

Надежда Стоянова Костова

АЛКАЛОИДЕН СЪСТАВ НА ВИДОВЕ ОТ РОД

SENECIO

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за придобиване на образователна и научна степен “доктор”

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

Научен ръководител: доц. Веселин Христов

София, 2018

Използвани съкращения

ПАи – пиролизидинови алкалоиди

УВ - спектроскопия – ултравиолетова спектроскопия

ИЧ - спектроскопия – инфрачервена спектроскопия

МС – масспектрометрия, масспектър, масспектрална

ЯМР – ядрено - магнитен резонанс

НАД⁺ – коензим никотинамидадениндинуклеотид

ТАС – тотална алкалоидна смес

ГХ/МС – газова - хроматография/масспектрометрия, газ - хроматографски/масспектрален

КХ – колонна хроматография

ТСХ – тънкослойна хроматография

ПТСХ – препаративна тънкослойна хроматография

ЕЙ (или EI) – електронна йонизация

ХЙ (или CI) – химична йонизация

ТХ/МС – течна хроматография с мас селективен детектор

ВЕТХ – високоефективна течна хроматография

EFSA – Европейски орган за безопасност на храните

RI – време на задържане

WHO – Световна здравна организация

¹H-¹H COSY – двумерна хомоядрена корелация

HMQC – двумерна хетероядрена корелация през една връзка

HMBC – двумерна хетероядрена корелация през повече от една връзка

ВЪВЕДЕНИЕ

Растенията биосинтезират голямо разнообразие от вторични метаболити, които им дават предимства в процеса на еволюция като защитна функция срещу тревопасни животни, микробни патогени, и други външни фактори. Много от вторичните метаболити притежават важни биологични свойства и имат медицинско значение. Интересно е да се отбележи, че някои растения се използват в традиционната медицина, а техни активни компоненти влизат в състава на редица лекарствени продукти в официалната медицина. Противно на популярното схващане, че лечебните растения са безопасни и имат по - малко странични ефекти, отколкото синтетичните лекарства, са открити медицински растения, които са токсични както за човека, така и за животните. Токсичността на тези растения се дължи на съдържащите се в тях съединения, между които на първо място са пиरोлизидиновите алкалоиди.

Пиरोлизидиновите алкалоиди (ПАи) са голяма група сходни по структура природни съединения, широко разпространени в растенията от семейства Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae, Orchidaceae и Arosynaceae. Най-голям брой пиролизидиновите алкалоиди са идентифицирани във видове от род *Senecio* (Asteraceae). Като характерни вторични метаболити те се използват в растителната хемосистематика. Освен това ПАи играят ключова роля при защитата на растенията

срещу насекоми и тревопасни животни, както и като прекурсори в биосинтезата на феромони при молци и пеперуди.

През последните години интересът към ПАи е породен от факта, че те представляват значителен световен риск за общественото здраве. Поради широкото разпространение на растенията, биосинтезиращи този клас алкалоиди нараства възможността за случайно замърсяване на фуражи и храни, като билкови чайове, мед, мляко, яйца и др. Попадайки в организма, пиролизидиновите алкалоиди претърпяват метаболитна активация и проявяват токсичен ефект, свързан предимно с увреждане на черния дроб. Доказано е, че 1,2 -ненаситените ПАи имат генотоксични свойства и показват канцерогенни ефекти. Ето защо е важно да се създаде надеждна и чувствителна платформа за скрининг за идентифициране и количествено определяне на ПАи.

Цел и задачи

Целта на настоящата дисертация е изследване алкалоидния състав на представители на род *Senecio*, разпространени в България, както и намиране на връзки и зависимости между установения алкалоиден състав и разпределението на видовете според “Flora Europaea”.

За постигане на тези цели бяха поставени следните задачи:

1. Детайлно фитохимично охарактеризиране на алкалоидния състав на български видове от род *Senecio*.
2. Количествено денситометрично определяне на 1,2 - ненаситени пиролизидинови алкалоиди.
3. Използване на подход за сравнително разглеждане на видовете въз основа на установения алкалоиден състав.

СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

1. Растителен материал

Растителният материал от 13 български вида и един подвид на род *Senecio* е събран от различни находища във фаза на цъфтеж.

Хербарийни образци от всички видове и находища са депозираны в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания (ИБЕИ - БАН).

Таблица 2* . Изследвани растителни видове и находища, от които са събрани.

Изследвани видове	Код	Находище
Секция DORIA		
<i>S. othonnae</i> Vieb.	Soth	Родопи
	Soth1	Източна Стара планина
<i>S. nemorensis</i> L.	Snem	Рила
	Snem1	Родопи
<i>S. nemorensis</i> ssp. <i>fuchsii</i> (C. C. Gmelin) Celak	Snfu	Рила (Белчин баня)
Секция CROCISERIS		
<i>S. paludosus</i> L.	Spal	Русе
<i>S. doronicum</i> L.	Sdor	Рила
Секция TEPHROSERIS		
<i>S. rapposus</i> (Reichenb.) Less.	Spap	Витоша
	Spap1	Родопи
Секция JACOBAEA		
<i>S. pancicii</i> Degen	Span	Рила
<i>S. jacobaea</i> L.	Sjac	Лом-Орсое
	Sjac1	Славянка планина
<i>S. rupestris</i> Waldst&Kit	Srup	Рила
<i>S. abrotanifolius</i> ssp. <i>carpathicus</i> (Herbich) Nyman	Saca	Рила
<i>S. aquaticus</i> Hill	Saqu	Синеморец
Секция SENECIO		
<i>S. vernalis</i> L.	Sver	София

	Sver1	Любимец
<i>S. viscosus</i> L.	Svis	Копривщица
<i>S. vulgaris</i> L.	Svul	София

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

2. Разработване на растителния материал

Растителният материал се разработва по начин, показан на Схема 1.

