и количествено определяне на полифенолния състав в сухи листенца от роза, сухо пресовани дестилirани листенца от роза и отпадъчна вода (течна водна фаза след дестилация). Полифенолният състав в сухи розови листенца, сухо пресовани дестилirани розови листенца и отпадъчни води след дестилация беше идентифициран и



количествено определен. Чрез HPLC-PDA и LC-MS тринадесет гликозида на кемпферол, десет гликозида на кверцетин, шест гликозида на галова киселина и двата флавонолови агликона са идентифицирани в сухи листенца от роза. Тези полифеноли притежават висока антиоксидантна активност и в зависимост от дозата и продължителността на угояването се очаква да имат положително влияние върху растежа на прасета, бройлери и агнета.

11. Manolov, S., Ivanov, I., & Bojilov, D. (2021). Microwave-assisted synthesis of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline sulfonamide derivatives and their biological evaluation. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 86(2), 139–151.

<https://doi.org/10.2298/JSC200802076M>

**Резюме:** В настоящата статия се докладва алтернативен екологичен метод за синтез на 1,2,3,4-тетрахидроизохинолин сулфонамидни производни. Всички получени съединения са изследвани за тяхното *in vitro* инхибиране на денатурацията на албумин, антиоксидантна, антитриптична и антибактериална активност и показват значителни резултати. Липофилността бе установена с използване на тънкослойна хроматография с обръната фаза и *in silico* изчисления.

12. Manolov, S., Ivanov, I., Bojilov, D., & Yuliyana Voinikov. (2021). Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and anti-arthritic activity of new ibuprofen derivatives. *Bulgarian Chemical Communications*, 53(1), 66–71.

<https://doi.org/10.34049/bcc.53.1.5320>

**Резюме:** Тук представяме синтеза и *in vitro* противовъзпалителните, антиоксидантните и антиартритните активности на нови производни на ибупрофен. Всички структури бяха потвърдени чрез спектрален анализ ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR, UV, IR и HRMS). Липофилността бе установява с помощта на тънкослойна хроматография с обръната фаза и *in silico* изчисления. Противовъзпалителната и антиартритната активност корелират с липофилността на съединенията.

13. Manolov, S., Ivanov, I., & Bojilov, D. (2021). *N*-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanamide. *Molbank*, 2021(1), M1187.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/M1187>

**Резюме:** Заглавното съединение се получава с висок добив при реакция между триптами и напроксен. Новосинтезираното производно на напроксен беше напълно анализирано и характеризирено чрез  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, UV, IR и масспектрални данни.

14. Manolov, S., Ivanov, I., & Bojilov, D. (2021). *N*-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-2-(2-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propanamide. *Molbank*, 2021, M1177.

<https://doi.org/10.3390/M1177>

**Резюме:** *N*-(2-(1H-Индол-3-ил)етил)-2-(2-флуоро-[1,1'-бифенил]-4-ил)пропанамид се получава чрез реакция между триптами и флурбипрофен, като се използва *N,N'*-дициклохексилкарбодимид, като свързващ агент. Полученият нов амид има фрагмент, подобен на Brequinar, съединение, използвано в опити за лечение на SARS-CoV-2. Новосинтезираното съединение беше напълно анализирано и характеризирено чрез  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR, UV, IR и масспектрални данни.

15. Manolov, S., Ivanov, I., & Bojilov, D. (2021). *N*-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-2-(2-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propanamide. *Molbank*. <https://doi.org/10.3390/M1260>

**Резюме:** *N*-(Бензо[d]тиазол-2-ил)-2-(2-флуоро-[1,1'-бифенил]-4-ил)пропанамид се получава чрез реакция между бензо[d]тиазол-2-амин и флурбипрофен с висок добив. Новополученото производно на флурбипрофен беше напълно анализирано и характеризирано чрез  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , UV, IR и масспектрални данни.

16. Manolov, S., Ivanov, I., & Bojilov, D. (2022). ( $\pm$ )-2-(2-Fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-*N*-(1-phenylpropan-2-yl)propanamide. *Molbank*, 2022(1), M1319. <https://doi.org/10.3390/M1319>

**Резюме:** 2-(2-флуоро-[1,1'-бифенил]-4-ил)-*N*-(1-фенилпропан-2-ил)пропанамид се синтезира чрез реакция между амфетамин и флурбипрофен с високи добиви. Новополучената хибридна молекула беше напълно анализирана и характеризирана чрез  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , UV, IR, HPLC и масспектрални данни.

17. Manolov, S., Ivanov, I., Bojilov, D., & Nedialkov, P. (2022). Synthesis, in silico, and in vitro biological evaluation of new furan hybrid molecules. *Processes*, 10(10), 1997. <https://doi.org/10.3390/pr10101997>

**Резюме:** Тук докладваме за синтеза на нови хибридни молекули между фуран и *N*-съдържащи хетероциклични съединения като пиролидин, 1,2,3,4-тетрахидрохинолин, 1,2,3,4-тетрахидроизохинолин и пиперидин. Получените съединения бяха напълно характеризирани с помощта на  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -NMR, UV-Vis и HRMS спектри. Всички съединения бяха оценени за тяхната противовъзпалителна, антиартритна, антиоксидантна, редуцираща и хелатираща активност. По-малко липофилните молекули Н2 ( $60.1 \pm 8.16$ ) и Н4 ( $62.23 \pm 0.83$ ) имат почти 12 пъти по-висока АТА в сравнение с използвания стандарт кетопрофен ( $720.57 \pm 19.78$ ). резултатите от инхибирането на денатурацията на албумина прави новополучените хибриди потенциални противовъзпалителни лекарства, тъй като изразените стойности са по-високи от стандарта кетопрофен ( $126.58 \pm 5.00$ ), с изключение на Н3 ( $150.99 \pm 1.16$ ). И четирите съединения показват значителна активност по отношение на *in vitro* биологичните активности, което ги прави чудесни кандидати за потенциални бъдещи лекарства.

18. Manolov, S., Ivanov, I., & Bojilov, D. (2022). Synthesis of New 1,2,3,4-Tetrahydroquinoline Hybrid of Ibuprofen and Its Biological Evaluation. *Molbank*, 2022(M1350). <https://doi.org/10.3390/M1350>

**Резюме:** Тук докладваме получаването на 1-(3,4-дихидрохинолин-1(2H)-ил)-2-(4-изобутилфенил) пропан-1-он и неговото характеризиране. Новополученият хибрид и неговите производни (хибриди на ибупрофен с 1,2,3,4-тетрахидроизохинолин и пиперидин) бяха изследвани за тяхната *in vitro* антиоксидантна, антитриптична и инхибиране денатурацията на албумин активност. Липофилността бе установена с използване на тънкослойна хроматография с обърната фаза и *in silico* изчисления.

19. Manolov, S., Ivanov, I., Bojilov, D., & Nikolova, G. (2023). ( $\pm$ )-*N*-(3-Chlorophenethyl)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanamide. *Molbank*, 2023, M1625. <https://doi.org/10.3390/M1625>



**Резюме:** Тук докладваме синтеза на ( $\pm$ )-*N*-(3-хлорофенетил)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропанамид в реакцията между 2-(3-хлорофенил)етан-1-амин и ( $\pm$ )-напроксен. Новополучената биофункционална хибридна молекула беше напълно характеризирана чрез  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, UV, IR и масспектрални данни.

20. Manolov, S., Ivanov, I., Bojilov, D., & Kalinova, Y. (2023). *N*-(3-Chlorophenethyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide. *Molbank*, 2023(1), M1536.

<https://doi.org/10.3390/M1536>

**Резюме:** *N*-(3-хлорофенетил)-2-(4-изобутилфенил)пропанамид е синтезиран за първи път в реакцията между 2-(3-хлорофенил)етан-1-амин и 2-(4-изобутилфенил)пропаноил хлорид с висок добив. Новополученото хлорсъдържащо производно на ибупрофен беше напълно анализирано и характеризирано с помощта на  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR, UV и масспектрални данни.

21. Mollova, S., Dzhurmanski, A., Fidan, H., Bojilov, D., Manolov, S., Dincheva, I., Stankov, S., Stoyanova, A., Ercisli, S., Assouguem, A., Marc, R. A., Ullah, R., & Bari, A. (2023). Chemical Composition of Essential Oils from *Nepeta transcaucasica* Grossh. and *Nepeta cataria* L. Cultivated in Bulgaria and Their Antimicrobial and Antioxidant Activity. *ACS Omega*, 8(17), 15441–15449.

<https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00704>

**Резюме:** Родът *Nepeta*, принадлежащ към семейство Lamiaceae, включва около 300 вида, повечето от които се използват в народната медицина поради изразените си биологични свойства. Целта на настоящото изследване е да се оценят агробиологичните характеристики на *Nepeta transcaucasica* (*N. transcaucasica*) Grossh. и *Nepeta cataria* (*N. cataria*) L., култивирани в България, и получаване на техните етерични масла и определяне на тяхната антимикробна и антиоксидантна активност. Анализирани са агробиологичните характеристики на двата вида, растящи в Казанлък; следователно беше показана висока вариабилност в популацията на *N. transcaucasica* и сравнителна хомогенност в *N. cataria*. Видът *N. transcaucasica* съдържа 0,28% етерично масло с основни компоненти  $\beta$ -цитронелол (52,05%), евкалиптол (7,34%),  $\beta$ -цитронелал (6,06%), гермакрен D (5,45%), (*Z*)- $\beta$ -оцимен (5,14%) и  $\beta$ -кариофилен (3,06%). Видът *N. cataria* се състои от 0,19% етерично масло с основни компоненти  $\beta$ -цитронелол (26,31%), гераниол (15,92%), нерал (11,45%), нерол (9,56%), карвакрол (6,04%) и  $\beta$ -цитронелал (5,35%). Определена е антибактериалната активност срещу грам-положителни бактерии *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* и грам-отрицателни бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*) и *Salmonella enterica subsp enterica serovar Abony*. Етеричните масла показват антимикробна активност само срещу *E. coli*. Установено е, че диаметрите на зоните на инхибиране са 26 mm за вида *N. transcaucasica* и 10 mm за вида *N. cataria*. Антиоксидантната активност на двете етерични масла е определена с четири различни метода, DPPH, ABTS, FRAP и CUPRAC. ABTS метода показва най-високи стойности на спрямо тролокс - *N. transcaucasica* (48,72  $\mu\text{M TE/mL}$ ) и вид *N. cataria* (310  $\mu\text{M TE/mL}$ ).

22. Manolov, S., Ivanov, I., Bojilov, D., & Nedialkov, P. (2023). Synthesis, In Vitro Anti-Inflammatory Activity, and HRMS Analysis of New Amphetamine Derivatives. *Molecules*, 28(1), 151. <https://doi.org/10.3390/molecules28010151>

**Резюме:** Тук съобщаваме за получаването на нови хибридни молекули на амфетамин с различни профени (амфени). Получените амфени се характеризират с техните точки на топене, UV,  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR и HRMS спектри. Извършен е пълен и подробен масспектрален анализ на новополучените производни на амфетамин с ибупрофен, флурбипрофен, кетопрофен, напроксен и карпрофен. *In vitro* инхибиране на денатурацията на албумин на всяко ново съединение беше оценено и те показаха значителна активност. Стойностите на  $\text{IC}_{50}$  на получените производни на амфетамин-профен варират от 92,81 до 159,87  $\mu\text{g/mL}$ . Това показва, че новите хибриди наследяват противовъзпалителните свойства на профените. Използвайки *in silico* метод, беше изчислена и токсичността. Получените резултати са дадени в стойности на  $\text{LD}_{50}$ . В зависимост от начина на приложение амфените са по-малко токсични в сравнение със стандарта амфетамин.

23. Bojilov, D., Manolov, S., Nacheva, A., Dagnon, S., & Ivanov, I. (2023). Characterization of Polyphenols from *Chenopodium botrys* after Fractionation with Different Solvents and Study of Their In Vitro Biological Activity. *Molecules*, 28(2), 4816. <https://doi.org/10.3390/molecules28124816>

**Резюме:** В настоящата работа изследвахме полифенолния състав на *Chenopodium botrys* от България. Полифенолите се фракционират с разтворители с различна полярност (*n*-хексан, хлороформ, етилацетат и *n*-бутанол). Фракциите се анализират чрез HPLC-PDA и UHPLC-MS. Етилацетатната фракция съдържа моно- и ди-гликозиди на кверцетин, ди-гликозиди на кемпферол и изорамнетин и моногликозиди на хиспидулин и яцеозидин. Идентифицирахме кверцетин тригликозиди в бутаноловата фракция. Съдържанието на кверцетин гликозиди в етил ацетатната и бутаноловата фракции е съответно 168,82 mg/g Extr и 67,21 mg/g Extr. Основните компоненти на полифенолния комплекс в *C. botrys* са 6-метоксифлавонони (355,47 mg/g Extr), които са открити в хлороформената фракция. Флавоноидите пектолинаригенин, деметилнобилетин и изосинсенсетин и гликозидите на кверцетин (тригликозиди, ацилгликозиди), кемпферол, изорамнетин, хиспидулин и яцеозидин са открити и докладвани за първи път в *Chenopodium botrys*. Използвахме *in vitro* методи за оценка на биологичната активност срещу оксидативен стрес (активност за отстраняване на водороден пероксид (HPSA) и активност на отстраняване на хидроксилни радикали (HRSA)), нитрозативен стрес (активност на отстраняване на азотен оксид (NOSA)), противовъзпалителна активност (IAD ) и антитриптична активност (ATA). Моно- и ди-гликозидите на кверцетин показват по-високи стойности за HPSA и HRSA ( $\text{IC}_{50} = 39,18, 105,03 \mu\text{g/mL}$ ), докато 6-метоксифлавононите имат по-висока NOSA ( $\text{IC}_{50} = 146,59 \mu\text{g/mL}$ ). Същите компоненти показват най-високата ATA ( $\text{IC}_{50}$ , варираща от 116,23 до 202,44  $\mu\text{g/mL}$ ).

24. Manolov, S., Bojilov, D., Ivanov, I., Marc, G., Bataklijeva, N., Oniga, S., Oniga, O., & Nedialkov, P. (2023). Synthesis, Molecular Docking, Molecular Dynamics Studies, and In Vitro Biological Evaluation of New Biofunctional Ketoprofen Derivatives with Different *N*-Containing Heterocycles. *Processes*, 11(6), 1837. <https://doi.org/10.3390/pr11061837>

**Резюме:** Тук докладваме за синтеза на четири нови хибридни молекули между кетопрофен или 2-(3-бензоилфенил)пропанова киселина и *N*-съдържащи хетероцикленни съединения, като пиперидин, пиролидин, 1,2,3,4-тетрахидрохиолин и 1,2,3,4-тетрахидроизохиолин. Получените хибридни съединения бяха пълно характеризирани с помощта на  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -NMR, UV-Vis и HRMS спектри. Направен е подробен HRMS анализ на всички нови хибридни молекули. Съединенията бяха оценени за тяхната *in vitro* противовъзпалителна и антиоксидантна активност. Липофилността на хибридите беше определена както теоретично (cLogP), така и експериментално ( $R_M$ ). Афинитетът на съединенията към човешкия серумен албумин беше оценен *in silico* чрез молекулен докинг с използване на два софтуера и стабилността на предвидените комплекси бе оценена чрез изследване на молекулната динамика. Всички нови хибриди показват много добра HPSA активност, статистически близка до стандарта кверцетин. Молекулният докинг потвърди получените *in vitro* резултати. Тетрахидрохиолиново производно 3c и тетрахиоизохиолиново производно 3d имат най-висок афинитет към албумин. Те показват по-силно противовъзпалително действие от своя предшественик кетопрофен и често използвания ибупрофен.