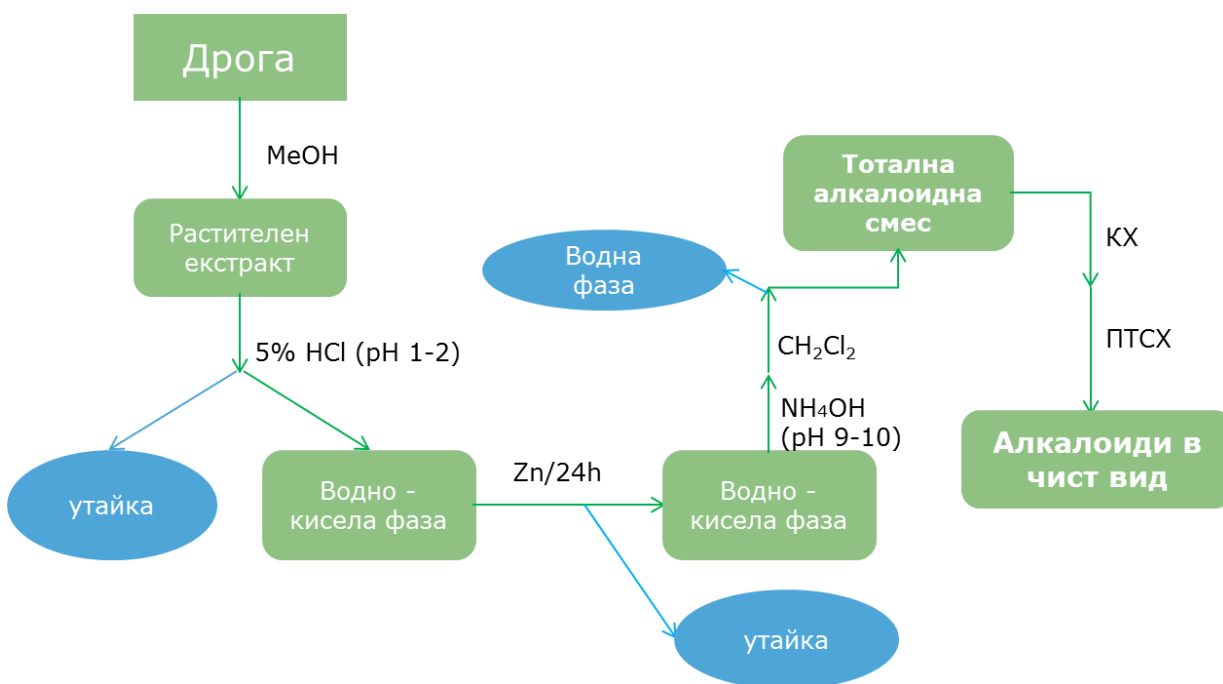


Схема 1. Разработване на растителния материал.

Въздушно сухият и смлян растителен материал (надземни части) от всички видове на род *Senecio* се екстрахира изчерпателно с CH_3OH (до отрицателна реакция на Драгендорф). Обединените метанолни екстракти, изпарени до сухо, се подкисляват с 5% HCl (pH 1-2) и се филтруват от отделените се като утайка неалкалоидни вещества. Водно - киселият разтвор се подлага на редукция с Zn на прах (24 h), след което се филтрува, алкализира с 25% NH_4OH (pH 9-10) и се екстрахира изчерпателно с CH_2Cl_2 в съотношение 1:1 (обем/обем). Получените обединени екстракти се сушат над безводен Na_2SO_4 , филтруват се и се изпаряват под

вакуум до сухо. По този начин се получават тотални алкалоидни смеси (ТАС-и), които служат като изходен материал за по-нататъшните изследвания.

Получените ТАС-и се анализират чрез ГХ/МС. По-нататък чрез колонна хроматография (КХ) на ТАС-и върху неутрален алуминиев оксид се постига разделяне на фракции, съдържащи по-малък брой алкалоиди. Накрая чрез ПТСХ на получените обогатени фракции се изолират чистите алкалоиди.

За структурно и стереохимично охарактеризиране на чистите алкалоиди, в зависимост от тяхното количество, са използвани следните физични и спектрални методи: ъгъл на специфично въртене, МС (ЕИ, ХИ), ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР, DEPT, HMQC, HMBC, NOE и NOESY.

3. Изследване алкалоидния състав на видове от род *Senecio*

3.1. Пиролизидинови алкалоиди, идентифицирани във видове на род *Senecio*

За анализ на алкалоидния състав, получените алкалоидни смеси (Схема 1) са подложени на ГХ/МС изследване. Идентифицирането на алкалоидите се извършва чрез сравняване на спектралните им данни: МС и RI с литературни данни и автентични проби, както и с помощта на компютърна библиотека (NIST 1998) (Таблица 3).

Идентифицирани са общо тридесет и пет пиролизидинови алкалоида. От тях алкалоидите 6 - ангелоилплатинецин (**59**), 7 - ангелоил - 9 - тиглоилплатинецин (**61**), който е частично структурно определен, и сенецивернин N-оксид (**64**) са новооткрити природни съединения. Алкалоидите триангуларин (**16**), сенецивернин (**23**), сенеционин (**24**), интегеримин (**25**), еруцифлорин (**26**), флорозенин (**44**), 9 - тиглоилплатинецин (**58**), 7,9 - диангелоилплатинецин (**60**), сенеционин 12-Ас (**62**) и сенецифилин 12-Ас Е (**63**) са нови за съответния вид. Десацетилдоронин (**41**) е изолиран и структурата му е определена за първи път чрез спектрални методи.

Таблица 3. Алкалоиди, идентифицирани във видове от род *Senecio*

Алкалоид	Изследвани видове																				
	RI (M ⁺)	Soth	Soth 1	Snem	Snem1	Snfu	Spal	Sdor	Spap	Spap1	Span	Sjac	Sjac1	Srup	Saca	Saqu	Sver	Sver1	Svis	Svul	
7-Ангелоилретронецин (8)	1829 (237)							+													
7-Ангелоилплатинецин (3)	1865 (239)					+		+*													
9-Ангелоилплатинецин (4)	1908 (239)					+*		+*													
7-Ангелоилхелиотридин (56)	1918 (237)								+*	+											
Процерин (1)	1948 (255)								+												
9-Ангелоилхастанецин (57)	(239)																				+*
9-Тиглоилплатинецин (58)	1961 (239)							+													
6-Ангелоилплатинецин (59)	2147 (255)							+*													
7,9-Диангелоилплатинецин (60)	2222 (321)							+													
7-Ангелоил-9-тиглоилплатинецин (61)	2228 (321)							+*													
Неморензин (49)	2312 (337)			+*	+*																
Сенецивернин (23)	2324 (335)							+							+			+	+	+	+*
Сенеционин (24)	2334 (335)							+				+	+	+*	+	+		+	+	+	+*
Ретроизозенин (50)	2336 (335)			+*	+*																
Сенецифилин (29)	2360 (333)							+*				+	+	+*	+	+*		+	+		+
Интегеримин (25)	2400 (335)							+				+	+		+	+		+	+	+	+
Булгарзенин (52)	2410 (337)			+*	+*																
Триангуларин (16)	2440 (335)								+												
Неоплатифилин (22)	2460 (337)																				+
Сарацин (12)	2495 (337)							+*		+*											
Якобин (37)	2496 (351)							+													
Сенеционин 12-Ас (62)	2501 (377)																				+
Неосарацин (13)	2502 (337)							+		+*											
Сенецифилин 12-Ас (30)	2513 (375)																				+
Риделин (32)	2529 (349)							+													
Сенецифилин 12-Ас Е (63)	2539 (375)																				+
Сенкиркин (46)	2540 (365)																				+
Ретрорзин (27)	2665 (351)																				+
Еруцифлорин (26)	2683 (351)							+													+*
Отозенин (43)	2687 (381)		+*	+*																	+
Флорозенин (44)	2750 (423)		+*	+*																	
Еруцифолин (33)	2701 (349)																				+*
Десацетилдоронин (41)	2768 (417)		+*																		+
Флориданин (40)	2848 (441)		+																		
Доронин (42)	2868 (459)		+*	+*																	
Сенецивернин N-оксид (64)	(351)																				+*

*изолирани алкалоиди

Senecio paludosus

От вида *Senecio paludosus* (Родопи) чрез ГХ/МС анализ са идентифицирани 7 пиролизидинови алкалоиди, 4 от които (**23**, **25**, **26** и **32**) са нови за вида (Таблица 3).

Сенецивернин (23). В МС на алкалоид **23** се наблюдава молекулен йон с m/z 335 и базов пик с m/z 120, което е указание за макроцикличен пиролизидинов алкалоид. Фрагментните йони с m/z 291, 248 и 220 са получени от последователното разпадане на киселинния остатък в молекулата. Йонният пик с m/z 291, който се образува след прегрупировка на McLafferty и последващото елиминиране на CO_2 , доказва вида на естерификацията при $\text{C}_9\text{-C}_{10}\text{-C}_{11}$. Тъй като в МС на съединението молекулният йон, както и всички фрагментни пикове са в съгласие с тези на сенеционин, но се различават по RI, то **23** е идентифициран като сенецивернин.

Интегеримин (25). В масспектъра на съединение **25** се наблюдава молекулен йон с m/z 335, както и пикове с m/z 136, 120, 119, 93, 94 и 80, характерни за 1,2 - ненаситени макроцикли от ретронецинов тип. Трябва да се отбележи, че спектърът на алкалоида е почти сходен с този на сенеционин, с изключение на това, че индекса на задържане на **25** е различен от този на сенеционин. И двата алкалоида имат еднакво молекулно тегло, но в спектъра на интегеримин пикът с m/z 136 е по-слабо интензивен. Съгласно литературните данни чрез ГХ/МС анализ лесно се идентифицират геометричните изомери: сенеционин m/z 335 (M^+), 136 (100) и интегеримин m/z 335 (M^+), 120 (100), и резултатите от МС и RI съответстват на тези данни. Алкалоид **25** е идентифициран като интегеримин.

Еруцифлорин (26). Алкалоид **26** има масспектър типичен за макронецини с ретронецинова база с интензивни йони с m/z 136, 93, и базов пик с m/z 120. Молекулният йон с m/z 351 е индикация за това, че съединението е сенеционин, сенецивернин или интегеримин, съдържащ допълнителен кислороден атом. Въз основа на данните, получени от ГХ/МС анализ и пълно съвпадение с литературните данни, алкалоидът е определен като еруцифлорин.

Риделин (32). В масспектъра на съединение **32** се наблюдава молекулен йон с m/z 349, заедно с два специфични йона с m/z 136 и m/z 120 (100) за ретронецинов тип пиролизидинов алкалоид. Тези характерни фрагментационни йони, както и останалите

масспектрални данни са в съгласие с предишно установените при идентифициране на алкалоида риделин (32).

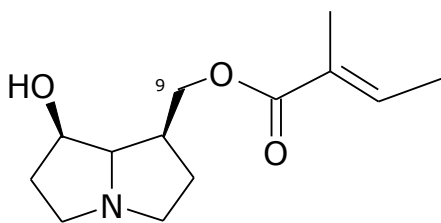
Senecio doronicum

ГХ/МС анализ на ТАС от *S. doronicum* показва наличие на девет съединения: 7-ангелоилплатинецин (3), 9-ангелоилплатинецин (4), 7-ангелоилретронецин (8), сарацин (12), неосарацин (13), триангуларин (16), 9-тиглоилплатинецин (58), 7,9-диангелоилплатинецин (60) и 7-ангелоил-9-тиглоилплатинецин (61). От тях алкалоиди 16, 58 и 60 са нови за вида *S. doronicum*.

Триангуларин (16). Масспектърът на 16 съдържа интензивни пикове на следните йони: m/z 335 (M^+), 237, 220, 120. Йонът с m/z 220 съответства на C_9 -O делене със загуба на сарациновата киселина и е показателен за наличието на ангелоилова група при C-7, а йон с m/z 120 се образува от последваща загуба на ангелоилова киселина (C_7 -O разцепване). Ниската интензивност на m/z 237 подкрепя местоположението на ангелоиловата група при C-7 вместо при C-9. Останалите йони в спектъра отговарят на диестерен алкалоид с 1,2-ненаситена пиролизидинова база. Следователно, може да се заключи, че алкалоидът е триангуларин (16).

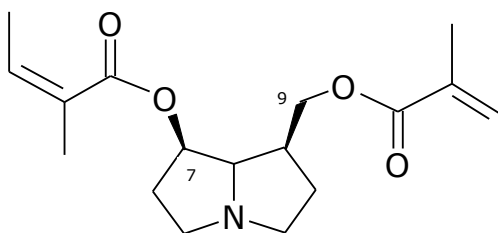
9-тиглоилплатинецин (58). Алкалоид 58 има молекулен йон с m/z 239, който е указание за моноестерен алкалоид, естерифициран с ангелоилова, тиглоилова или сенециоилова киселина. Базовият пик с m/z 82 е индикация за наситена нецинова база, а интензивният пик с m/z 95, получен след отделянето на киселинната част, определя мястото на естерната част при C-9.

Известно е, че тиглоиловите естери имат по-голямо време на задържане от ангелоиловите, както и O_9 -заместените моноестерни алкалоиди спрямо O_7 -заместените. Това се дължи на транс-конфигурацията на карбонилната и метилова групи при тиглоиловите естери в сравнение с цис-конфигурацията при ангелоиловите. Въз основа на този факт, както и на пълно съвпадение на МС и индекс на задържане (RI), алкалоидът е определен като 9-тиглоилплатинецин.



58

7, 9-диангелоилплатинецин (60). Молекулният йон с m/z 321, както и характерният фрагмент с m/z 221, получен след отделянето на ангелоилова, тиглоилова или сенециоилова киселина, определят алкалоида като дизаместен. Базовият пик с m/z 138 и йоните с m/z 122, 95 и 82 са диагностични за ациклични диестери с наситена нецинова база. Алкалоидът е определен като 7, 9-диангелоилплатинецин (**60**) въз основа на МС и RI сравнени с литературни данни.



60

Senecio papposus

Алкалоидният състав на ТАС-и на две проби (Витоша и Родопи) е анализиран чрез ГХ/МС анализ. Идентифицирани са пет пирилизидинови алкалоида (**1**, **22**, **43**, **46**, **56**), от които два са нови за вида.

Неоплатифилин (22). Алкалоид **22** има молекулен йон с m/z 337 и характерен фрагментационен модел на наситени естерни алкалоиди. Освен това присъствието на фрагменти в диапазоните m/z 95-97, 122-123 и базов пик с m/z 140 е показателно за макроциклични диестери, а пикът с m/z 82 е индикация за платинецинова база. В съответствие с тези данни, алкалоидът е определен като неоплатифилин.

Отозенин (43). Молекулният йон на съединение **43** е с m/z 381. Процесът на МС фрагментиране е характерен за отонечинов тип пирилизидинови алкалоиди, за което

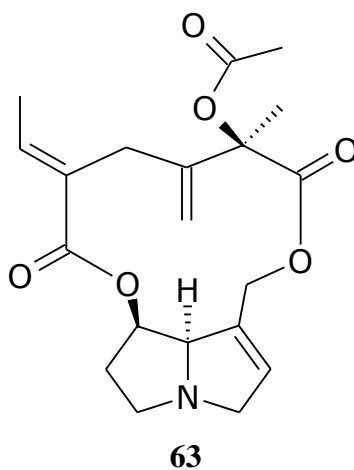
свидетелстват йоните с m/z 168, 151 (100), 150, 122 и 110. Алкалоидът е идентифициран като отозенин (**43**).

Senecio abrotanifolius ssp. carpathicus

В изследваната проба чрез ГХ/МС анализ са идентифицирани пет пиролизидинови алкалоида (**24**, **25**, **29**, **41**, **63**). Три от тях са открити за първи път във вида.