## II. Публикации в научни специализирани списания без импакт фактор

25. Christoskova, S. G., Stoyanova, M. K., Dimitrov, D. Y., Vojilov, D. G., & Ivanov, K. I. (2009). New oxide systems for catalytic abatement of volatile organic compounds and CO in waste gases. *Journal of International Scientific Publication: Ecology and Safety*, 3(2), 179–187.

**Резюме:** Изследван е стимулиращият ефект на Ag върху каталитичното поведение на NiOx и CoOx, в реакция на пълно окисление на CH<sub>3</sub>OH, както и на смес от CH<sub>3</sub>OH, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O и CO основни компоненти на отпадъчни газове от производството на формалдехид. Каталитичните проби са синтезирани чрез термично разлагане на нитратни соли на съответните метали във въздух. Получените резултати показват, че с помощта на изследваните катализатори се постига пълно каталитично разрушаване на летливи органични съединения до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O и окисление на CO до CO<sub>2</sub>. Модификацията на отделните NiOx и CoOx силно влияе върху активността на каталитичните системи, предизвиквайки понижаване на температурата за пълно превръщане на CH<sub>3</sub>OH, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O и CO в безвредни продукти. Всъщност реакционната температура за различните изследвани газове е както следва: за CH<sub>3</sub>OH - 160 - 180 °C в зависимост от катализатора; за CO - 240 °C, и 300 °C за (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O.

26. Topova, S., Vojilov, D., Dagnon, S., & Argirov, O. (2014). Hydroxypyridine Formation In Model System Monosodium Glutamate And 2-Furfural. *Applied Science Reports*, 6(2), 71–77. <https://doi.org/10.15192/PSCP.ASR.2014.2.2.7177>

**Резюме:** Мононатриевата сол на глутаминовата киселина е одобрена в Европа като хранителна добавка E 621. Тя засилва действието на други вкусово активни съединения, като подобрява общия вкус на определени храни. Съществува и взаимодействие между E 621 и трапезната сол (натриев хлорид) и други умами вещества като нуклеотиди. Целта на настоящото изследване е да се моделира реакция тип Maillard на E 621 с въглехидрати по време на обработката на храната и да се анализират продуктите от това

взаимодействие. образуването на N-съдържащи хетероциклични съединения като хидроксипиридини, имидазол, пиразин и пиразион е обща характеристика на реакцията на Maillard, протичаща при температури, типични за обработката на храни. образуването на 3-хидроксипиридин се наблюдава като реакционен продукт между E 621 и фурфурал при продължително, но не и при краткотрайно нагриване. Същото съединение беше идентифицирано като 3-хидроксипиридин, като се използва HPLC с обърната фаза. Концентрацията на 3-хидроксипиридин в реакционната смес е 1 ppm, изчислена чрез регресионен анализ. Обсъжда се възможният механизъм на тази реакция.

27. Bojilov, D. G., Simeonova, Z. B., Solakov, N. Y., Angelova-Romova, M. Y., Tsvetanova, V. M., & Ivanov, I. I. (2014). Chemical composition of *Gleditsia triacanthos* L.-application in phytotherapy of socially significant diseases. *Journal of International Scientific Publications: Materials, Methods and Technologies*, 8, 382–392. <https://www.scientific-publications.net/en/article/1000186/>

**Резюме:** Разглеждат се изолирането и идентифицирането на биологично активни вещества от лечебното растение *Gleditsia triacanthos* L. Разработването на методи за получаване на медицински екстракти от *Gleditsia triacanthos* L. е от практическо значение в медицината за профилактика на заболявания на сърдечно-съдовата система, спазмолитици и лекарства, действащи върху жлъчката, както и в медицинската козметика.

28. Milina, R., Mustafa, Z., Bojilov, D., Dagnon, S., & Moskovkina, M. (2016). Determination and discrimination of biodiesel fuels by gas chromatographic and chemometric methods. *Acta Scientifica Naturalis*, 3(1), 25–32. <https://doi.org/10.1515/asn-2016-0004>

**Резюме:** Методът за разпознаване на образи (PRM) беше приложен към данни от газова хроматография (GC) за състав на метилови естери на мастни киселини (FAME) на търговски и лабораторно синтезирани биодизелови горива от растителни масла, включително слънчогледово, рапично, царевично и палмово масло. Бяха сравнени два GC количествени метода за изчисляване на индивидуалните характеристики: % на площта и вътрешен стандарт. И двата метода са приложени за анализ на два сертифицирани референтни материала. Статистическата обработка на получените резултати демонстрира точността и прецизността на двата метода и позволява съпоставянето им. За по-нататъшни хемометрични изследвания на биодизелови горива чрез техните FAME-профили може да се използва всеки от тези методи. Резултатите от PRM на профилите на FAME на проби от различни растителни масла показват успешно разпознаване на биодизелите според суровината. Получената информация може да се използва за избор на суровина за производство на биодизели с определени свойства, за оценка на тяхната взаимозаменяемост, за разлив на гориво и възстановителни действия в околната среда.

29. Edreva, A., Vitkova, A., Dagnon, S., Konakchiev, A., Gesheva, E., & Bojilov, D. (2017). Field-cultivated medicinal plants of *Achillea millefolium* group: a source of bioactive compounds. *Genetics and Plant Physiology*, 7(1–2), 22–33. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/d807/9dc49e9ae3b557fd9706c84d1984eca58372.pdf>

**Резюме:** Лечебните растения от групата на *Achillea millefolium* в българската диворастваща флора намират широко приложение както в традиционната медицина, така и във фармацевтичната, козметичната и хранителната промишленост. Те се събират интензивно от естествените местообитания, което води до редица негативни ефекти, като екологичния риск от изчезване на местни източници и високата хетерогенност на събраните пазарни проби. Проучихме възможностите за полево култивиране на диви видове от група *A. millefolium* като обещаващ подход за производство на хомогенни проби от ценни растения без увреждане на естествената среда. Нашите предварителни проучвания идентифицираха като перспективни два вида от група *A. millefolium* в България - *A. collina* и *A. asplenifolia*. Изследвани са видовете *A. collina* и *A. asplenifolia*, всеки с по две популации, като за стандарт е използван св. „Proa”, създаден за отглеждане. Семената са събрани от естествените местообитания, а тези на св. Proa са закупени от фирма „Pharmasaat GmbH”, Германия. Разсадът е произведен в оранжерия и след това е пренесен в опитното поле на Института по физиология на растенията и генетика край София. Растенията се събират на етап пълен цъфтеж. Определят се добивът на етерично масло и съдържанието на хамазулен в маслото, съдържанието на общи флавоноиди и хлорогенова (3-О-кафеоил хининова) киселина, както и антирадикална и антиоксидантна активност. Беше извършен анализ на основните компоненти (РСА) на данните. Резултатите показват, че отглежданите на полето растения от изследваната група *A. millefolium* произвеждат значителни количества биоактивни съединения, особено флавоноиди и хлорогенова киселина, които корелират силно с антирадикалната активност. РСА посочи свързаността на популациите в рамките на всеки вид и отдалечените позиции на вида. Популациите на *A. asplenifolia* се отличават с по-високо съдържание на общи флавоноиди, етерично масло, хамазулен и хлорогенова киселина, както и с по-висока антирадикална и антиоксидантна активност в сравнение с *A. collina*, като същевременно са по-близки по всички параметри до св. „Proa“. Данните сочат *A. asplenifolia* като обещаващ вид за полево отглеждане.

30. Dagnon, S., Bojilov, D., Docheva, M., & Edreva, A. (2018). The Relationship between Main Polyphenol Components and Free Radical Scavenging Activity of Selected Medicinal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 10(03), 131–138. <https://doi.org/10.25004/IJPSDR.2018.100305>

**Резюме:** Това проучване изследва връзките между основните полифеноли и DPPH радикална активност (RSA) в екстракти от някои от най-често срещаните диви и култивирани видове от групата *Achillea millefolium*, *Mentha*, *Chenopodium botrys*, *Clinopodium vulgare* и *Artemisia vulgaris*. Друг аспект на изследването е ефектът от избора на екстракционен разтворител, подчертавайки значението на избора на подходящ такъв за получаване на екстракти с максимална проявена биоактивност. Извършва се химическо характеризирание на съединенията. Базира се на HPLC-PDA профили на пръстови отпечатъци, получени от 70% водни метанолови екстракти. Установено е, че хидроксиканелените киселини, гликозидите на лутеолин (LG), апигенин (AG), техните агликони и метоксифлавоноиди са най-разпространените компоненти, които имат най-голямо въздействие върху радикалната активност (RSA) на екстрактите. Данните позволяват да се предположи висока корелационна връзка между кафеоилхиноните



киселини и RSA на екстракти от четири вида от група *A. millefolium* и *cv. Proa. Cl. vulgare* метанолов екстракт, богат на розмаринова киселина, LG и AG, показва най-висок RSA с  $IC_{50}$   $10.37\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . За разлика от тях, екстракти от *Ch. botrys*, които нямат фенолни киселини, съдържат малко количество гликозиди и са богати на метоксифлаволи, притежават много слаб RSA. За многокомпонентен анализ нашите данни предполагат 70% метанол като най-подходящ разтворител за екстракция на съединения, принадлежащи към полифенолния комплекс. Въз основа на високите количества розмаринова киселина, лутеолин и апигенин гликозиди, е установено, че 66% разтворител етанол е най-добрият избор за екстракти за медицинска консумация.

31. Bojilov, D. G., Manolov, S. P., Bazadzhiev, B. V., Stremiski, J. I., & Ivanov, I. I. (2018). Antioxidant activity in two species common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from village of Smilyan, Bulgaria. *Journal of International Scientific Publication: Agriculture & Food*, 6, 314–324. <https://www.scientific-publications.net/en/article/1001751/>

**Резюме:** Смилянският фасул, една от малкото български храни, защитени с патент за отглеждането му в района на горното поречие на река Арда. Смилянският фасул има уникален вкус и е известен както в България, така и в чужбина. Обикновеният фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) от два различни сорта от с. Смилян беше смятан, ситово анализиран и оценен за антиоксидантна активност.

32. Manolov, S. P., Ivanov, I. I., Mollov, V. A., & Bojilov, D. G. (2019). Synthesis and *in silico* study of new ketoprofen derivatives. *Materials, Methods & Technologies*, 13, 250–061. <https://www.scientific-publications.net/get/1000036/1568823180682021.pdf>

**Резюме:** Кетопрофенът е широко разпространено нестероидно противовъзпалително средство, използвано при лечение на остра болка и хроничен артрит. От друга страна, изохинолиновите алкалоиди са много добре известни с широкия си спектър от биологични действия. От тази гледна точка за нас е интересно да получим нови изохинолини, съдържащи в структурата си кетопрофенов остатък, като нови вещества с потенциална биологична активност. За да се оцени общата ефикасност и безопасност на новополучените съединения, е оценен техният биологичен потенциал.

33. Bojilov, D. G., Manolov, S. P., Ivanov, I. I., & Mollova, S. L. (2019). Investigation of antioxidant activity of different extracts of *Helichrysum italicum* from Bulgaria. *Journal of International Scientific Publications: Materials, Methods & Technologies*, 13, 241–249. Retrieved from <https://www.scientific-publications.net/en/article/1001898/>

**Резюме:** *Helichrysum italicum* от семейство Сложноцветни (*Asteraceae*) от много години се използва в народната медицина за превантивни цели и за възстановяване на организма след инфаркт. Растителният материал от *H. italicum* е предоставен от Института по розата и етеричномаслените култури, Казанлък, България. Антиоксидантната активност на различни екстракти от *H. italicum* е оценена чрез различни методи, като ABTS, CUPRAC, FRAP и DPPH.

34. Miladinova, R. R., Manolov, S. P., Ivanov, I. I., & Bojilov, D. G. (2021). Green synthesis of new hybrid molecules of ibuprofen and 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline.



---

*Journal of International Scientific Publications Materials, Methods and Technologies*, 15, 195–201. <https://www.scientific-publications.net/en/article/1002211/>

**Резюме:** Тук докладваме екологичен метод за синтез на 1,2,3,4-тетрахидроизохинолинови производни на ибупрофен. И петте новополучени съединения са напълно характеризирани с техните  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR, IR, HRMS и са интересни за целите на изследване на тяхната биологична активност.

35. Manolov, S. P., Ivanov, I. I., & Bojilov, D. G. (2021). *In vitro* and *in silico* biological activity of new ibuprofen hybrids. *Journal of International Scientific Publications Materials, Methods and Technologies*, 15, 202–211. <https://www.scientific-publications.net/en/article/1002212/>

**Резюме:** Тук докладваме биологичната оценка на нови хибриди на 1,2,3,4-тетрахидроизохинолин с ибупрофен. Хибридите се изследват за тяхното *in vitro* инхибиране на денатурацията на албумин, антиоксидантна и антитриптична активност. Тестваните съединения са показали значителни резултати. Липофилността бе установена с тънкослойна хроматография с обърната фаза, както и с помощта на *in silico* изчисления.