Интегеримин (25). В масспектъра на съединение **25** молекулният йон е с m/z 335. Също така йони на ненаситените пиролизидинови диестери от типа на ретронечина с m/z 136, 120 (100) и 93 присъстват в спектъра. МС фрагментация е подобна на тази на сенеционин (**24**), с изключение на това, че индексите на задържане на двата алкалоида са различни, както и базовият пик. Въз основа на тези данни и сравнение с литературни източници алкалоид **25** е определен като интегеримин.

Сенецифилин 12-Ас Е (63). Алкалоид **63** има молекулен йон с m/z 375 и характерна фрагментация на макроцикличен диестер с ненаситена пиролизидинова база, т.е. пикове с m/z 136, 120, и 93. МС на съединението е идентичен с този на сенецифилин 12Ас, но има различни характеристики на задържане. По литературни данни е известно, че Е - изомерите имат по-голямо време на задържане и въз основа на това алкалоидът е определен като сенецифилин 12-Ас Е (или спартиоидин 12-Ас).

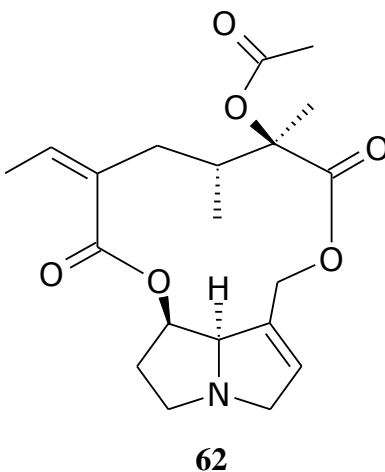


Десацетилдоронин (41). МС фрагментацията на алкалоид **41** е много подобна на тази на доронин (**42**), показваща характерните йони с m/z 168, 151 (100), 140, 123, 122 и 110 за отонецинов тип база. Ниско интензивният молекулен йон с m/z 417, както и йоните, получени от молекулната фрагментация с m/z 354, 340, 278, 254 и 238, са в съответствие с модела на фрагментиране на отонециновия макроцикличен алкалоид десацетилдоронин (**41**).

Senecio viscosus

ТАС на *S. viscosus* (Копривщица) е анализирана чрез ГХ/МС анализ и 4 пиролизидинови алкалоида са идентифицирани (Таблица 3) като алкалоид **62** е нов за вида.

Сенеционин 12-Ас (62). В МС на съединението се наблюдава молекулен йон с m/z 377. В допълнение, моделът на фрагментация показва, че **62** е също така 12 - членен макроцикличен пиролизидин алкалоид от ретронецинов тип. Главният фрагментен йон с m/z 290, образуван след загубата на карбоксилна и ацетилова групи, съответства на структурата на ацетилинтегеримин или на ацетилсенеционин. Структурата е потвърдена като сенеционин 12-Ас чрез сравняване на нейните МС и RI с автентична проба.



3.2. Пиролизидинови алкалоиди, изолирани и идентифицирани във видове на род *Senecio*

Изследвани са надземни части на видове от род *Senecio* с български произход. Растителният материал е разработен по стандартна схема за получаване на тотална алкалоидна смес. Изолирани са общо 21 пиролизидинови алкалоида (Таблица 3). От тях алкалоидите 6-ангелоилплатинецин (**59**), 7-ангелоил-9-тиглоилплатинецин (**61**) и сенцевернин N-оксид (**64**) са новооткрити природни съединения. Десацетилдоронин (**41**) е изолиран и структура му е определена за първи път чрез спектрални методи, а флорозенин (**44**) е изолиран и идентифициран за първи път във вид *S. othonnae*.

Senecio othonnae

Чрез комбинация от хроматографски техники (последователно използване на КХ върху неутрален Al_2O_3 и ПТСХ) от ТАС е изолиран за първи път алкалоида десацетилдоронин (**41**), както и три познати алкалоида (**42**, **43**, **44**), от които флорозенин (**44**) е нов за вида.

Десацетилдоронин (41). Масспектърът на **41** съдържа слабо интензивен молекулен йон с m/z 417 (0.8) и базов пик с m/z 151. Молекулната маса от 417 Da ($C_{19}H_{28}NO_7Cl$) и MS фрагментация са идентични за макроцикличен алкалоид от отонечинов тип. Отонечиновият тип бази показват пик $M^{+} -15$, дължащ се на загубата на метиловия остатък от N- CH_3 група и дават характеристични йони с m/z 94, 96, 110, 122-123 и 149-151.

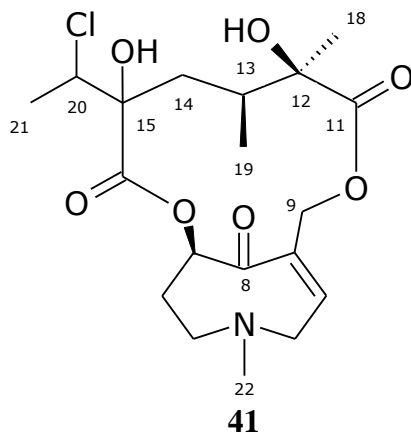
В 1H ЯМР спектър се наблюдава уширен синглет за винилен протон при δ 6.07, който определя нециновата база като ненаситена. Наличието на сигнали за нециновата база, синглет за три протона в по-слабо поле при δ 2.09 за N- CH_3 група, както и отсъствието на сигнал за H-8 са потвърждение за отонечинов тип алкалоид. Доказателство за това са и данните от ^{13}C ЯМР спектъра, който съдържа сигнал за четвъртичен въглероден атом при δ 209.1, отговарящ на типа база. В съгласие със структурата са и данните от 2D 1H - 1H COSY и HMQC експеримента (Таблица 4). Стереохимията при C-15 не е определена.

Таблица 4. ЯМР данни на десацетилдоронин (**41**) в CDCl₃, δ в ppm (J в Hz).

No	δ _H	δ _C	¹ H- ¹ H COSY
1		134.4 s	
2	6.07 bs	135.4 d	H-3 _u , H-3 _d
3 _u	3.34 dt (18.1, 2.2)	59.5 t	H-3 _d
3 _d	3.46 bd (18.1)		H-3 _u
5 _u	2.85 dd (13.2, 3.7)	54.0 t	H-5 _d , H-6 _u , H-6 _d
5 _d	2.96 dd (13.0, 7.3)		H-5 _u , H-6 _u , H-6 _d
6 _u	2.32 dt (14.0, 2.9)	36.4 t	H-6 _d , H-5 _u , H-5 _d , H-7
6 _d	2.64 m		H-6 _u , H-5 _u , H-5 _d , H-7
7	5.10 t (2.5)	79.1 d	H-6 _u , H-6 _d
8		209.1 s	
9 _u	4.36 d (11.0)	64.1 t	H-9 _d
9 _d	5.44 d (11.1)		H-9 _u
11		172.8 s	
12		77.0 s	
13	1.71* m	38.2 d	CH ₃ -19
14 _u	1.28*	37.5 t	
14 _d	1.64 m		
15		81.1 s	
16		177.6 s	
18-CH ₃	1.31 s	24.0 q	
19-CH ₃	1.19 d (6.3)	13.3 q	H-13
20	4.03 q (6.6)	63.1 d	CH ₃ -21
21-CH ₃	1.54 d (6.6)	18.3 q	H-20
22-CH ₃	2.09 s	40.3 q	

* припокриващи се сигнали

За първи път е изолиран десацетилдоронин (**41**) и неговата структура е доказана въз основа на данните от ЯМР (¹H и ¹³C ЯМР; ¹H - ¹H COSY; и HMQC) и МС (ХЙ). До момента алкалоид **41** е структурно охарактеризиран само по данни от ГХ/МС анализ.