Група показатели	Съдържание	Доцент	Точки
В	Georgieva, K., Dagnon, S., Gesheva, E., <b>Bojilov, D.</b> , Mihailova, G., & Doncheva, S. (2017). Antioxidant defense during desiccation of the resurrection plant <i>Haberlea rhodopensis</i> . <i>Plant Physiology and Biochemistry</i> , 114, 51–59.	Q1	25
	Dagnon, S., Novkova, Z., <b>Bojilov, D.</b> , Nedialkov, P., & Kouassi, C. (2019). Development of surrogate standards approach for the determination of polyphenols in <i>Vernonia amygdalina</i> Del. <i>Journal of Food Composition and Analysis</i> , 82, 103231.	Q1	25
	<b>Bojilov, D.</b> , Dagnon, S., Kostadinov, K., & Filipov, S. (2020). Polyphenol composition of lettuce cultivars affected by mineral and bio-organic fertilization. <i>Czech Journal of Food Sciences</i> , 38(6), 359–366.	Q3	15
	Mollova, S., Fidan, H., Antonova, D., <b>Bozhilov, D.</b> , Stanev, S., Kostova, I., & Stoyanova, A. (2020). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G.Don subspecies essential oils. <i>Turkish Journal of Agriculture and Forestry</i> , 44(4), 371–378.	Q1	25
	Dragoev, S., Vlahova-Vangelova, D., Balev, D., <b>Bozhilov, D.</b> , & Dagnon, S. (2021). Valorization of waste by-products of rose oil production as feedstuff phytonutrients. <i>Bulgarian Journal of Agricultural Science</i> , 27(1), 209–219.	Q3	15
	Mollova, S., Dzhurmanski, A., Fidan, H., <b>Bojilov, D.</b> , Manolov, S., Dincheva, I., ... Bari, A. (2023). Chemical Composition of Essential Oils from <i>Nepeta transcaucasica</i> Grossh. and <i>Nepeta cataria</i> L. Cultivated in Bulgaria and Their Antimicrobial and Antioxidant Activity. <i>ACS Omega</i> , 8(17), 15441-15449.	Q1	25
	<b>Bojilov, D.</b> , Manolov, S., Nacheva, A., Dagnon, S., & Ivanov, I. (2023). Characterization of Polyphenols from <i>Chenopodium botrys</i> after Fractionation with Different Solvents and Study of Their In Vitro Biological Activity. <i>Molecules</i> , 28(2), 4816.	Q1	25

## Разширена хабилитационна справка

### Съдържание

<b>1. Въведение</b> .....	18
<b>2. HPLC-PDA анализ на полифеноли</b> .....	18
2.1. Хроматографски профили „пръстов отпечатък“ ( <i>fingerprints</i> ) на нехидролизирани екстракти. ....	18
2.2. Хроматографски профил на родопски силивряк ( <i>Habbarlea rhodopensis</i> ) и количествено определяне на основните компоненти. Влияние на условията на засушаване върху полифенолния състав. ....	19
2.3. Хроматографски профил на <i>Vernonia amygdalina</i> Del. и количествено определяне на основните компоненти. Използване на сурогатни стандарти и UV спектри за идентифициране на полифенолите. ....	21
2.4. Хроматографски профил на <i>Rosa damascena</i> Mill и количествено определяне на основните компоненти. ....	23
2.5. Хроматографски профил на <i>Lactuca</i> spp. и количествено определяне на основните компоненти. ....	24
2.6. Хроматографски профил на фракционирания полифенолен състав на огниче ( <i>Chenopodium botrys</i> ) и количествено определяне. ....	27
<b>3. Идентификация на полифеноли чрез UHPLC-MS</b> .....	28
3.1. Идентификация на полифенолите от <i>Habbarlea rhodopensis</i> .....	28
3.2. Идентификация на полифенолите от <i>Vernonia amygdalina</i> Del .....	29
3.3. Идентификация и структурно характеризиране на полифенолите от <i>Rosa damascena</i> Mill. 30	
3.4. Идентификация и структурно характеризиране на полифенолите от <i>Chenopodium botrys</i> . 30	
<b>4. GC-MS анализ на етерично масло</b> .....	36
4.1. Състав на етеричното масло от <i>Nepeta</i> spp. ....	36
<b>5. Изследване <i>in vitro</i> биологична активност</b> .....	37
5.1. Изследване на антиоксидантната активност.....	37
5.1.1. Изследване антиоксидантната активност на етерични масла от <i>Helichrisum italicum</i> и <i>Nepeta</i> spp. ....	38
5.1.2. Изследване на антиоксидантната активност на фракционирания полифенолен състав от <i>Chenopodium botrys</i> . ....	39
5.2. Изследване <i>in vitro</i> на противовъзпалителна и анти-артритна активности на фракционирания полифенолен състав от <i>Chenopodium botrys</i> .....	41
<b>6. Самооценка на приносите</b> .....	43
<b>7. Използвана литература</b> .....	46

## 1. Въведение

Научно-изследователската ми дейност е свързана с разработване и оптимизиране на хроматографски условия с цел получаване на пръстов отпечатък “*fingerprint*” на полифенолния комплекс на медицински растения и храни с важно биологично значение. Това включва и идентифициране на вторични метаболити (полифеноли и компоненти на етерични масла) с помощта на мас спектрални методи – GC-MS и UHPLC-MS/MS.

Изследван е полифенолният комплекс на *Habarlea rhodopensis*, *Chenopodium botrys*, *Vernonia amygdalina*, *Rosa damascena* Lactuca spp – *Lactuca sativa* Batavia cv. *Maritima*, *Lolo rosa* cv. *Tuska* и cv. *Winter Butterhead*. Това включва анализ, идентификация, количествено определяне на основните полифенолни компоненти и *in vitro* биологична активност. Освен това е изследван съставът на етеричното масло на *Nepeta transcaucasica* и *Nepeta cataria*. Оценена е антиоксидантната активност на етеричните масла от *Helichrysum italicum* и двата вида *Nepeta* spp.

Полифенолите играят изключително важна роля в защитните механизми на растенията от различни стресови фактори. Именно полифенолите са силни антиоксиданти и предпазват възкръсващите растения от оксидативния стрес и смърт при екстремни условия като например засушаване. Агроклиматичните и почвените условия са важни фактори, които оказват влияние върху съдържанието на полифеноли в растенията [Bojilov et al. 2020].

Оксидативния и нитрозативния стрес са най-вредните последици, които са отговорни за редица патологични състояния. Те са отговорни за генерирането на ROS и RNS [Chalana et al. 2022; Galano et al. 2010; Jagetia, 2004; Lala, 1998]. Силата на антиоксидантния капацитет определя съдбата на клетките на живите организми.

## 2. HPLC-PDA анализ на полифеноли

### 2.1. Хроматографски профили „пръстов отпечатък“ (*fingerprints*) на нехидролизирани екстракти.

При изследването на полифенолния състав на родопски силивряк (*Habarlea rhodopensis*), вернония (*Vernonia amygdalina*), тривида марули (*Lactuca* spp.), маслодайна роза (*Rosa damascena*) и огниче (*Chenopodium botrys*) са използвани експериментални

методи, които включват различни процедури на екстракция и различни детектори. Използвани са различни по полярност разтворители за фракциониране на полифенолния комплекс и хроматографска апаратура HPLC-PDA и UHPLC-MS/MS за анализ и идентификация на компонентите на полифенолния комплекс. Полифенолите са полярни съединения, съдържащи повече от една хидроксилна група, поради което за тяхната екстракция се препоръчва 70% метанол като най-селективен и подходящ разтворител за HPLC анализи с висока прецизност (Dagnon et al., 2018). Необходима е правилна идентификация и количествено определяне на съединенията, за да се установи полифенолният състав. В тази връзка е необходимо разработване на HPLC-PDA хроматографски профили на пръстови отпечатьци. Поради тази причина, чрез анализа на конкретен екстракт, времето за анализ, видът на киселината в подвижната фаза и нейната концентрация, както и наклонът на градиента изискват оптимизиране. Профилът на пръстови отпечатьци е уникален и се съдържат максимален брой добре разделени пикове (Dagnon et al., 2018). Той служи за идентификация на полифенолите и да се проследи количеството им в различни етапи на развитие на растението и различни екстракти.

За разделянето и количествено определяне на полифенолните компоненти в изследваните растителни видове са оптимизирани хроматографските условия с цел получаване на „пръстов отпечатък“. Използвани са хроматографски колони Purospher, Kromasil, Sinergi и Nucleosil RP C<sub>18</sub> и подвижни фази с добавка на мравчена и трифлуорооцетна (TFA). С помощта на тези киселини са разработени методи за разделяне на компонентите на полифенолния комплекс [Georgieva et al. 2017; Dagnon et al. 2019; Bojilov et al. 2020, 2023; Dragoev et al. 2021].

## 2.2. Хроматографски профил на родопски силивряк (*Habarlea rhodopensis*) и количествено определяне на основните компоненти. Влияние на условията на засушаване върху полифенолния състав.

Родопски силивряк (*Habarlea rhodopensis*) от групата на възкръсващите растения. Той е ендемит за България, защото вирее само в Родопите. За него се знае, че то при резки екстремни природни условия то не умира, след което при благоприятни условия се възтановява. Например при засушаване поради дехидратация губи зеления цвят и придобива кафяв цвят. Изглежда, че то е изсъхнало, но при условия на хидратация то възкръсва т.е. възтановява жизнените си функции. В тази работа е изследван

полифенолния състав и влиянието на екстремните условия върху количеството на полифенолния състав.

Хроматографските условия на разделяне и детекцията с PDA детектор установихме доминиращ пик с абсорбция 280-282 nm. Основният компонент в полифенолния състав е фенилетаноида миконозид. Освен това установихме наличието на пауцифлузид, чийто спектър е характерен за кафеена киселина ( $\lambda_{\max}$  288 nm и 329 nm). Други важни съединения в профила на полифенолите показват  $\lambda_{\max}$  при 274-275 nm и 336-339 nm. Те принадлежат към групата на хиспидулин 8-С- глюкозиди: а именно хиспидулин 8-С-(2-О-сирингоил- $\beta$ -глюкопиранозид) (HSG), хиспидулин 8-С-(6-О-ацетил- $\beta$ -глюкопиранозид) (HAG) и хиспидулин 8-С-(6-О-ацетил-2-О-сирингоил- $\beta$ -глюкопиранозид) (HASG) [Georgieva et al. 2017].

### **Количествени промени в полифенолите**

Екстремните условия оказват влияние върху полифенолния състав. Изследванията се състоят в това, че растението е подложено на влиянието на различни фактори на стрес, най-вече на засушаване. Именно затова е изследван съставът и количествените промени, които са резултат от промяната на условията. Общото количество полифеноли е по-високо при добре хидратирани слънчеви растения в сравнение със сенчести растения и то се дължи главно на двойно по-високото количество на миконозид и пауцифлузид. Количеството на хиспидулиновите глюкозиди също беше по-високо при добре хидратирани слънчеви растения, но разликите не бяха значителни. Освен това тяхното количество не се променя значително в резултат на стреса от засушаване [Georgieva et al. 2017]. При засушаване растенията, растящи при ниска радиация, реагират с по-голямо увеличение на миконозид и пауцифлузид в сравнение с растенията, растящи при висока интензивност на светлина. Независимо от известно намаляване на количеството им в умерено дехидратирани слънчеви растения (50% RWC), по-нататъшната загуба на вода до 8% RWC води до повишено количество миконозид и пауцифлузид в сравнение с първоначалните им стойности. Обратно, сенчестите растения реагираха на суша с непрекъснато увеличаване както на миконозид, така и на пауцифлузид. Тяхното количество се увеличи значително в сухи сенчести растения (8% RWC). След рехидратиране както на сенчести, така и на слънчеви растения количеството на миконозид и пауцифлузид значително намалява, достигайки стойностите на добре хидратирани растения [Georgieva et al. 2017].



Известно е, че антиоксидантния капацитет на медицинските растения се дължи на съдържанието на полифеноли и могат да играят важна роля във възкръсващите растения [Bojilov et al. 2023; Dagnon et al. 2019; Georgieva et al. 2017].

Нашите резултати потвърждават, че нарастващото съдържание на полифеноли при засушаване разкриват основната роля на фенилетаноидните глюкозиди в защитните механизми на *H. rhodopensis*. Това доказва, че полифенолите предпазват мембраните от щети, причинени от засушаване, както и срещу предизвикани от свободните радикали, окисляване чрез интеркалиране в липидния двоен слой. По този начин може да се заключи, че миконозидът и пауцифлузидът защитават мембраните по време на засушаване на *H. rhodopensis* срещу оксидативен стрес [Georgieva et al. 2017].

### 2.3. Хроматографски профил на *Vernonia amygdalina* Del. и количествено определяне на основните компоненти. Използване на сурогатни стандарти и UV спектри за идентифициране на полифенолите.

За да получим представителни хроматографски профили, ние използвахме 70% метанол в съотношение 20:1 за *Vernonia amygdalina* и 50:1 за сурогатните стандарти (зелено кафе и *A. asplenifolia* 9602).

Зеленото кафе като сурогатен стандарт е избрано поради профила на кафеоилхиновите киселини, който е изключително добре характеризирани (Clifford, 2017). Изследван е полифенолният комплекс на видове от групата на *Achillea millefolium*, по-специално *A. asplenifolia* 9602.

Открихме много прилики между неговите хроматографски профили и UV спектри с тези на *Vernonia amygdalina*, особено по отношение на 3,5- и 4,5-дикафеоилхиновите киселини и лутеолин-7-О-глюкозид (Dagnon et al., 2018).

По-рано чрез използване на две колони – Symmetry и Symmetry Shield C<sub>18</sub> – в полифенолният профил на *Vernonia amygdalina* бяха документирани 14 пика на кафеоилхиновите киселини, въпреки че не беше постигнато добро разделяне. Липсват данни за лутеолин и лутеолинови гликозиди (Johnson et al., 2011). Седемнадесет пика с по-добра разделителна способност се постига на колона Synergi max C<sub>12</sub>, (150 × 4 mm (4 μm)) (Phenomenex, Torrance, CA), с идентифицирани 13 пика, включително моно- и дикафеоилхинови киселини, рутин, лутеолин и апигенинови гликозиди, и агликонът лутеолин (Ola et al., 2009).

При този хроматографски подход са тествани три конвенционални колони C<sub>18</sub> (Purospher, Kromasil и Nucleosil) [Dagnon et al. 2019]. Различни подвижни фази и са приложени многостъпални градиенти за разработване профил на полифенолите на *Vernonia amygdalina* и на сурогатни стандарти. Рутинът е избран като вътрешен стандарт поради структурното му сходство с анализите и отсъствието му в полифенолния профил на *Vernonia amygdalina*. Прилагането на техниката идентификация с помощта на сурогатни стандарти качествено е установен полифенолния състав във *Vernonia amygdalina* [Dagnon et al. 2019].

### Полифенолен състав на *Vernonia amygdalina*

Обикновено в хроматографията за адекватна идентификация е задължителна комбинацията от различни техники, като се обобщават данните за времето на задържане, UV и MS спектри и публикуваната преди това информация. В нашите експерименти сме използвали два сурогатни стандарта с известен състав: екстракти от зелено кафе и *A. asplenifolia* 9602 [Dagnon et al. 2019]. В хроматографския профил на зелено кафе основните съединения се отнасят до 3-, 4- и 5-кафеоилхиновите киселини, както 3,4-, 3,5- и 4,5-дикафеоилхиновите киселини [Dagnon et al. 2019]. Полифенолният комплекс на зеленото кафе е изследван подробно от Clifford et al. (2005) и много други автори (Craig et al., 2016). Моно- и дикафеоилхиновите киселини са основните полифенолни компоненти в зеленото кафе. В това изследване, чрез внимателно контролирани условия на метода, подкрепени с UV спектри от PDA детектора и относителните времена на задържане спрямо вътрешния стандарт, чрез сравняването им с данните на сурогатния стандарт са идентифицирани фенолните компоненти на *Vernonia amygdalina*. Използването на относително време на задържане в HPLC е за предпочитане поради променливостта на хроматографските условия. В тази работа пикът на вътрешния стандарт рутин се използва за изчисляване на относителното време на задържане на съединенията [Dagnon et al. 2019].

Несъмнено може да се види, че задържането на пиковете на *Vernonia amygdalina* съвпада с тези на сурогатния стандарт на зелено кафе и стандартната смес от 5-кафеоилхинова киселина и лутеолин. UV абсорбционните спектри на пиковете при *Vernonia amygdalina* са идентични с тези в профила на зелено кафе и стандартите 5-кафеоилхинова киселина и лутеолин. Лутеолин-7-О-глюкозидът е характерен полифенолен компонент на видове, принадлежащи към групата *Achillea millefolium* (Innocenti et al., 2007). Този факт и внимателното проучване на *A. asplenifolia* 9602 бяха основната причина да го

препоръчае като сурогатен стандарт. По отношение на конформацията на идентичност на пика, фракциите на етил ацетат и хлороформ на *Vernonia amygdalina* и сурогатните стандарти са изследвани чрез маспектрометрия [Dagnon et al. 2019].

Другите основни компоненти в профила на *Vernonia amygdalina* са 1,5-, 3,5- и 4,5-дикафеоилхиновите киселини [Dagnon et al. 2019]. По отношение на кафеоилхиновите киселини нашите данни потвърждават, разширяват и уточняват публикуваните по-рано данни (Ola et al., 2009; Johnson et al., 2011). Освен това, нашите данни установяват точно основните полифенолни компоненти на *Vernonia amygdalina* на базата на по-добра хроматографска разделителна способност и MS/MS изясняване структурата на лутеолиновите гликозиди и 1,5-, 3,5- и 4,5-дикафеоилхиновите киселини в профила на *Vernonia amygdalina* [Dagnon et al. 2019]. Освен това е описано наличието на лутеолин 4'-*O*-глюкозид, апигенин 7-*O*-рутинозид, апигенин 7-*O*-глюкозид и апигенин като второстепенни съставки във *V. amygdalina* [Dagnon et al. 2019].

#### 2.4. Хроматографски профил на *Rosa damascena* Mill и количествено определяне на основните компоненти.

Хроматографските профили на полифенолния комплекс на сухи листенца от роза, сухо пресовани дестилирани листенца от роза и отпадъчна вода след хидродестилацията на етеричното масло показват абсорбция при 280 nm и 352 nm [Dragoev et al. 2021]. В хроматографските профили UV спектрите от PDA детектора показват предимно пикове на галова киселина, производни на кверцетин и кемпферол. Хроматографските профили на сухи розови листенца и дестилирани отпадъчни странични продукти – сухо пресовани дестилирани розови листенца и отпадъчни води съдържат компоненти с еднакви спектри, следователно не се наблюдават качествени разлики в полифенолния състав. Внимателният хроматографски анализ разкри изобилието от полифенолни съединения в сухите розови листенца и сухо пресованите дестилирани розови листенца. Различни пропорции на три основни групи полифенолни съединения са открити в сухи розови листенца, в сухо пресовани дестилирани розови листенца и в отпадъчни води след изолирането на етерично масло от *Rosa damascena* [Dragoev et al. 2021]. В отпадните води е установено най-ниско съдържание от всички компоненти. Сухопресованите дестилирани розови листенца съдържат значително количество гликозиди, както и кемпферол [Dragoev et al. 2021]. Приблизително 50% от всички полифенолни съединения, определени в розови листенца, са открити в сухо пресовани дестилирани

розови листенца. С най-високо съдържание на кемпферол се характеризират сухо пресованите дестилирани розови листенца. Напротив, профилът на полифенолите в отпадъчните води след хидродестилацията на етеричното масло показва ниско съдържание на кемпферол.

Подобно на нашите резултати, присъствието на флавонол гликозиди в дестилирани розови листенца е докладвано от [Schieber et al. \(2005\)](#). Те са идентифицирали 22 кемпферолови и кверцетинови гликозиди, за разлика от нашите данни, които идентифицират 30 полифенолни съединения: 13 кемпферолови гликозиди, 10 кверцетинови гликозиди, 6 гликозиди на галова киселина и 2 флавонол агликони. Нашите данни показват наличието на същите съединения в сухите розови листенца с изключение на 6 гликозида на галова киселина и допълнителни изомери на кверцетин галоил хексозид и кемпферол дизахарид, които се идентифицират за първи път. Данните в нашето проучване водят до предположението, че повечето от биоактивните флавоноидни гликозиди се запазват непроменени след дестилация, включваща предимно производни на кемпферол. Въпреки това, количествата на кверцетин и кемпферол гликозиди са доста еднакви. Подобно на нас [Abdel-Hameed et al. \(2012\)](#) съобщават, че остатъците от роза Taif притежават антиоксидантна активност. [Abdel-Hameed et al. \(2012\)](#) потвърждават, че фенолните съединения, особено флавонолите, са основните антиоксидантни активни компоненти в остатъците от роза Taif.

## 2.5. Хроматографски профил на *Lactuca* spp. и количествено определяне на основните компоненти.

Три сорта маруля (*Batavia* cv. *Maritima*, *Lolo rosa* cv. *Tuska* и cv. *Winter Butterhead*) бяха изследвани за разпределение и количествено определяне на основните полифенолни съединения. Растенията са подложени на различни практики на торене, включително минерални, органични и био-торове. Гранулираните органични торове (*Italpollina* и *Arkobaleno*) и двата биотора (*Lombricompost* – гранулиран и *EKOpro* NX – течен) са приложени за първи път в експеримент, насочен към изследване на полифенолния комплекс в сортовете маруля. През последното десетилетие полифенолните съединения на марулята са интензивно изследвани с помощта на HPLC-PDA-MS методи, насочващи към хроматографските профили и основните компоненти [[Llorach et al. 2008](#)]. Изследванията проведени от нас показват, че хроматографските профили на трите сорта маруля (контролни проби, неторени) са същите като тези,

получени по-рано [Romani et al. 2002]. По отношение на другите хроматографски методи трябва да се спомене обратният ред на елуиране на 2,3-дикафеоилвинена киселина (2,3-диКВК) и кверцетин гликозидите, който зависи от типа на колоната [Llorach et al. 2008, Materska et al. 2019].

### Основни полифенолни съединения в сортове маруля (неторени проби)

Хроматографските профили на пръстови отпечатьци на полифенолите в три сорта маруля (*Batavia cv. Maritima*, *Lolo rosa cv. Tuska* и *cv. Winter Butterhead*) (неторена контрола) показват идентични пикове, принадлежащи предимно на производни на кафеената киселина [Bojilov et al. 2020]. Основните компоненти на полифенолите са 2,3-дикафеоилвинена киселина (чикорова к-на) (2,3диКВК), 5-кафеоилхинова к-на (5-КХК) и кафеоилвинена к-на (КВК) и два кверцетинови гликозида [Bojilov et al. 2020]. Три производни на кафеената к-на в по-малко количество също са идентифицирани чрез техните UV спектри [Romani et al. 2002, Llorach et al. 2008, Materska et al. 2019].

От анализът са регистрирани само количествени разлики в полифенолите на трите сорта. Основният компонент е 2,3-диКВК, като съдържанието му варира от 1.28 до 5.6 mg/g DW [Bojilov et al. 2020]. Съдържанието на 5-КХК също се различава в много широк диапазон от 0,79 до 4,4 mg/g DW. Съдържанието на кверцетин-3-*O*-(6"-*O*-малонил)-глюкозид варира от 0,09 до 5,2 mg/g DW, което е най-високо в *Lolo rosa cv. Tuska* [Bojilov et al. 2020]. Наскоро същото твърдение, относно високото съдържание на кверцетин-3-*O*-(6"-*O*-малонил)-глюкозид и неговата биоактивност, е докладвано за промяната на фенолния състав в червената маруля чрез намаляване на доставките на азот, което засилва неговите антипролиферативни ефекти върху колоректалните ракови клетки [Zhou et al. 2019]. Кверцетин-3'-*O*-глюкуронид (1,71 mg/g DW) и сумата от производни на кафеената киселина (СА) (0,79 mg/g DW) също показват най-високо съдържание в червената маруля, докато съдържанието на КВК беше почти същото в трите сорта [Bojilov et al. 2020].

### Ефект от минерално и биоорганично торене.

Ефектът на минералните, органичните и био-торовете върху съдържанието на полифеноли беше оценен чрез прилагане на теста на Дънкан. Той позволява да се сравняват данните от вида на използваните торове с тези на контролата. Тестът на Дънкан позволява да се оценят разликите между компонентите в сортовете марули, от една страна, и от друга, да се оцени как се променя съдържанието на полифеноли в зависимост от вида на торене. Данните показват, че при торене на зелените сортове

(*Batavia cv. Maritima* и *cv. Winter Butterhead*) съдържанието на полифеноли се променя драстично в сравнение с контролата, докато при червената маруля (*Lolo rosa cv. Tuska*) се наблюдават по-малки разлики [Bojilov et al. 2020]. Двата зелени сорта реагираха различно на третирането с торове, съответно при *cv. Maritima* с намаляване на полифенолите и в *cv. Winter Butterhead* с увеличаване на тяхното съдържание. Количествените разлики в кверцетиновите гликозиди водят до качествени разлики, тъй като кверцетин-3-*O*-(6"-*O*-малонил)-глюкозид отсъства в две проби (*cv. Maritima-3* и *cv. Winter Butterhead-5*). С прилагането на органичен тор Italpollina съдържанието на 2,3-диКВК ( $0,37 \div 2,22$  mg/g DW) и кверцетин-3'-*O*-глюкуронид ( $0,23 \div 0,97$  mg/g DW) в *cv. Maritima* драстично намалява. Преди това намаление на полифенолите, дължащо се на различни практики на торене, също беше наблюдавано в зелена маруля Maravilla de Vegano при експерименти на открито [Sofa et al. 2016].

При прилагането на биотора ЕКОрор NX не са регистрирани значителни промени в полифенолния комплекс [Bojilov et al. 2020]. Ето защо може да се предположи, че е подходящо да се използват полета без торене или полета, наторени с ЕКОрор NX за отглеждане на салата *cv. Maritima* със запазена биоактивност. Данните показват, че червената маруля *Lolo Rosa cv. Tuska* се характеризира с най-високо съдържание на полифеноли, което се влияе по-малко от вида на торене. Следователно използването на минерални, органични и био-торове има доста слабо влияние върху съдържанието на основните полифенолни компоненти 5-КХК, 2,3-диКВК и кверцетин-3-*O*-(6"-*O*-малонил)-глюкозид [Bojilov et al. 2020]. В стремежът към производство на марули с висока бионаличност и без химически торове е препоръчително използването на органични и биоторове. В *cv. Winter Butterhead*, отговорът на полифенолните съединения, дължащ се на органично и биоторене, беше насочен към увеличаване на съдържанието в зависимост от вида на тора. Използването на органичен тор Аркобалено и биотор ЕКОрор NX значително повишава съдържанието на основните полифеноли. Високото съдържание на полифеноли е в пряка връзка с антиоксидантната и други биологични активности. Доказани биологичните свойства на 2,3-диКВК, които включват антивирусни, противовъзпалителни, глюкозна и липидна хомеостаза, невропротекция и антиоксидантни ефекти [Peng et al. 2019].

Данните показват, че полифенолният комплекс в трите сорта маруля е количествено повлиян в зависимост от вида на марулята и типа на торене. Съдържанието на основните полифенолни съединения в червена маруля тип *Lolo Rosa cv. Tuska* беше по-слабо засегнат, докато полифенолите в двата зелени сорта (*Batavia cv. Maritima* и *cv.*



*Winter Butterhead*) се промениха драстично по различен начин в зависимост от вида на торене. Следователно изборът на тор е много важна задача за производството на висококачествена маруля с висока биологична активност без химическа обработка, която е важна за човешкото здраве.

## 2.6. Хроматографски профил на фракционирания полифенолен състав на огниче (*Chenopodium botrys*) и количествено определяне.

Фракционирането е важен етап както при анализа на полифеноли, особено с *UHPLC-MS/MS* така и в изследване на биологична активност. Чрез фракционирането компонентите на полифенолния комплекс се разделят на фракции с различна полярност. Този етап дава възможност да се решат две основни задачи. Първата задача е свързана с елиминиране влиянието на матрицата и улеснява идентификацията на полифенолния комплекс. Втората – да установим коя част от полифенолния комплекс проявява добра *in vitro* биологична активност и да се направи корелация между структура и активност. Затова при фракционирането на полифенолния комплекс използвахме различни по полярност разтворители - хексан, хлороформ, етил ацетат и бутанол.

### **Съдържание на общи феноли (TPC) и танини (TTC) във фракциите**

Полифенолите като вторични метаболити са широко разпространени в растителното царство и допринасят значително за антиоксидантна и други активности, които потенциално имат благоприятен ефект върху човешкото здраве. Поради тази причина при изследването на дадена билка е важно да се оцени общото фенолно съдържание и съдържание на общи танини в различните екстракти, фракции и тинктури.

*TPC*, *TTC* и антиоксидантната активност зависят от добива на фенолни съединения [Bojilov et al. 2023]. Стойностите на *TPC* са в диапазона от 18,41 – 159,84 mg GAE/g Extr, а на *TTC* варират от 10.40 – 133.08 mgTAE/g Extr. Резултатите показват, че етилацетатната фракция е най-богата на общи феноли (159.84 mg GAE/g Extr) и общи танини (133,08 mgTAE/g Extr). Именно съдържанието на биоактивните компоненти във фракциите е правопрпорционално на активността на отделните фракции [Bojilov et al. 2023].

### **Количествено определяне на 6-метокси флаволи (6-MFs) и кверцетин гликозиди във фракциите.**

Важна цел на изследването е да се оцени общото количество флавоноиди и гликозиди във фракциите, които се съдържат в полифенолния комплекс от *C. botrys*. Общото фенолно съдържание е обща индикация и не предоставя подробна информация за полифенолния състав. Хроматографският анализ предлага подробна информация за концентрацията и разпределението на различните класове полифеноли в билката. Преди това изследвахме 70% метанолов екстракт от *C. botrys* и установихме профила на пръстови отпечатащи на полифенолния комплекс, който се състои главно от 6-MFs и малко количество кверцетин гликозиди [Bojilov et al. 2017]. В настоящото изследване полифенолният комплекс се фракционира по полярност, като се използват няколко органични разтворителя, включително хексан, хлороформ, етил ацетат и бутанол. Последните три фракции бяха анализирани чрез HPLC-PDA [Bojilov et al. 2023]. От хроматографските профили открихме, че кверцетиновите гликозиди най-ефективно се екстрахират с полярни разтворители, като етилацетат и бутанол, докато 6-MFs са най-ефективно екстрахирани с по-малко полярния хлороформ [Bojilov et al. 2017].

Използвайки комбинация от HPLC-PDA и UHPLC-MS/MS анализ, ние открихме че етилацетатът е в състояние да извлече моно- и ди-гликозиди на кверцетин, кемпферол, изорамнетин, хиспидулин и яцеозидин, докато бутанолът е подходящ да извлече по-полярните тригликозиди на кверцетин. От анализа установихме, че кверцетиновите гликозиди са основните компоненти в двете фракции.

Съдържанието на кверцетин гликозиди и 6-метокси флавоноли се определя съответно спрямо кверцетин и хиспидулин. Резултатите от изследването показват, че етилацетатната фракция има най-високо съдържание на кверцетин гликозиди (168,82 mg/g Extr), докато съдържанието им в бутанолната фракция е 2,5 пъти по-ниско. Гликозидите на кемпферол, изорамнетин, хиспидулин и яцеозидин присъстват в ниски концентрации в същата фракция. Количеството на 6-MFs в хлороформената фракция достигна 355,47 mg/g Extr [Bojilov et al. 2023].