Флорозенин (44). В мас спектъра (ЕЙ) на съединение **44** молекулният йон е с m/z 423, което е с 16 масови единици повече от този на доронин (**42**) и съответства на познатия алкалоид флорозенин. Молекулната маса е потвърдена и от йон $[M+1]^+$ с m/z 424 (100), получен от МС (ХЙ).

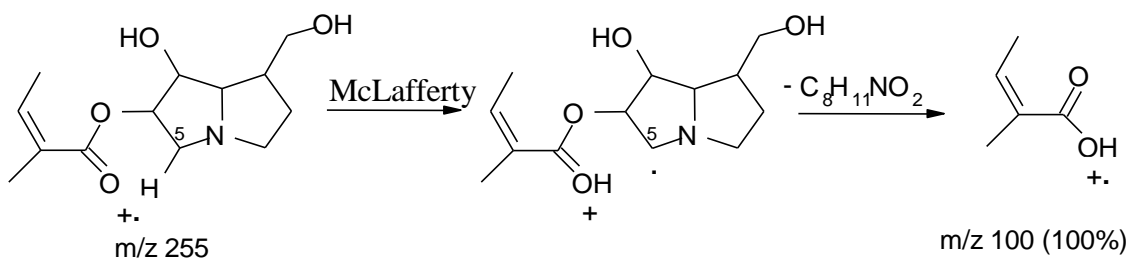
В ^1H ЯМР спектър на съединение **44** се наблюдават сигнали при δ 6.17 t ($J=2.4$ Hz, H-2), δ 5.02 m (H-7), δ 5.31 d ($J=11.3$ Hz, H-9d), δ 4.39 d ($J=11.3$ Hz, H-9u) подобни на тези на **42**. Липсата на сигнал, съответстващ на H-8 и наличието на синглет при δ 2.06 за N-CH₃ група, предполагат присъствие на отонецинова база. В спектъра се наблюдават и сигнали, които са характерни за епоксидния пръстен (при C-15, C-20): кватер при δ 3.02 ($J=5.4$) за H-20 и дублет при δ 1.24 ($J=5.4$) за три протона, отговарящ на CH₃-21 ($J = 5.4$ Hz). При δ 2.07 се наблюдава и синглет за три протона за присъствие на COCH₃ група.

Въз основа на пълното съвпадение на данните от МС, ^1H ЯМР и ^{13}C ЯМР с тези, публикувани в литературата, **44** е идентифициран като флорозенин, изолиран за първи път от вид *S. othonnae*.

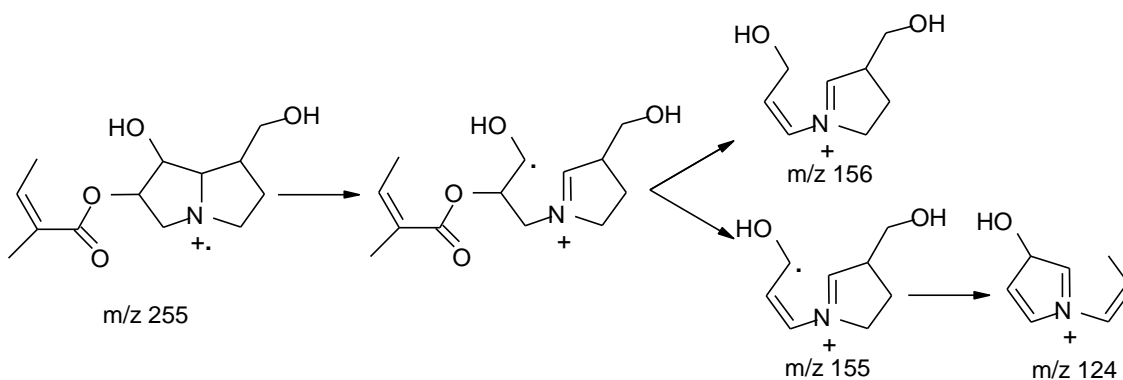
Senecio nemorensis ssp. *fuchsii*

От ТАС чрез последователно използване на КХ и ПТСХ върху силикагел са изолирани три моно- и диестерни алкалоида (**4**, **12** и **59**), чиято структура е определена чрез спектрални данни.

6 α -Ангелоилплатинецин (59). Масспектърът (ЕЙ) на **59** съдържа слабо интензивен молекулен йон с m/z 255. Базовият пик с m/z 100 е резултат от регрупировка на McLafferty.



В резултат от загубата на естерната част - ангелоил, тиглоил или сенециоил са фрагментите с m/z 156 и 155. Фрагментът с m/z 124 се формира след отделяне на хидроксиметиленовата група от йона с m/z 155.

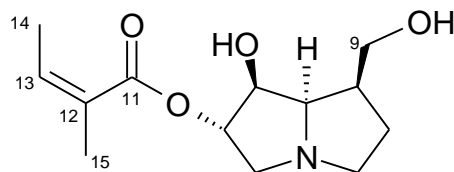


Други характерни пикове са с m/z 113 и 82, които съответстват на наситен ПА с хидроксилни групи в нециновата част при C-7 и C-9.

В ^1H ЯМР спектър на **59** се наблюдава сигнал за олефинов протон при δ 6.15 qq ($J=7.27, 1.5$ Hz), свързан с две метилови групи при δ 2.00 и 1.90, което определя съединението като естер на ангелоилова киселина. Съгласно предишни изследвания Н-3_u и Н-5_u са в β -положение, докато Н-3_d и Н-5_d са в α -положение или *cis* спрямо равнината на пръстена. Отместването на сигнала за Н-6 към по-слабо поле при δ 5.30 определя разположението на естерната част при C-6. При облъчване на сигнала за Н-6, този за Н-5_u при δ 3.37 dd се променя в дублет, докато Н-5_d при δ 3.60 остава непроменен дублет. Изчислените $J_{5u, 6} = 4.45$ Hz и $J_{5d, 6} = 0$ Hz съответстват на *cis* разположение между Н-6 и Н-5_u и потвърждават относителната стереохимия на Н-6 като Н-6 β (Таблица 5). Този извод се подкрепя и от наблюдаваните ъгли между Н-5_u и Н-6 $\approx 0^\circ$ и между Н-5_d и Н-6 $\approx 90^\circ$ при построяване на Драйдинг-модели.

^{13}C ЯМР спектър съдържа сигнали за ангелоиловата част: карбонилна група при δ 166.2 и две CH_3 -групи при δ 20.5 и δ 16.0. Сигналите при δ 74.8 и δ 59.7 съответстват на C-атоми, свързани с хидроксилни групи, съответно първична при C-9 и вторична при C-7. Наблюдава се и сигнал при δ 79.4 за въглеродния атом C-6, носещ естерната част.