### 3. Идентификация на полифеноли чрез UHPLC-MS

#### 3.1. Идентификация на полифенолите от *Habarlea rhodopensis*

Идентифицирането на компонентите на полифенолния състав беше потвърдено от маспектралните данни, получени за хлороформената и етил ацетатната фракции, и фрагментирането на протонирани и депротонирани ( $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$ ) молекулни йони [Georgieva et al. 2017].

В настоящата работа изследвахме структурата на полифенолите в отрицателен режим на йонизация [Georgieva et al. 2017]. Фенилетаноидните глюкозиди миконозид и пауцифлузид са с молекулен йонен съответно при  $m/z$  743 и  $m/z$  741, [Georgieva et al. 2017]. Чрез фрагментирането на молекуления йон на миконозид бяха открити фрагментни йони  $m/z$  181 и  $m/z$  163, характерни за дихидрокафеената киселина. Фрагментните йони, наблюдавани за пауцифлузид  $m/z$  179 и  $m/z$  161, са характерни за кафеената киселина [Georgieva et al. 2017].

В структурата на флавоноид-*C*-гликозидите въглехидратната част директно е свързана с флавоновото ядро посредством здрава *C-C* връзка. До сега от групата на *C*-гликозидите са известни само тези, на които въглехидратната част е свързана на позиция *C-6* и *C-8* на флавоноидното ядро. Така главната задача в това пручване се свежда до диференциацията между *6-C*- и *8-C*-гликозиди. MS/MS анализът в комбинация с CID позволява характеризирането на *C*-гликозидите. Анализите проведени с UHPLC-MS/MS разкрива наличието на *8-C*-гликозиди. Мас спектралния анализ доказва наличието на хиспидулин *8-C*-глюкозиди: а именно хиспидулин *8-C*-(2-*O*-сирингоил- $\beta$ -глюкопиранозид) (HSG), хиспидулин *8-C*-(6-*O*-ацетил- $\beta$ -глюкопиранозид) (HAG) и хиспидулин *8-C*-(6-*O*-ацетил-2-*O*-сирингоил- $\beta$ -глюкопиранозид) (HASG) [Georgieva et al. 2017].

### 3.2. Идентификация на полифенолите от *Vernonia amygdalina* Del

Общо 17 съединения са идентифицирани в полифенолния състав на *Vernonia amygdalina* и 9 от тях присъстват в *A. asplenifolia* 9602. Резултатите, от идентифицирането на моно- и дикафеоилхиновите киселини с помощта на сурогатния стандарт зелено кафе се потвърждават от мас спектралния анализ. Освен това, MS спектрите потвърждават наличие на лутеолин-7-*O*-глюкуронид и лутеолин-7-*O*-глюкозид [Dagnon et al. 2019]. Характеристичните йони  $m/z$  285,  $m/z$  151,  $m/z$  133 и  $m/z$  107 доказват наличието на лутеолинови гликозиди. Йоните  $m/z$  269,  $m/z$  151,  $m/z$  149 и  $m/z$  117 са характерни както за апигенин, така и за апигениновите гликозиди [Dagnon et al. 2019]. Неяснотите в публикуваните досега данни за полифенолния състав на *Vernonia amygdalina* се отнасят до наличието или отсъствието на лутеолин и лутеолинови гликозиди. Нашите резултати са подкрепени от MS данни, потвърждаващи наличието на двата гликозида лутеолин-7-*O*-глюкуронид и лутеолин-7-*O*-глюкозид като основни

флавоноидни компоненти в полифенолния комплекс на *Vernonia amygdalina* [Dagnon et al. 2019].

### 3.3. Идентификация и структурно характеризиране на полифенолите от *Rosa damascena* Mill.

Фракционирането на полифенолния комплекс на сухи розови листенца води до получаването на нисък добив на хлороформената фракция (3,79 %), в която са идентифицирани агликоните кверцетин и кемпферол. В етилацетатната фракция (с добив 23,67%) са установени само гликозиди [Dragoev et al. 2021]. В обобщение, тридесет полифенолни компонента бяха идентифицирани в сухи листенца от роза, [Dragoev et al. 2021]. Основно три групи полифенолни съединения в следния ред включват полифенолния комплекс на *Rosa damascena* сухи листенца: гликозиди на кемпферол > гликозиди на кверцетин > гликозиди на галова киселина [Dragoev et al. 2021]. Идентифицирани са тринадесет гликозида на кемпферол, десет гликозида на кверцетин, шест гликозида на галова киселина и два флавонола. Данните от MS/MS разкриват, че гликозидите на кемпферола са основните компоненти в полифенолния комплекс на венчелистчетата на *Rosa damascena*. Фрагментирането на гликозидите с прилагането на ниска колизионна енергия води до разцепване на глюкозилната връзка и загуба на 162 Da, 146 Da, 152 Da, 132 Da и 42 Da, които са хексоза, (глюкоза, галактоза, рамноза), галоилова група, пентоза и ацетилова група. ESI-MS/MS спектрите показват йоните на кверцетин ( $m/z$  301), кемпферол ( $m/z$  285) и галова киселина ( $m/z$  169). Нашите данни показват наличието на флавонолови гликозиди, главно на кемпферол и кверцетин в сухите розови листенца, с изключение на шест гликозида на галова киселина и допълнителни изомери на кверцетин галоил хексозид и кемпферол дизахарид, които са идентифицирани за първи път. Галоил гликозидите претърпяват фрагментация с елиминирането на галоилова група (152 Da) и хексоза (162 Da). Характерните йони за галовата киселина са  $m/z$  125 и  $m/z$  107 [Dragoev et al. 2021].

### 3.4. Идентификация и структурно характеризиране на полифенолите от *Chenopodium botrys*.

В предишни наши изследвания установихме, че 6-метокси флаволи (6-MFs) са основните компоненти в *C. botrys*, които бяха анализирани с UHPLC-MS в положителен режим на йонизация и докладвани за първи път [Bojilov et al. 2017]. Като група съединения са малко изследвани. За това в настоящата работа изследвахме структурата

им в условията на ESI-MS/MS в отрицателен режим на йонизация. При тези условия се наблюдава по-нисък шум. И двата режима на йонизация намират приложение и спомагат за пълното изследване на структурата на съединенията. Освен това се наблюдават различни пътища на фрагментиране. При по-задълбочено изследване освен познатите съединения идентифицирахме допълнително метоксифлавоноидите пектолинаригенин, деметилнобилетин и изомер на синенсетина изосиненсетин, които не са докладвани в полифенолния състав на *C. botrys* [Bojilov et al. 2023].

При фрагментирането на 6-MFs се наблюдава строго определена зависимост, докато механизмът на фрагментиране на полиметоксилираните флавоноиди протича по начин в зависимост от броя на метокси групи.

Етикетите  $^{i,j}A^-$  и  $^{i,j}B^-$  се отнасят до фрагментите, съдържащи съответно пръстените  $A^-$  и  $B^-$  пръстени, а горните индекси  $i$  и  $j$  показват позицията на връзките на  $C$ -пръстена, които се разкъсват. Йоните  $^{i,j}A^-$  и  $^{i,j}B^-$  претърпяват допълнителна фрагментация чрез загуба на метилова група ( $-CH_3$ ),  $-HCO$  група или малки неутрални молекули, като  $CO$  и  $CO_2$  [Bojilov et al. 2023].

Първоначално йонът на 6-MFs губи метилов радикал, и се получава йон  $[M-H-CH_3]^-$ . Този йон губи радикал  $-CHO$ , като се получават следните фрагментни  $[M-H-CH_3-CHO]^-$  или  $[M-2H-CH_3-CO]^-$  йони [Bojilov et al. 2023]. Полученият йон  $[M-H-CH_3-CHO]^-$  доказва наличието на метокси група на шестата позиция в пръстен  $A$ . Освен това, същият йон систематично претърпява загуба на малки неутрални молекули, като  $CO$  и  $CO_2$ , водещи последователно до образуване на йон  $m/z$  243,  $m/z$  215 и  $m/z$  227 [Bojilov et al. 2023].

Загубата на неутрални молекули  $CO$  и  $CO_2$  може да се припише на пръстена  $C$ . Подобен е същият механизъм на фрагментация на хиспидулин, яцеозидин, еупатилин и пектолинаригенин [Bojilov et al. 2023].

Фрагментацията на непетин включва разцепване на  $C-C$  връзки в позиция  $1/3$  и  $0/2$  на пръстен  $C$  и дава структурно информативни  $^{1,3}A^-$  и  $^{1,3}B^-$  и  $^{0,2}A^-$  йони [Bojilov et al. 2023]. Интензитетът на фрагментните йони зависи от колизионната енергия ( $CE$ ). Ретро Дилс-Алдер (RDA) фрагментация на непетин е в следствие на разкъсване на пръстен  $C$  в позиция  $1/3$ . Това води до получаването на фрагментните йони  $m/z$  164 и  $m/z$  133 йони [Bojilov et al. 2023]. При висока  $CE$  спектърът на депротонирания непетин йонът  $m/z$  164 съответства на фрагмента  $[-H-CH_3-^{1,3}A^-/-CH_4-^{1,3}A^-]$ , който се характеризира с директна загуба на метилова група и не е интензивен пик. Йонът  $m/z$  133 показва нисък интензитет, съответстващ на фрагмента  $^{1,3}B^-$ . Освен това, йонът  $[-H-CH_3-$

$^{1,3}A^-/-CH_4-^{1,3}A^-]$  систематично претърпява загуба на CO, което води до по-интензивен йон с  $m/z$  136  $[-CH_4-^{1,3}A^-CO]$  [Bojilov et al. 2023]. Йон  $m/z$  136 допълнително губи CO и CO<sub>2</sub>, което води до образуването на по-интензивен йон с  $m/z$  65  $[-CH_4-^{1,3}A^-2CO-CO_2]$ .

Интензитетът на йон  $m/z$  136 зависи от наличието на полярни групи в пръстен В. Наличието на OH групи води до увеличаване на интензитета му. Йон  $m/z$  163 се получава по два пътя. Единият е ретроциклизация на пръстен С (0/2) и резултатният йон е  $-CH_3^{0,2}A^-$ , а вторият път е свързан с разцепване на връзката C2–C1' между пръстените С и В, получава се йон  $[M-H-CH_3-HCO-ring\ B]^-$ . Кой е най-вероятният е трудно да се установи, тъй като елементният състав на двата йона е един и същ т.е. изомерни йони [Bojilov et al. 2023]. Интензитетът на йон  $m/z$  163 зависи от функционалните групи (OH или OCH<sub>3</sub>) в пръстен В. За това при непетина и хиспидулина йон  $m/z$  163 е с нисък интензитет, поради наличието на OH групи. Наличието на OCH<sub>3</sub> групи интензитетът на йон  $m/z$  163 се увеличава. Същият йон при яцеозидина, еупатилина и пектолинаригенина губи неутрална молекула CO и се получава йон  $m/z$  135  $[-CH_3^{0,2}A^-CO]$  или  $[M-H-CH_3-HCO-ring\ B-CO]^-$ . Йоните  $m/z$  164,  $m/z$  163,  $m/z$  136 и  $m/z$  65 са специфични за фрагментирането на непетин в отрицателен режим. Те допринасят за идентифицирането на 6-MFs, които са характерни за заместителите в пръстен А. За 6-MFs тези йони характеризират заместителите в пръстен А. Значителни разлики във фрагментацията на 6-MFs се появяват само при заместителите в пръстен В [Bojilov et al. 2023].

Освен 6-MFs с възможностите на UHPLC-MS/MS идентифицирахме полиметоксилираните флаволи (PMFs) деметилнобилетин и изомер на синенсетин [Bojilov et al. 2023]. В предишни наши изследвания докладвахме за наличието на синенсетин и нобилетин [Bojilov et al. 2017]. В условията на ESI-MS/MS в отрицателен режим на йонизация PMFs търпят загуба на CH<sub>3</sub> групи, в следствие на което се получават стабилни хиноидни форми [Bojilov et al. 2023]. Същите форми търпят прегрупировка с отделяне на неутрални молекули CO and CO<sub>2</sub>. Получените фрагментни йони отговарят на следните структурни фрагменти  $[M-H-iCH_3-iCO]^-$  и  $[M-H-iCH_3-iCO-CO_2]^-$  [Bojilov et al. 2023].

Спектрите на синенсетина и неговия изомер изосиненсетин са близки, и това се доказва и в двата режима на йонизация [Bojilov et al. 2023]. От спектрите установихме зависимост, че механизмът на фрагментиране се доближава до този на 6-MFs. Има резон в това изследване, защото в пръстен А се съдържат три заместителя и в условията на ESI-MS/MS (отрицателен и положителен режим на йонизация) след оцепването на CH<sub>3</sub> групи, пръстен А се прегрупира в стабилна хиноидна форма [Bojilov et al. 2023]. Приложихме



двата режима на йонизация с цел по-подробно изследване структурата на двата изомера. Отцепването на  $\text{CH}_3$  групи и следваща RDA циклизация ( $1/3$ ) на пръстен C води до получаването на йон  $m/z$  168 ( $[-3\text{CH}_3 \text{ } ^{1,3}\text{A}^+]$ ), който систематично губи неутрални молекули CO и води до получаване на йоните  $m/z$  140 ( $[-3\text{CH}_3 \text{ } ^{1,3}\text{A}^+-\text{CO}]$ ) and  $m/z$  112 ( $[-3\text{CH}_3 \text{ } ^{1,3}\text{A}^+-2\text{CO}]$ ). Продуктният йон 99 се получава след ретроциклизация на йон 168 [Bojilov et al. 2023]. Вторият продуктен йон от RDA циклизация е с  $m/z$  147 ( $[-\text{CH}_3 \text{ } ^{1,3}\text{B}^+]$ ), който също губи CO и продуктния фрагмент ( $m/z$  119) отговаря на ( $[-\text{CH}_3 \text{ } ^{1,3}\text{B}^+-\text{CO}]$ ) [Bojilov et al. 2023]. Същата RDA циклизация се наблюдава и в отрицателен режим на йонизация [Bojilov et al. 2023]. В този случай получените фрагменти са структурно различни. И двата режима дават важна информация за структурата на двата изомера.

С увеличаване на метокси групите фрагментацията на PMFs в отрицателен режим на йонизация протича по механизъм на нобилетин и деметилнобилетин. Характерно в този случай, че се отцепват само метилови групи до получаване на стабилна хиноидна форма. Губи се основно неутрални молекули като CO and  $\text{CO}_2$ . При RDA циклизацията се получава йон  $m/z$  132 и  $m/z$  133 [Bojilov et al. 2023].

Резултат от това изследване е, че идентифицирахме три нови съединения (пектолинаригенин, синенсетин изомер и деметилнобилетин), които досега не са докладвани в състава на *C. botrys*.

### Идентификация на гликозиди

Метаболизмът в *C. botrys* е твърде разнообразен, защото основните компоненти са 6-MFs, гликозидите са основно на кверцетин, следва кемпферол, изорамнетин и в малки количества на яцеозидин и хиспидули [Bojilov et al. 2023]. Гликозидите изследвахме в условията на ESI-MS/MS в отрицателен режим на йонизация. От маспектрите установихме, че при фрагментирането на молекулния йон  $[\text{M}-\text{H}]^-$  се получава йон, който се дължи на загуба на въглехидратни единици. Резултатите от фрагментирането бяха сравнявани с тези от фрагментацията на стандарти рутин, хиперозид и изокверцетин [Bojilov et al. 2023]. В ESI-MS спектъра се наблюдава молекулния йон на рутин  $[\text{M}-\text{H}]^-$  с  $m/z$  609 [Bojilov et al. 2023]. При фрагментирането му се получава йон с  $m/z$  301 ( $[\text{M}-\text{H}-146-162]^-$ ), което е свързано със загуба на дизахарид рутиноза (308 Da). Освен това регистрирахме и йон с  $m/z$  463, който при фрагментирането му води до образуване също на йон с  $m/z$  301, но в този случай се губи една въглехидратна единица от 162 Da (глюкоза, галактоза). ESI-MS/MS експериментът и фрагментирането на йон 301 води до образуването на йони с  $m/z$  179 [ $^{1,2}\text{A}^-$ ],  $m/z$  151 [ $^{1,2}\text{A}^- - \text{CO}$ ] и  $m/z$  107 [ $^{1,2}\text{A}^- - \text{CO} - \text{CO}_2$ ], които са характеристични за агликона кверцетин

[Bojilov et al. 2023]. Този подход улеснява идентификацията и механизма на фрагментиране на гликозидите, съдържащи в двете полярни фракции. В бутаноловата и етилацетатната фракции са идентифицирани 16 нови гликозида, които за пръв път се докладват в полифенолния състав на *C. botrys*.

Пик **1** с  $t_R$  12.11 min [Bojilov et al. 2023] беше идентифициран като Кверцетин 3-*O*-(2"-*O*-апиофураносил-6"-*O*-глюкопиранозид)- $\beta$ -D-глюкопиранозид. При MS/MS експеримента молекулният йон  $m/z$  757 губи пентозна единица 132 Da и се получава йон  $m/z$  625 ([M-H-132]<sup>-</sup>). Същият йон губи 162 Da и резултатния йон отговаря на [M-H-132-162]<sup>-</sup> с  $m/z$  463, който губи още 162 Da и полученият йон 301 се фрагментира на характерните за кверцетин йони  $m/z$  179 [<sup>1,2</sup>A<sup>-</sup>],  $m/z$  151 [<sup>1,2</sup>A<sup>-</sup>-CO] и  $m/z$  107 [<sup>1,2</sup>A<sup>-</sup>-CO-CO<sub>2</sub>]. Пикове **2**, **3** и **4** [Bojilov et al. 2023] бяха идентифицирани като производни на агликона кверцетин. И трите гликозида са изомери с молекулен йон  $m/z$  841. От мас спектралните изследвания се разбира че в структурата си молекулният йон се съдържат две единици рамноза и една хексоза (глюкоза или галактоза). Освен това гликозидът е ацилиран с маленова киселина. При MS/MS експеримента молекулният йон систематично губи две единици рамноза (146 Da) и маленова киселина вследствие на което се получава йон  $m/z$  463. Резултатният йон от MS/MS експеримента е кверцетин и неговите специфични фрагментни йони  $m/z$  179 [<sup>1,2</sup>A<sup>-</sup>],  $m/z$  151 [<sup>1,2</sup>A<sup>-</sup>-CO] и  $m/z$  107 [<sup>1,2</sup>A<sup>-</sup>-CO-CO<sub>2</sub>]. Пик **5** с  $t_R$  13.77 min е молекулен йон  $m/z$  883 е идентифициран като Кверцетин 3-*O*- $\alpha$ -L-рамнопиранозил- $\alpha$ -L-рамнопиранозил- $\beta$ -D-малонилглюкопиранозил (ацил). Молекулният йон губи ацилна група и се получава йон  $m/z$  841 ([M-H-acyl]<sup>-</sup>). Това означава, че молекулният йон е ацилиран с оцетна и маленова киселина. Същият йон ( $m/z$  841) структурно е еднакъв с предходния и претърпява същото фрагментиране.

От анализа на кверцетиновите гликозида в етил ацетатната фракция и от MS/MS данни установихме, че фрагментирането на дигликозидите е идентично с това на рутина. В полифенолния състав идентифицирахме моно- и ди- ацил гликозида на кверцетина (пикове **8,9,15**). Пик **8** с  $t_R$  12.31 min [Bojilov et al. 2023] е идентифициран като Кверцетин-*O*-(ацил)-хексозид-хексозид с молекулен йон  $m/z$  667. Същият губи ацилна група и се генерира йон  $m/z$  625 ([M-H-acyl]<sup>-</sup>), който отговаря на йон, съдържащ в структурата си две хексози. Продуктният йон систематично губи по 162 Da, като последователно се получават съответно йоните  $m/z$  463 ([M-H-acyl-162]<sup>-</sup>) и  $m/z$  301([M-H-acyl-162-162]<sup>-</sup>). Фрагментните йони  $m/z$  179 [<sup>1,2</sup>A<sup>-</sup>],  $m/z$  151 [<sup>1,2</sup>A<sup>-</sup>-CO] и  $m/z$  107 [<sup>1,2</sup>A<sup>-</sup>-CO-CO<sub>2</sub>] доказват че молекулният йон  $m/z$  667 е кверцетинов гликозид. Пиковите **9** и **15** се характеризират с един и същ молекулен йон  $m/z$  709. От MS/MS данни

установихме, че са диацил гликозиди на кверцетина. Молекулния йон губи ацилна група до получаването на йон  $m/z$  667 ( $[M-H-acyl]^-$ ), който допълнително претърпява загуба на неутрална молекула CO и се генерира йон  $m/z$  639 ( $[M-H-acyl-CO]^-$ ). Освен това молекулният йон губи 204 Da (ацил+хексоза) и води до получаването на йон  $m/z$  505 ( $[M-H-acyl-hexose]^-$ ). Същият йон губи още една ацилна група и резултатният йон е  $m/z$  463 ( $[M-H-2acyl-hexose]^-$ ). Резултатният йон от MS/MS експеримента е кверцетин и неговите характеристични йони  $m/z$  179 [ $^{1,2}A^-$ ],  $m/z$  151 [ $^{1,2}A^-CO$ ] и  $m/z$  107 [ $^{1,2}A^-CO-CO_2$ ].

Пик **18** с  $t_R$  14.85 min [Bojilov et al. 2023] беше идентифициран като Кемпферол-*O*-(ацил)-хексозид-*O*-(ацил)-хексозид с молекулен йон  $m/z$  693. Той губи директно 204 Da, което води до получаването на йон  $m/z$  489 и следваща загуба на ацилна група се получава йон  $m/z$  447. Същият йон губи 162 Da и се получава йон  $m/z$  285. В условията на ESI-MS/MS експеримента се фрагментира до йоните  $m/z$  151 [ $^{1,3}A^-$ ] and  $m/z$  107 [ $^{1,3}A^-CO_2$ ].

Пикове **10**, **13** и **16** [Bojilov et al. 2023] бяха идентифицирани като гликозиди на изорамнетин. Пикове **10** и **13** с молекулен йон  $m/z$  623, който отговаря на дигликозид, съдържащ глюкоза и рамноза. Идентифицирани са като Изорамнетин 3-*O*-глюкопиранозид-7-*O*-рамнопиранозид и Изорамнетин 3-*O*-глюкопиранозид-рамнопиранозид. Пик **16** е идентифициран като Изорамнетин 3-*O*-глюкопиранозид с молекулен йон  $m/z$  477. Фрагментният йон е 315. Характеристичните йони за изорамнетин са  $m/z$  151 [ $^{1,3}A^-$ ],  $m/z$  137 [ $-CH_3^{0,2}B^-$ ],  $m/z$  125 [ $^{1,4}A^-$ ] и  $m/z$  107 [ $^{1,3}A^-CO_2$ ].

Пикове **14** и **19** [Bojilov et al. 2023] бяха идентифицирани като Яцеозидин 7-*O*-глюкопиранозид и Яцеозидин 4'-*O*-глюкопиранозид. Те са изомери с молекулен йон  $m/z$  491. При фрагментиране се получава йон  $m/z$  328. Специфичните йони, които характеризират агликона яцеозидин са  $m/z$  164 [ $CH_3^{1,3}A^-H$ ],  $m/z$  163 [ $CH_3^{0,2}A^-$ ],  $m/z$  147 [ $^{1,3}B^-$ ],  $m/z$  136 [ $CH_3^{1,3}A^-CO$ ] и  $m/z$  133 [ $-CH_3^{1,3}B^-$ ].

Пик **17** [Bojilov et al. 2023] беше идентифициран като Хиспидулин 7-*O*-глюкопиранозид с молекулен йон  $m/z$  461. В условията на ESI-MS/MS се генерира йон ( $m/z$  297) със стабилна хиноидна форма. Хиспидулинът като 6-MF се генерират характерните йони  $m/z$  164 [ $CH_3^{1,3}A^-H$ ],  $m/z$  163 [ $CH_3^{0,2}A^-$ ],  $m/z$  147 [ $^{1,3}B^-$ ],  $m/z$  136 [ $CH_3^{1,3}A^-CO$ ] и  $m/z$  133 [ $-CH_3^{1,3}B^-$ ].

Фракционирането на полифенолите е ефективен подход. В полярните фракции (етил ацетатна и бутанолова) идентифицирахме гликозиди (моно-, ди-, три-) на кверцетина, дигликозиди на кемпферола, изорамнетина и моногликозиди на

изорамнетин, хиспидулина и яцеозидин, докладвани за първи път. Докато в хлороформената фракция идентифицирахме пектолинаригенин, деметилнобилетин и изосиненсетин. С HPLC анализ установихме, че от групата на гликозидите кверцетиновите гликозиди са основните компоненти.

## 4. GC-MS анализ на етерично масло

### 4.1. Състав на етеричното масло от *Nepeta* spp.

От направения анализ са идентифицирани 51 компонента, съставляващи 99,72 % от общото съдържание на маслото от *N. transcaucasica*. Тринадесет от тях са в концентрации над 1 %, а останалите 38 компоненти са в концентрации под 1 %. Основните терпенови съединения в маслото са както следва:  $\beta$ -цитронелол (52,05 %), евкалиптол (7,34 %),  $\beta$ -цитронелал (6,06 %), гермакрен D (5,45 %), (*E*)- $\beta$ -оцимен (5,14 %) и  $\beta$ -кариофилен (3,06 %) [Mollova et al. 2023].

Четиридесет и едно съединения бяха идентифицирани в състава на *N. cataria*, съставляващи 99,72 % от общото съдържание на маслото. Десет от тях са в концентрация над 1%, а останалите 30 компоненти са в концентрации под 1%. Основните компоненти които се съдържат в маслото са:  $\beta$ -цитронелол (26,31%), гераниол (15,92%), нерал (11,45%), нерол (9,56%), карвакрол (6,04%) и  $\beta$ -цитронелал (5.35%) [Mollova et al. 2023].

Химическият състав на двете етерични масла е подобен, като идентифицираните компоненти се различават само по количество. Етеричното масло от *N. transcaucasica* има по-високо съдържание на кислородсъдържащите монотерпени евкалиптол и  $\beta$ -цитронелол, на монотерпеновия въглеводород  $\beta$ -оцимен, на сесквитерпеновия въглеводород гермакрен D и непеталактони. В етеричното масло от *N. cataria* установихме високо съдържание на монотерпенови алкохоли нерол и гераниол, алдехиди нерал и гераниал [Mollova et al. 2023].

Данните от анализа показват, че кислородсъдържащите монотерпени доминират (78,38 и 84,93%) в състава на изследваните етерични масла, следвани от сесквитерпеновите въглеводороди (10,02% и 3,53%).

От хроматографският анализ на химичния състав на етеричното масло от *N. transcaucasica* установихме, че съдържанието на основните компоненти се различава от данните в литературата. Според Baranauskienė основните компоненти са кислородсъдържащи монотерпени като цитронелол (17,69%), гераниал (9,05%) и геранил ацетат (8,20%) [Baranauskienė et al. 2019]. Mishurova докладва, че основните компоненти са монотерпенови въглеводороди като  $\alpha$ -пинен (2,2 %),  $\beta$ -пинен (11,8 %),

мирцен (0,5 %), лимонен (7,4 %) и  $\gamma$ -терпинен (7,81 %) [Mishurova & Shikhiev 1977]. Според Pelyakh основните компоненти са кислородсъдържащи монотерпени като цитрал (8.1-24.6%) и цитронелол (21.6-54.8%) [Pelyakh et al. 2016]. Kilic докладва, че основното съединение е кислородсъдържащия монотерпен 1,8-цинеол (14,4%) [Kilic, 2018]. Съдържанието на непеталактони в етеричното масло от *N. transcaucasica* е ниско в сравнение с данните докладвани от Baranauskienė (14,34%), Kilic (18,5%), Karakuş (93,75%) и Işcan (над 65%) [Baranauskienė et al. 2019; Kilic, 2018; Karakuş et al. 2019; Işcan et al. 2011].

В етерично масло от *N. cataria* също установихме разлики с данните от литературата по отношение на съдържанието на кислородсъдържащите монотерпени като  $\beta$ -цитронелол, гераниол, нерал, нерол, карвакрол и  $\beta$ -цитронелал.

Съдържанието на непеталактони в етеричното масло от *N. cataria* е ниско в сравнение с данните, докладвани в литературата. Процентното им съдържание достига до 70-81% [Baranauskienė et al. 2019; Tiwari et al. 2023; Azizian et al. 2021]. Тези разлики могат да се обяснят главно с това как се получават етеричните масла. При парната дестилация, използвана в това изследване, само първичното масло се отделя в приемника на апарата, а получените дестилати се изхвърлят. В лабораторната стъклария, където суровината се обработва чрез водна дестилация, първичните и вторичните масла се разделят в приемника. Khajeh установява, че различните технологични фактори, като температура, налягане и продължителност влияят върху химичния състав на етеричното масло, включително съдържанието на непеталактон [Khajeh et al. 2010].

## 5. Изследване *in vitro* биологична активност

### 5.1. Изследване на антиоксидантната активност

В човешкия организъм жизнено важните  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  йони участват като кофактори в множество ензими и в различни физиологични процеси. Но във свободна форма те проявяват токсичен ефект тъй като  $\text{Cu}^{2+}$  йоните катализират окислението на аскорбиновата киселина и се генерират реактивоспособни кислородни системи (ROS) като супероксидни радикали ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) и  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Освен това  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  йони реагират с  $\text{H}_2\text{O}_2$  и се генерират хидроксилни радикали ( $\cdot\text{OH}$ ) чрез реакцията на Фентън [Chalana et al. 2022]. ROS увреждат жизнено важни молекули с важно биологично значение като фосфолипиди, протеини и ДНК. Това химическо увреждане обикновено се нарича оксидативен стрес и се счита отговорно за множество здравословни разстройства като

рак, сърдечно-съдови заболявания, атеросклероза и болест на Алцхаймер [Galano et al. 2010].