Проведените NOE експерименти, както и данните от НМВС спектъра са в подкрепа на предложената структура. Наблюдаваното NOE взаимодействие между Н-6 (δ 5.30) и Н-5_u (δ 3.37), както и константите на куплиране $J_{5u, 6} = 4.45$ Hz и $J_{5d, 6} = 0$ Hz съответстват на *cis* разположение между Н-6 и Н-5_u. Мястото на естерната част се доказва окончателно чрез НМВС. Въз основа на данните от НМҚС и НМВС експерименти са определени и местата на всички атоми и групи в молекулата на **59**.



59

Комбинацията от всички спектрални данни доказват структурата и стереохимията на новооткритото природно съединение 6 α -ангелоилплатинецин (**59**).

Таблица 5. ЯМР данни на съединение **59** в CDCl₃, δ в ppm (J в Hz).

No	δ_H	δ_C	HMBC	¹ H- ¹ H COSY
1 α	2.74 m	41.6 d		2H-9
2 _u	1.94 m*	27.2 t		H-2 _d , H-3 _u , H-3 _d
2 _d	2.32 ddd (21.3, 11.9, 9.4)			H-2 _u , H-3 _u , H-3 _d
3 _u	3.01 ddd (11.4, 11.3, 2.5)	55.7 t		H-2 _u , H-2 _d , H-3 _d
3 _d	3.58*			H-2 _u , H-2 _d , H-3 _u
5 _u	3.37 dd (12.6, 4.5)	58.9 t	C-3	H-5 _d
5 _d	3.60* d (12.6)		C-6, C-8	H-5 _u
6 β	5.30 d (4.3)	79.4 d	C-5, C-7, C-8, C-11	H-5 _u , H-5 _d , H-7
7 α	4.34 dd (3.1, 1)	74.8 d	C-5, C-8	H-8
8 α	3.94 dd (7.8, 3.1)	71.2 d		H-7
9-CH ₂	4.00 d (3.0)	59.7 t	C-1, C-2, C-8	H-1
11		166.6 s		
12		126.9 s		
13	6.15 qq (7.3, 1.5)	140.5 d	C-15	3H-14, 3H-15
14	2.00 dd (7.3, 1.5)	16.0 q		H-13
15	1.90* t (1.5)	20.5 q		H-13

* припокриващи се сигнали

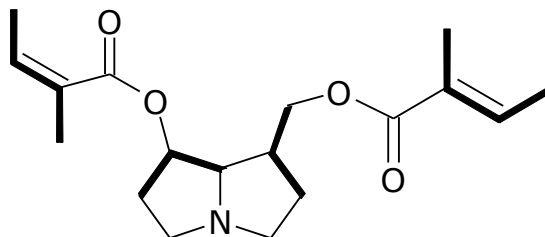
Senecio doricum

Чрез комбинация от хроматографски техники (последователно използване на КХ, както и ПТСХ) от ТАС са изолирани новият пиролизидинов алкалоид 7-ангелоил-9-тиглоилплатинецин (**61**) и четири познати алкалоида: 7-ангелоилплатинецин (**3**), 9-ангелоилплатинецин (**4**), сарацин (**12**) и неосарацин (**13**).

7-ангелоил-9-тиглоилплатинецин (61). В МС (ЕИ) спектъра на алкалоид **61** се наблюдава молекулен йон с m/z 321, базов пик с m/z 138, характерен за пиролизидиновите диестери, както и йони с m/z 95 и 82 за наситена нецинова база. Йонът с m/z 221 е получен в резултат от елиминиране на естерния заместител и

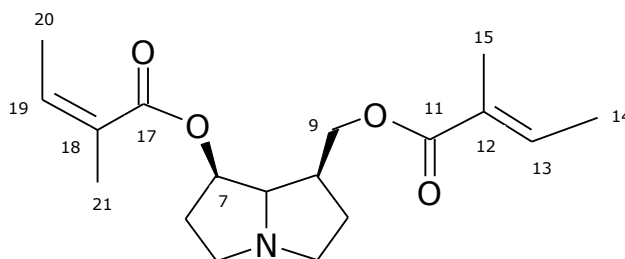
определя киселинния остатък като 2-метил-2-бутенова киселина (ангелоилова, тиглоилова) или сенециоилова киселина.

^1H ЯМР спектър на **61** съдържа сигнали за два винилни протона при δ 6.96 q ($J=7.3$ Hz) и δ 6.19 qd ($J=7.3, 1.4$ Hz), както и сигнали за четири метилови групи при δ 1.90s, 1.92*, 1.92* и 2.02 dd. Тези данни са указание, че естерните части са ангелоил и тиглоил. Уширеният синглет при δ 5.52 със сумарна $J_{\text{H}1/2} = 8.9$ Hz за H-7 и сигналите за H-9_u при δ 4.21 dd ($J=11.0, 8.2$ Hz) и H-9_d при δ 4.39 dd ($J=11.0, 7.2$ Hz) съответстват на 7,9 диестерен ПА с платинецинов тип база. В резултат от анализа на COSY спектъра са установени следните последователности.



^1H - ^1H COSY корелации

Местата на естерните части - ангелоил и тиглоил при C-7 или C-9 не са определени точно, поради малкото количество веществото. Въз основа на МС фрагментация и ^1H ЯМР алкалоидът е частично определен като 7-ангелоил-9-тиглоилплатинецин-новоописано природно съединение.



7-ангелоил-9-тиглоилплатинецин (**61**)

Таблица 6. ЯМР данни на съединение **61** в CDCl₃, δ в ppm (J в Hz).

No	δ _H
1	2.75-2.90 m*
2 _u	1.80-1.90 m*
2 _d	2.00-2.22 m*
3 _u	3.41 d (12.9)
3 _d	3.51 d (12.9)
5 _u	3.20 m
5 _d	3.85 m
6 _u	2.06-2.22 m*
6 _d	2.75-2.90 m*
7	5.52 bs
8	4.15 m
9 _u	4.21dd (11.0, 8.2)
9 _d	4.39 dd (11.0, 7.2)
13	6.96 q (7.3)
14-CH ₃	1.92*
15-CH ₃	1.90 s*
19	6.19 qd (7.3, 1.4)
20-CH ₃	2.02 dd (7.3, 1.4)
21-CH ₃	1.92*

* припокриващи се сигнали

Senecio vernalis

Шест познати алкалоида са идентифицирани чрез техните специфични МС данни и RI - сенецивернин (**23**), сенеционин (**24**), интегеримин (**25**), ретрорзин (**27**), сенецифилин (**29**) и сенкиркин (**46**) в растителния вид. Сенецивернин N-оксид (**64**) е изолиран и идентифициран с помощта на спектрални методи. В неговия МС (ХЙ) се наблюдава пик [M+1]⁺ с m/z 352, който отговаря на молекулното тегло 351 Da (C₁₈H₂₅NO₆) на сенецивернин N-оксид. Подтвърждение на това е и слабо интензивният молекулен йон с m/z 351 в МС (ЕЙ). Базовият пик с m/z 120, както и МС фрагментация са характерни за мароцикличните ПАи с ненаситена нецинова база.