Освен процесите на оксидативния стрес, възпалителния процес също причинява и ускорява образуването на ROS. Най-вече образуването на супероксиден анионен радикал на мястото на възпалението и това е свързано с образуването на други ROS видове напр.  $H_2O_2$ . Той участва и в реакции на редукционно разлагане (т.нар. реакция на *Haber-Weiss*) и органични хидропероксиди ROOH [Halliwell, 1985]. Хидроксилният радикал ( $\cdot OH$ ), продукт на ROS е най-силният оксидант. Той се генерира от 1-електронни редукции на молекулен кислород ( $O_2$ ) в клетъчния метаболизъм и е отговорен основно за цитотоксичните ефекти, наблюдавани в аеробни организми, в това число и човешкия организъм [Bektaşoğlu et al. 2006].

#### 5.1.1. Изследване антиоксидантната активност на етерични масла от *Helichrysum italicum* и *Nepeta* spp.

Изследвана е антиоксидантната активност на етеричното масло от два вида *Nepeta* (*Nepeta transcaucasica* и *Nepeta cataria*) и *Helichrysum italicum*. Използвани са различни методи, с които е оценена способността на етеричните масла да инхибират свободните радикали и способността да редуцират медни ( $Cu^{2+}$ ) и железни ( $Fe^{3+}$ ) йони.

В зависимост от механизма на антиоксидантната реакция, методите се разделят на две групи – трансфер на водороден атом (HAT) и трансфер на единичен електрон (SET). Методът HAT се основава на способността на антиоксиданта да елиминира свободните радикали чрез донор на водород. Методите SET се характеризират с редукционната способност на пренос на един електрон на тествания антиоксидант към радикален вид. FRAP и CUPRAC са методи за пренос на един електрон. Методите ABTS и DPPH се отнасят към двете групи (HAT и SET) [Jimenez et al, 2004; Prior et al, 2005].

Използвани са методите ABTS, DPPH, CUPRAC и FRAP за оценка на антиоксидантната активност на етеричното масло от *Helichrysum italicum* и от *Nepeta* spp. Антиоксидантното действие на маслата се обяснява с високото съдържание на кислород съдържащи монотерпени [Mollova et al. 2020, 2023].



### 5.1.2. Изследване на антиоксидантната активност на фракционирания полифенолен състав от *Chenopodium botrys*.

В настоящата работа изследвахме възможността полифенолите от *Chenopodium botrys* да предотвратят вредното действие на водородния пероксид, хидроксилни радикали и нитрооксидни радикали. Трябва да се има предвид, че ROS и RNS са продукти съответно на оксидативния и нитрозативен стрес, които се срещат в аеробни организми, включително човека. За да се оцени антиоксидантният ефект, полифенолният комплекс се фракционира с помощта на разтворители с различна полярност. В раздели 2.6 и 3.4 полифенолният състав е разгледан подробно. Полифенолните компоненти във всички фракции бяха анализирани и идентифицирани чрез HPLC-PDA и UHPLC-MS. В този раздел ние изследваме потенциалната биологична активност, както и връзката структура-активност.

#### ***Дезактивиране на водороден пероксид (Hydrogen Peroxide Scavenging Activity (HPSA))***

Резултатите, получени за антиоксидантната активност на отделните фракции сравнихме с природни съединения, с доказани антиоксидантни свойства като аскорбинова киселина и кверцетин. Стойностите на антиоксидантна активност на получените фракции варират от 39,18  $\mu\text{g/mL}$  до 978,07  $\mu\text{g/mL}$  [Bojilov et al. 2023].

В сравнение с аскорбиновата киселина (24,84  $\mu\text{g/mL}$ ) и кверцетин (69,25  $\mu\text{g/mL}$ ), получените фракции демонстрират ниска HPSA с изключение на етилацетатната фракция. Тя показва значително по-висока антиоксидантна активност в сравнение с останалите фракции и около два пъти по-висока от тази на стандарта кверцетин [Bojilov et al. 2023]. Антиоксидантната активност зависи от структурата на флавоноидите, наличието на гликозилни остатъци и метокси групи [Russo, 2018]. За това кверцетин моно- и ди-гликозидите се характеризират с по-висока HPSA, в сравнение с метокси флавонолите и кверцетин тригликозидите. Метокси флавонолите показват ниска активност. Наличието и увеличаването броя на метокси групи в пръстен В понижава степента на инхибиране на водородния пероксид. Но притежават по-висока активност от кверцетин тригликозидите. С увеличаване масата на гликозилния остатък в позиция С-3 намалява антиоксидантната активност [Xiao, 2017]. Това е причината бутаноловата фракция да показва ниска HPSA. От анализа установихме, че антиоксидантна активност много добре се асоциира със съдържание на общи феноли, танини и кверцетинови гликозиди. HPSA

на фракциите намалява в следния ред: EtOAc > CHCl<sub>3</sub> > n-Hexan > BuOH [Bojilov et al. 2023].

### ***Улавяне на хидроксилни радикали (Hydroxyl Radical Scavenging Activity (HRSA))***

Високата *HRSA* зависи от структурата на полифенолните съединения. Стандартите, които използвахме са структурно различни. В получените фракции полифенолният състав има структура на флавоноидното ядро. За това използвахме кверцетин като стандарт. Концентрационният градиент на кверцетинови гликозиди е пропорционален на антиоксидантната активност. Кверцетин моно- и ди-гликозиди, съдържащи се в етилацетатната фракция показват значително по-висока *HRSA* ( $IC_{50} = 105.03 \mu g/mL$ ) [Bojilov et al. 2023]. Докато другите три фракции проявяват *HRSA* статистически близка до тази на кверцетина. От анализа установихме, че полярният и неполярният полифенолен състав в *C. botrys* има по-голям афинитет към обезвреждане на силно активните ОН радикали [Bojilov et al. 2023]. Това се обяснява с факта, че в пръстен В има свободни ОН групи (С-3' and С-4'). Активността на 6-метокси флавонолите се различава по функционалните групи в пръстен В. В него се съдържат както ОН групи (Hispidulin and Nepetin) така и ОСН<sub>3</sub> групи (С-3' for Jaceosidine and С-3', С-4' for Eupatilin). *O*-метирирането на ОН групи в пръстен В води до намаляване на *HRSA* [Russo, 2018; Trembl, 2016]. Кверцетин тригликозидите показват ниска *HRSA* в сравнение с кверцетин моно- и ди-гликозидите. Това се дължи на факта, че *O*-гликозирирането на С-3 ОН група и увеличаването на карбохидратните единици води до намаляване на антиоксидантния капацитет [Russo, 2018, Xiao, 2017]. Този резултат се потвърждава и от мас спектралния анализ, който доказва, че С-3 ОН група е конюгирана с карбохидратни единици. Най-вероятно на този факт се дължи ниската *HPSA* and *HRSA* на бутаноловата фракция.

### ***Улавяне на нитро оксидни радикали (Nitric Oxide Scavenging Activity (NOSA))***

NO се генерира от крайния гуанидо азотен атом на L-аргинин от различни NADPH-зависими ензими, наречени NO синтази (NOS). NO е съществена биорегулаторна молекула, необходима за няколко физиологични процеса като предаване на невронни сигнали, имуен отговор, вазодилатация и контрол на кръвното налягане и т.н. Супероксидният йон (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) взаимодейства с молекулата на NO, при което се получават междинни продукти като NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, и стабилните продукти като нитрат и нитрит. Именно образуването на реактивоспособни азотни видове (*RNS*) е известно като

нитрозативен стрес, който е отговорен за няколко патологични състояния, включително рак [Jagetia, 2004; Lala, 1998]. В сравнение с кверцетина ( $IC_{50}$  64.82  $\mu\text{g/ml}$ ) фракциите показват ниска NOSA.  $IC_{50}$  на отделните фракции варира от 146.59 до 227.12  $\mu\text{g/ml}$  [Bojilov et al. 2023].

При HPSA and HRSA се установява една и съща зависимост т. е. кверцетиновите моно- и ди- гликозиди са по-активни. От това можем да заключим, че те имат способността да неутрализират ROS. Докато при дезактивирането на NO радикали се наблюдава обратна зависимост, което показва, че 6-метоксифлавоните демонстрират добра NOSA в сравнение с кверцетиновите гликозиди. Установено е, че агликоните имат по-голям афинитет към NO радикали, както и наличието на  $OCH_3$  групи в пръстен В допринася за високия антиоксидантен капацитет [Matsuda et al. 2003]. Може би на този факт се дължи хлороформената фракция да проявява висока NOSA.

От експерименталните данни можем да извлечем важна информация за свойствата на биологично активните компоненти, съдържащи в *C. botrys*. Моно- и ди-гликозидите на кверцетина са мощни антиоксиданти и имат способността да предпазват аеробните организми от вредното въздействие на ROS. Докато 6-метокси флавоните са по-ефективни при улавянето на NO радикали.

## 5.2. Изследване *in vitro* на противовъзпалителна и анти-артритна активности на фракционирания полифенолен състав от *Chenopodium botrys*

### **Инхибиране денатурацията на албумин (IAD)**

Възпалението е процесът на реакция на живите тъкани към стимули, предизвикани от възпалителни агенти като физически наранявания, топлина, микробни инфекции и вредни химически дразнения. Отговорът на клетките към възпаление ще доведе до определени патологични прояви, характеризиращи се със зачервяване, топлина, подуване и болка с дори нарушени физиологични функции. Възпалението е замесено в патогенезата на много заболявания, включително артрит, инсулт и рак. Денатурацията на протеини е добре свързана с появата на възпалителния отговор и води до различни възпалителни заболявания, включително артрит [Osman et al. 2016]. Според Opie [Opie, 1962] тъканното увреждане по време на живота може да се дължи на денатурация на протеиновите съставки на клетките или на междуклетъчното вещество. Следователно, способността на дадено вещество да инхибира денатурацията на протеина означава очевиден потенциал за противовъзпалителна активност.

Получените фракции от огниче бяха изследвани за инхибиране денатурацията на албумин. Този метод предоставя информация в каква степен албуминът може да бъде защитен от денатурация при нагряване. За тази цел сме използвали човешки албумин. Резултатите от изследването са представени като IC<sub>50</sub>. Тъй като ибупрофенът и кетопрофенът имат доказани противовъзпалителни свойства, решихме да ги използваме като еталони за сравняване активността на различните фракции от *C. botrys*. IC<sub>50</sub> на ибупрофена и кетопрофена оценени като IAD са съответно 81,50 µg/mL и 126,58 µg/mL [Bojilov et al. 2023]. Получените резултати показват, че IC<sub>50</sub> на различните фракции са в диапазона от 461,41 до 945,06 µg/mL [Bojilov et al. 2023].

Сравнявайки със стандартите фракциите показват ниска степен на защита на албумина от денатуриране. Оценявайки степеня на защита на албумина по полярност на фракциите етилацетатната фракция показва висока активност. Това показва, че конфигурацията на полярните кверцетинови моно- и ди-гликозиди имат по-голям афинитет към алостеричното свързване с албуминовата молекула. По този начин тя се стабилизира и е устойчива и не позволява денатурацията на албумина. За това етилацетатната фракция е подходяща за извличане на потенциално активните биологично активни кверцетинови моно- и ди-гликозиди. Активността на кверцетин тригликозидите статистически не се различава от тази на 6-метокси флавонови.

### ***Анти триптична активност (АТА)***

Установено е, че протеиназите са причина за артритни заболявания. Известно е, че неутрофилите са богат източник на протеинази, които в лизозомните си гранули се съдържат голям брой серинови протеинази. Знае се, че протеиназата, съдържаща се в левкоцитите играе важна роля в увреждане на тъканите по време на възпалителни реакции и значително ниво на защита се осигурява от протеиназните инхибитори [Oyedapo & Famurewa, 1995].

*In vitro* анти-артритната активност е оценена като анти-триптична активност [Oyedapo & Famurewa, 1995]. Целта на това изследване е свързана с инхибирането на ензима трипсин, който също е от групата на сериновите протеинази.

Резултатите от IC<sub>50</sub> за АТА варират от 116,23 до 561 µg/mL. Данните от анализа показват, че полярните фракции проявяват по-висока инхибираща активност от тази на ибупрофена и кетопрофена. Етилацетатната, бутаноловата и хлороформената фракции се характеризира с по-висока АТА (116,23 – 202,44 µg/mL) [Bojilov et al. 2023]. Следователно от анализа установяваме, че кверцетиновите гликозиди и 6-метокси

флавононите се характеризират с висока активност от стандартните профени. Каталитичният център на ензима се състои от три полярни аминокиселини серин, аспартат и хистидин.

Научни изследвания доказват, че кверцетина образува Н-връзки с полярните аминокиселини, участващи в активния център на трипсина [Xue et al. 2017]. Затова предполагаме, че кверцетиновото ядро от гликозидите, както и метоксифлавононите образуват Н-връзки, като по този начин инхибират действието на ензима. Високата активност на кверцетиновите гликозиди се дължи на факта, че кверцетиновото ядро е съвместимо с активния център на трипсина. Намаленият ред на анти-триптична активност на фракциите от *C. botrys* е следният EtOAc > BuOH > CHCl<sub>3</sub> > n-Hexan, което означава, че при инхибирането на трипсина по-активни са кверцетин моно-, ди-гликозиди, следвани от кверцетин тригликозиди и 6-метокси флавонони.

Кверцетиновите гликозиди и 6-метокси флавонони се характеризират с висока *in vitro* анти-артритна активност, оценена чрез АТА, но само моно- и ди гликозидите демонстрират висока *in vitro* противовъзпалителна активност. За това фракционирането е важен етап от анализа, чрез който се осъществява разделянето на компонентите по полярност. По този начин всеки клас съединения може да намери своето медицинско и фармакологично приложение.

## 6. Самооценка на приносите

1. Разработване на хроматографски профил пръстов отпечатък „*fingerprint*“ на полифенолния състав на изследваните медицински растения и три вида марули. Хроматографските профили се използват за установяване на характерен химичен модел за растението, фракцията или екстракта. Хроматографският профил е от изключително значение при създаване на методи за анализ на храни, медицински растения и билкови лекарства. Основните точки при генерирането на хроматографски профили на пръстови отпечатъци на полифеноли са правилната процедура на екстракция и хроматографските условия, водещи до максимален брой на добре разделени пикове. Обикновено при HPLC анализ за екстракция на фенолни киселини и флавоноидни гликозиди се използва 60–70% воден метанол.
2. Използване на комбинирани техники като HPLC-PDA, UHPLC-MS и сурогатни стандарти за идентифициране на полифеноли в неизследваните

билки. С помощта на тях са идентифицирани кафеоилхинови киселини (моно и ди), апигенинови и лутеолинови гликозиди, съдържащи се във *Vernonia amygdalina*.