В ¹H ЯМР спектър на **64** се наблюдава уширен синглет при δ 6.26 за един протон, който е доказателство за ненаситена нециновата база. В резултат от деекраниращия ефект на кислородния атом при N-4, сигналите за нециновата база са изместени в по-слабо поле при δ 5.00 m (H-8), 4.70 d (H-3_d), 4.55 d (H-3_u), 3.98 m (H-5_d), и 3.61 m (H-5_u) в сравнение със сенецивернин (**23**). Сигналите за два геминални олефинови протона при δ_{H-21d} 5.97 s и δ_{H-21u} 5.35s, както и тези при δ 1.34 s, 1.09 d и

0.86 d за три CH₃-групи при C-18, C-19 и C-20, съответстват на сенцеверинова естерна част. Поради припокриване на сигналите за H-7 и H-9_d в ¹H ЯМР спектър, типът на нециновата база - ретронецин или хелиотридин е определен чрез редукция с Zn/HCl на N-оксид за 24 h. Идентифицирането на базата е осъществено чрез сравняване на полученият ¹H ЯМР спектър на редуцирания N-оксид (**64**) с този на сенцевернин (**23**), и базата е определена като ретронецинов тип.

В потвърждение на структурата на алкалоид **64** са и данните от ¹³C ЯМР спектъра.

Анализът на всички спектрални данни ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР, DEPT, както и 2D ¹H-¹H COSY и HMQC експеримента, доказват структурата на новия алкалоид (Таблица 7).

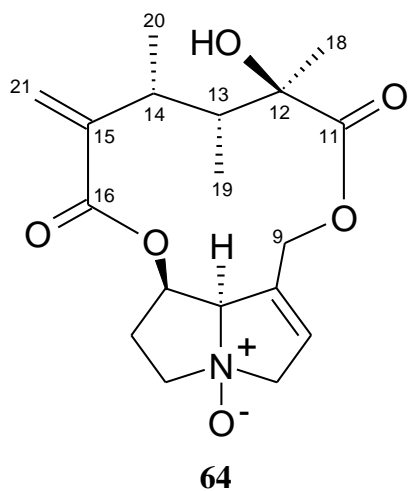


Таблица 7. ЯМР данни на сенецивернин N-оксид (**64**) в CD₃OD, δ в ppm (J в Hz).

No	δ_H	¹ H- ¹ H COSY	δ_C
1			129.0 s
2	6.26 bs	H-3 _d	130.7 d
3 _u	4.55 d (17.1)	H-3 _d	78.3 t
3 _d	4.70 d (17.1)	H-2, H-3 _u	
5 _u	3.61 m	H-5 _d , H-6 _d	68.9 t
5 _d	3.98 m	H-5 _u , H-6 _d	
6 _u	2.41 m	H-6 _d	32.7 t
6 _d	2.94 m	H-5 _u , H-5 _d , H-6 _u	
7	5.51*	H-8	73.7 d
8	5.00 m	H-7	96.3 d
9 _u	4.22 d (12.1)	H-9 _d	60.3 t
9 _d	5.52* d (12.1)	H-9 _u	
11			178.1 s
12			77.8 s
13	1.67 m	CH ₃ -19	40.8 d
14	2.51 m	CH ₃ -20	35.8 d
15			145.9 s
16			167.8 s
18-CH ₃	1.34 s		25.1 q
19-CH ₃	0.86 d (7.1)	H-13	5.7 q
20-CH ₃	1.09 d (7.1)	H-14	12.2 q
21 _u	5.35 s		123.2 t
21 _d	5.97 s		

*припокриващи се сигнали

Съществуването на N-оксид на сенецивернин в пробата от *S. vernalis* е индикация за това, че процесът на редукция (Zn/HCl) не е протекъл напълно, или че **64** е много стабилен.

4. Количествено определяне на сенецифин

През 1989 г. Световната здравна организация (WHO) публикува Ръководство за здравето и безопасността на хората, заради наличието на токсични ПАи в различни продукти (WHO-IPCS 1989). Някои страни, като Австрия, Белгия, Германия, Холандия и Англия, са въвели цялостни насоки или разпоредби, за да ограничат количеството на дневния прием или да ограничат продажбата на фармацевтични/билкови продукти, съдържащи ПАи, така че да регулират експозицията на ПАи и да намалят вредното им въздействие върху човешкото здраве. Въпреки това, наскоро беше установено, че билкови лекарствени продукти, билкови чайове и хранителни добавките от растения, които не биосинтезират пиролизидинови алкалоиди, също могат да съдържат различни количества от тях. За това тези регламенти са подходящи само за отделни продукти, съдържащи ПАи, но не могат да се считат за общо правило, прилагано универсално за всички продукти, съдържащи ПАи. Макар да се правят различни оценки на риска за замърсяването на храните и фуражите с пиролизидинови алкалоиди, досега не е установена регулация на хранителните продукти. За това е важно да се създаде скринингов метод за количествено определяне на токсични ПАи в билките и свързаните с тях продукти.

ТСХ в комбинация с денситометрия може да се използва за количествен анализ на изследваните съединения като бърз, сигурен и лесен метод за определянето им в разнообразни проби.

Количественият анализ на сенецифин в проба от *Senecio rupestris* е описан като пример за определяне съдържанието на токсичните 1,2-ненаситени пиролизидинови алкалоиди. Подготовката на пробата се основава на описаните процедури за получаване на тотална алкалоидна смес. Методът на екстракция е селективен за този тип алкалоиди. При денситометрично изследване надеждни резултатите могат да бъдат постигнати само при добре определени зони на хроматографско разделяне. Подвижната фаза ацетон:25% амоняк в съотношение 2:0.1 (обем/обем) осигурява оптимално разделяне на алкалоиди в избраната проба. Основният алкалоид в получената ТАС е сенецифин. Калибрационната крива за количествено определяне на сенецифин чрез ТСХ - денситометрия е линейна в

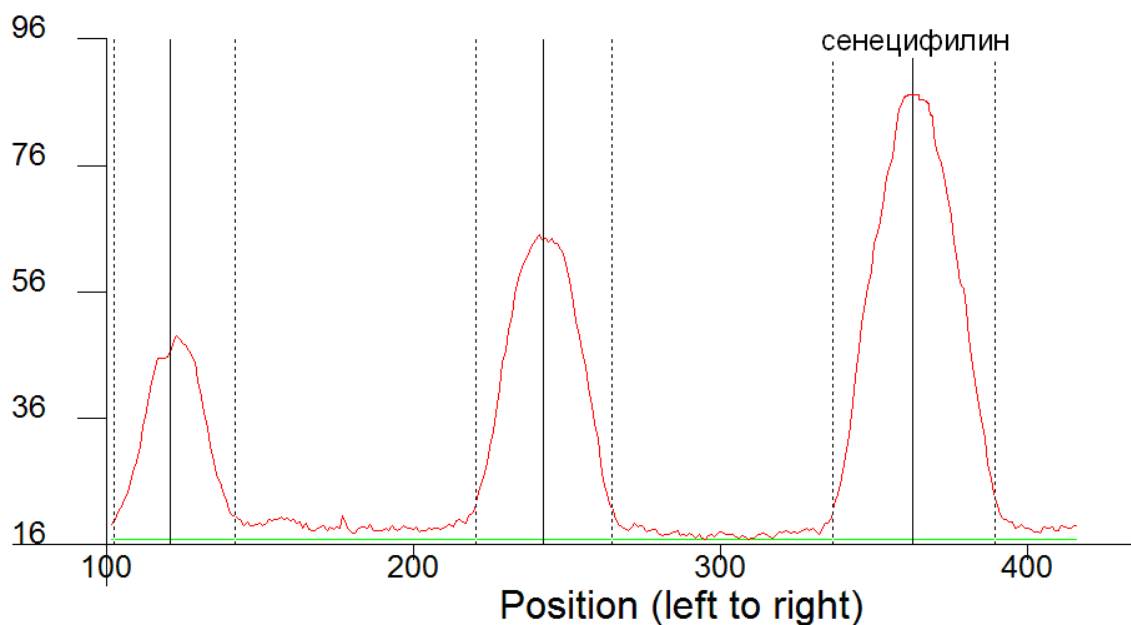
диапазон 10 - 80 µg/петно с коефициент на корелация от 0,999 (съответната линейна регресия е $y = 77.751 x - 9.025$). Границите на откриване са 1 µg/петно за алкалоидите. Точността на метода е 98%.