3. Фракционирането на полифенолите е полезен етап при тяхното анализиране с HPLC-PDA и UHPLC-MS-MS. Хроматографските прпфили на фракциите дават подробна информация за полифенолите. Този подход улеснява идентификацията на полифенолните компоненти.
4. Разработките имат научни и приложни приноси в HPLC-MS/MS за идентификация и изясняване структурата на биологично активни съединения. Изследвана е структурата на 6-метокси флаволи и гликозиди в отрицателен режим на йонизация. Идентифициран е полифенолният състав в медицински растения. Идентифицирани са гликозиди и флаволи, които досега не са докладвани в състава на *Chenopodium botrys*. В полифенолният състав на *Rosa damasceneca* са идентифицирани нови 6 гликозида на галова киселина, кверцетин галоил хексозид и кемпферол дизахарид, които са докладвани за първи път. Във *Vernonia amygdalina* са идентифицирани кафеоилхинови киселини, апигенинови и лутеолинови гликозиди.
5. Изследван е съставът на етеричното масло на два вида *Nepeta* – *Nepeta transcaucasica* и *Nepeta cataria*. В двете масла най-високо е съдържанието на кислород съдържащи монотерпени. Основните компоненти в *N. transcaucasica* са  $\beta$ -цитронелол, евкалиптол,  $\beta$ -цитронелал, гермакрен D, (*E*)- $\beta$ -оцимен и  $\beta$ -кариофилен, докато в *N. cataria* са  $\beta$ -цитронелол, гераниол, нерал, нерол, карвакрол и  $\beta$ -цитронелал.
6. Изследвана е антиоксидантната активност на етеричните масла от *Helichrysum italicum* и *Nepeta* spp. Етеричните масла от *H. italicum* и *N. cataria* се характеризират с висока антиоксидантна активност, дължаща се на високото съдържание на кислород съдържащи монотерпени.
7. Фракционираният полифенолен състав на *C. botrys* е тестван за *in vitro* биологична активност. Установено е, че фракциите проявяват антиоксидантна активност, оценена чрез HPSA, HRSA и NOSA.



Кверцетиновите дигликозиди проявяват афинитет към обезвреждане на ROS, докато 6-метокси флавонолите са по-активни към обезвреждае на нитрооксидните радикали. Кверцетиновите гликозиди и 6-метокси флавоноли се характеризират с висока *in vitro* анти-артритна активност, оценена чрез АТА, но само моно- и дигликозидите демонстрират висока *in vitro* противовъзпалителна активност. Тези класове съединения могат да намерят приложение в разработката на нови фармацевтични продукти с медицинско и фармакологично приложение.

8. Изследвано е съдържанието на тривида марули – *Lactuca sativa Batavia cv. Maritima*, *Lolo rosa cv. Tuska* и *cv. Winter Butterhead*. Изследвана е зависимостта между различни практики на торене и полифенолният състав. Установено е, че прилагането на различните практики на торене влияят върху съдържанието полифеноли. Използването на органични торове води до увеличаване на съдържанието им в *Lolo rosa cv. Tuska* и *cv. Winter Butterhead*. *Batavia cv. Maritima* е най-чувствителна към промените, като съдържанието им в не торените проби е по-високо.
9. Направена е антиоксидантна активност на 7 вида диво растящи ядливи гъби (*Boletus pinophilus*, *Cantharellus aurora*, *Cantharellus tubaeformis*, *Cantharellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Morchella esculenta* и *Tricholoma equestre*), събирани от Родопска планина в района на град Батак. Като методи за оценка на тяхната антиоксидантна активност са използвани DPPH, ABTS, FRAP и CUPRAC. Стойностите са представени като TEAC. Използван е Trolox като стандарт. *Boletus pinophilus* се характеризира с най-висока активност.
10. Направен е мас спектрален анализ на различно заместени 2-фенилетиламини и техни циклични аналози. Също така и на триптаминови хибридни молекули с различен профенов остатък.
11. Изследвана е *in vitro* биологична активност на ново-синтезирани биофункционални хибридни молекули. Направена е антиоксидантна активност, оценена с дезактивиране на водороден пероксид (HPSA). Тези съединения съдържат в структурата си профенов фрагмент и затова е направена *in vitro* противовъзпалителна активност (оценена с инхибиране

денатурацията на албумин – IAD) и *in vitro* анти-артритна активност (оценена с анти триптична активност – АТА). От анализа е установено, че всички хибридни молекули наследяват противовъзпалителните и анти-артритни свойства на профените.

- 12.** Изследвана е *in vitro* биологична активност на 1,2,3,4-Тетрахидроизохинолин сулфонамидни производни. Ново-синтезираните сулфон амиди се характеризират с значителна антиоксидантна (HPSA), *in vitro* противовъзпалителна активност (IAD) и анти-артритна активност (АТА). Това ги прави надеждни и ефективни лекарства.

## 7. Използвана литература

- Abdel-Hameed, E.-S., Bazaid, S. A. & Shohayeb, M. M. (2012). Total phenolics and antioxidant activity of defatted fresh Taif rose, Saudi Arabia. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 2(3), 129-140.
- Azizian, T., Alirezalu, A., Hassani, A., Bahadori, S., & Sonboli, A. (2021). Phytochemical analysis of selected *Nepeta* species by HPLC-ESI-MS/MS and GC-MS methods and exploring their antioxidant and antifungal potentials. *J. Food Meas. Charact.* 15, 2417–2429.
- Baranauskienė, R., Bendžiuvienė, V., Ragažinskienė, O., & Venskutonis, P. (2019). Essential oil composition of five *Nepeta* species cultivated in Lithuania and evaluation of their bioactivities, toxicity and antioxidant potential of hydrodistillation residues. *Food Chem. Toxicol.*, 129, 269–280.
- Bektaşoğlu, B., Esin Çelik, S., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2006). Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 1194–1200.
- Bojilov, D., Dagnon, S., & Ivanov, I. (2017). New insight into the flavonoid composition of *Chenopodium botrys*. *Phytochemistry Letters*, 20, 316–321.
- Bojilov, D., Dagnon, S., Kostadinov, K., & Filipov, S. (2020). Polyphenol composition of lettuce cultivars affected by mineral and bio-organic fertilization. *Czech Journal of Food Sciences*, 38(6), 359–366.
- Bojilov, D., Manolov, S., Nacheva, A., Dagnon, S., & Ivanov, I. (2023). Characterization of Polyphenols from *Chenopodium botrys* after Fractionation with Different Solvents and Study of Their In Vitro Biological Activity. *Molecules*, 28(2), 4816.
- Chalana, A., Kumar Rai, R., Karri, R., Kumar Jha, K., Kumar, B., & Roy, G. (2022). Interplay of the intermolecular and intramolecular interactions in stabilizing the thione-based copper(I) complexes and their significance in protecting the biomolecules against metal-mediated oxidative damage. *Polyhedron*, 215, 115647.
- Clifford, M. N., (2017). Technical Report: Some Notes on the Chlorogenic Acids. Part 4. Botanical Distribution of the Chlorogenic Acids. .

- [https://www.researchgate.net/publication/312591202\\_Some\\_Notes\\_on\\_the\\_Chlorogenic\\_Acids\\_Part\\_4\\_Botanical\\_Distribution\\_of\\_the\\_Chlorogenic\\_acids\\_Version\\_1\\_January\\_2017](https://www.researchgate.net/publication/312591202_Some_Notes_on_the_Chlorogenic_Acids_Part_4_Botanical_Distribution_of_the_Chlorogenic_acids_Version_1_January_2017).
- Clifford, M. N., Knight, S., & Kuhnert, N., (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), 3821–3832.
- Craig, P. A., Fields, C., Liang, N., Kitts, D., & Erickson, A. (2016). Performance review of HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. *Talanta* 154, 481–485.
- Dagnon, S., Bojilov, D., Docheva, M., & Edreva, A. (2018). The Relationship between Main Polyphenol Components and Free Radical Scavenging Activity of Selected Medicinal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 10(03), 131–138.
- Dagnon, S., Novkova, Z., Bojilov, D., Nedialkov, P., & Kouassi, C. (2019). Development of surrogate standards approach for the determination of polyphenols in *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103231.
- Dragoev, S., Vlahova-Vangelova, D., Balev, D., Bozhilov, D., & Dagnon, S. (2021). Valorization of waste by-products of rose oil production as feedstuff phytonutrients. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 27(1), 209–219.
- Galano, A., Macías-Ruvalcaba, N. A., Medina Campos, O. N., & Pedraza-Chaverri, J. (2010). Mechanism of the OH Radical Scavenging Activity of Nordihydroguaiaretic Acid: A Combined Theoretical and Experimental Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(19), 6625–6635.
- Georgieva, K., Dagnon, S., Gesheva, E., Bojilov, D., Mihailova, G., & Doncheva, S. (2017). Antioxidant defense during desiccation of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 114, 51–59.
- Halliwell, B. *Gutterdge Free Radicals in Biology and Medicine*; Clarendon Press: Oxford, UK, 1985; p. 346.
- Innocenti, G., Dall'Acqua, S., Giorgetti, M. E., Vegeto, P., Ciana, E., Agradi, A., Sozzi, G., & Fico, F.T. (2007). In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. *Phytomedicine* 14, 147–152.
- Işcan, G., Köse, Y., Demirci, B., & Can Başer, K. H. (2011). Anticandidal activity of the essential oil of *Nepeta transcaucasica* Grossh. *Chem. Biodiversity*. 8, 2144–2148.
- Jagetia, G. C., & Baliga, M. S. (2004). The evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain Indian medicinal plants in vitro: A preliminary study. *Journal of Medicinal Food*, 7, 343–348.
- Jimenez, A., Selga, A., Torres, J. L., & Julia, L. (2004). Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols. *Organic Letters*, 6(24), 4583–4586.
- Johnson, E. C., Long-Ze, Lin, Harnly, M. J., Oladeinde, O. F., Kinyua, A. M., Michelin, R., & Bronner, Y. (2011). Identification of the phenolic components of *Vernonia amygdalina* and *Russelia equisetiformis*. *J. Nat. Prod.* 4, 57–64.
- Karakuş, S., Tiryaki, D., Aydın, I., & Atıcı, Ö. (2019). Investigation of herbicidal effects of essential oil of *Nepeta transcaucasica* Grossh. On some cultivated and weed plants. *Doğu Fen Bilimleri Dergisi / J. Nat. Appl. Sci. East.* 2, 69–79.

- Kilic, O. (2018). Essential oil and fatty acid composition of leaves of some Lamiaceae taxa from Turkey. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 21, 1706–1711.
- Lala, P. K. (1998). Significance of nitric oxide in carcinogenesis, tumor progression and cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17, 1–6.
- Llorach R., Martínez-Sánchez A., Tomás-Barberán F. A., Gil M. I., & Ferreres F. (2008). Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry*, 108, 1028–1038.
- Materska M., Olszówka K., Chilczuk B., Stochmal A., Pecio Ł., Pacholczyk-Sienicka B., Piacente S., Pizza C., & Masullo M. (2019). Polyphenolic profiles in lettuce (*Lactuca sativa* L.) after CaCl<sub>2</sub> treatment and cold storage. *European Food Research and Technology*, 245, 733–744.
- Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I., & Yoshikawa, M. (2003). Structural Requirements of Flavonoids for Nitric Oxide Production Inhibitory Activity and Mechanism of Action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(9), 1995–2000.
- Mishurova, S. S., & Shikhiev, A. S. (1977). The monoterpene fraction of the essential oil of *Nepeta transcaucasica*. *Chem. Nat. Compd.* 13, 733–733.
- Mollova, S., Dzhurmanski, A., Fidan, H., Bojilov, D., Manolov, S., Dincheva, I., ... Bari, A. (2023). Chemical Composition of Essential Oils from *Nepeta transcaucasica* Grossh. and *Nepeta cataria* L. Cultivated in Bulgaria and Their Antimicrobial and Antioxidant Activity. *ACS Omega*, 8(17), 15441–15449.
- Mollova, S., Fidan, H., Antonova, D., Bozhilov, D., Stanev, S., Kostova, I., & Stoyanova, A. (2020). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subspecies essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 44(4), 371–378.
- Ola, S. S., Catia, G., Marzia, I., Francesco, F. V., Afolabi, A. A., & Nadia, M. (2009). HPLC/DAD/MS characterisation and analysis of flavonoids and cinnamoyl derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. *Food Chem.* 115 (4), 1568–1574.
- Opie, E. L. (1962). On the relation of necrosis and inflammation to denaturation of proteins. *J Exp. Med.*, 115, 597–608.
- Osman, N. I., Sidik, N. J., Awal, A., Adam, N. A. M., & Rezali, N. I. (2016). In vitro xanthine oxidase and albumin denaturation inhibition assay of *Barringtonia racemosa* L. and total phenolic content analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis. *J Journal of Intercult Ethnopharmacol*, 5(4), 343–349.
- Oyedapo, O. O., & Famurewa, A. J. (1995). Antiprotease and membrane stabilizing activities of extracts of *fagara zanthoxyloides*, *olax subscorpioides* and *tetrapleura tetraptera*. *International Journal of Pharmacognosy*, 33(1), 65–69.
- Pelyakh, Y., Melnik, V., Chobanu, V., & Unguryanu, I. (2016). Plants perspective with content from citrali in oil ethereal. *Studia Universitatis Moldaviae*, 96, 29–33.
- Peng Y., Quancai S., & Yeonhwa P. (2019). The bioactive effects of chicoric acid as a functional food ingredient. *Journal of Medicinal Food*, 22, 645–652.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.

- Romani A., Pinelli P., Galardi C., Sani G., Cimato A., & Heimler, D. (2002). Polyphenols in greenhouse and open-airgrown lettuce. *Food Chemistry*, 79, 337–342.
- Russo, D. (2018). Flavonoids and the Structure-Antioxidant Activity Relationship. *Journal of Pharmacognosy & Natural Products*, 04(01), 30–31.
- Schieber, A., Mihalev, K., Berardini, N., Mollov, P. & Carlea, R. (2005). Flavonol glycosides from distilled petals of *Rosa damascena* Mill. *Zeitschrift für Naturforschung C – A Journal of Biosciences*, 60(5-6), 379-384.
- Sofo A., Lundegårdh B., Mårtensson A., Manfra M., Pepe G., Sommella E., De Nisco M., Tenore G. C., Campiglia P., & Scopa A. (2016). Different agronomic and fertilization systems affect polyphenolic profile, antioxidant capacity and mineral composition of lettuce. *Scientia Horticulturae*, 204, 106–115.
- Tiwari, G., Chaturvedi, T., Gupta, A., Lal, R., Verma, R., Srivastava, R., Singh, P., Gangwar, B., Darokar, M., & Dhawan, S. (2023). Assessment of genetic diversity, micromorphology and antimicrobial activity in *Nepeta cataria* L. *Chem. Biodiversity*, 20(2), e202200241.
- Treml, J., & Šmejkal, K. (2016). Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 720–738.
- Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1874–1905.
- Xue, G., Gong, L., Yuan, C., Xu, M., Wang, X., Jiang, L., & Huang, M. (2017). A structural mechanism of flavonoids in inhibiting serine proteases. *Food and Function*, 8(7), 2437–2443.
- Zhou W., Liang X., Dai P., Chen Y., Zhang Y., Zhang M., Lu L., Jin C., & Lin X. (2019). Alteration of phenolic composition in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by reducing nitrogen supply enhances its anti-proliferative effects on colorectal cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 4205.

18.06.2023

Подпис.....

Гр. Пловдив

/гл. ас. д-р Димитър Божилов/