Съдържанието на главния алкалоид в растителния материал е измерено чрез ТСХ - денситометрия при трикратно повторение (I, II и III) и получените резултати са представени в Таблица 8.

Таблица 8. Количествено съдържание на сенецифин в *Senecio rupestris*

Проба (<i>Senecio rupestris</i>)	Съдържание в ТАС (%)	Съдържание в растителен материал (g)	Съдържание в растителен материал (%)
<i>S. rupestris</i> I	48.5885	0.7045	0.1067
<i>S. rupestris</i> II	49.0822	0.7117	0.1078
<i>S. rupestris</i> III	48.9036	0.7091	0.1074
Сс ± Со*	48.858±10.2499	0.7084±0.0036	0.1073±0.0005

* Средна стойност ± стандартно отклонение



Фигура 9. ТСХ денситограма на тотална алкалоидна смес на *Senecio rupestris*

Според нашите резултати използването на ТСХ - денситометрията е достатъчно надежден и прецизен метод за рутинен количествен анализ на токсичните 1,2-ненаситени пирилизидинови алкалоиди. Методът позволява анализ на много проби в кратък период от време, поради което дава полезна информация за количествен контрол на различни проби, съдържащи този структурен тип алкалоиди.

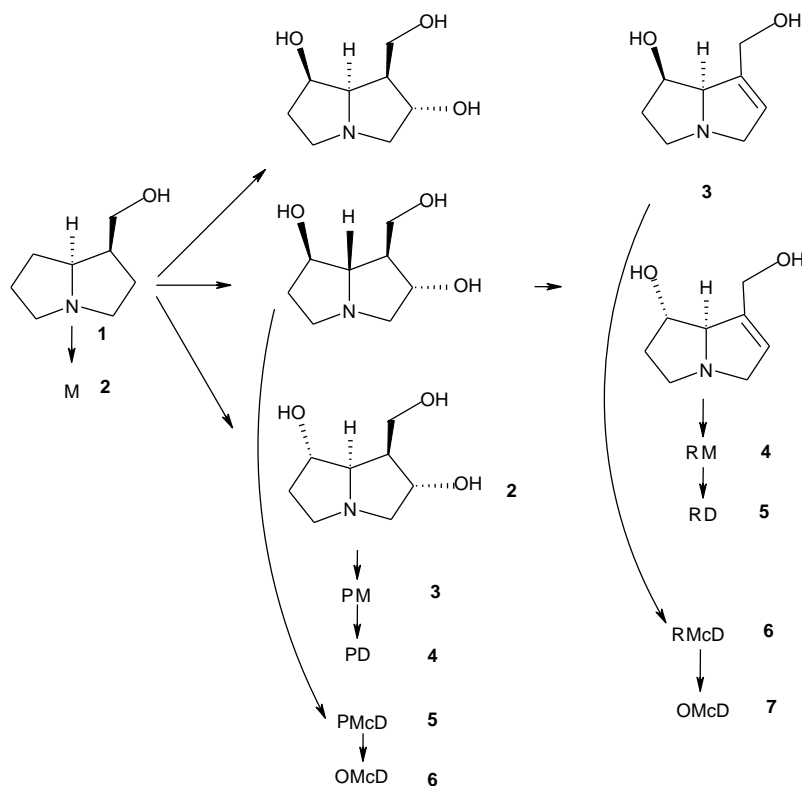
5. ЕВОЛЮЦИЯ

Резултатите от изследванията на алкалоидния състав на видовете от род *Senecio*, разпространени в България, позволи да бъдат намерени връзки и зависимости в разпределението им по секции според “Флора на Европа”, както и да се наблюдават някои еволюционни тенденции в развитието им. За обективно оценяване на еволюцията са въведени показателите: еволюционен фактор – E и степен на окисление на алкалоидите във видовете – Ols. Еволюционният фактор – E е функция от биосинтетичния коефициент – B и броят на алкалоидите – N.

$$E = \frac{\sum B}{N};$$

$\sum B$ – сума от B коефициентите
N – брой на алкалоидите в изследвания вид

Биосинтетичният коефициент се свързва с биосинтезата на ПАи и отчита етапите при формирането на различните типове (Фигура 10).



Фигура 10. Биосинтез и биосинтетичен коефициент на различните типове ПАи

М - моноестери; РМ - платинецинов тип моноестери; РD - платинецинов тип диестери; РMcD - платинецинов тип макроциклични диестери; OMcD - отонецинов тип макроциклични диестери; RM - ретронецинов тип моноестери; RD - ретронецинов тип диестери; RMcD - ретронецинов тип макроциклични диестери; OMcD - отонецинов тип макроциклични диестери.

Другият показател Ols за всеки конкретен вид се определя като средна стойност от степента на окисление на алкалоидите във вида - O_{la} по вече възприета в органичната химия схема. Факторът O_{la} се изчислява от сумата на връзките в идентифицирания алкалоид като за всяка С-С връзка в молекулата стойността е 0, за С-Н връзката е -1, и за С-Х (хетероатом) е +1 (Таблица 9).

Таблица 9. Изчислени стойности на В, O_{la}, E и Ols според алкалоидния състав на видовете.

<i>Секция</i>	Тип	В	O _{la}	E	Ols
Вид Алкалоиди					
1	2	3	4	5	6
<i>Секция DORIA</i>					
<i>S. othonnae</i> Bieb.				7	-0.49
Доронин	OC-12	7	-0.47		
Отозенин	OC-12	7	-0.52		
Флориданин	OC-12	7	-0.47		
Флорозенин	OC-12	7	-0.47		
Десацетилдоронин	OC-12	7	-0.52		
<i>S. nemorensis</i> ssp. <i>nemorensis</i> L.				5.3	-0.73
Ретроизозенин	RC-13	6	-0.66		
Неморензин	PC-13	5	-0.77		
Дороненин	RC-13	6	-0.66		
Булгарзенин	PC-13	5	-0.77		
Платифилин	PC-12	5	-0.77		
Неоплатифилин	PC-12	5	-0.77		
<i>S. nemorensis</i> ssp. <i>fuchsii</i> C.C.(Gmelin) Celak				3.4	-0.83
6-ангелоилплатинецин	PM	3	-0.76		
7-ангелоилплатинецин	PM	3	-0.92		
9-ангелоилплатинецин	PM	3	-0.92		
Сарацин	PD	4	-0.77		
Неосарацин	PD	4	-0.77		

Секция CROCISERIS					
<i>S. paludosus</i> L.				6	-0.58
Сенецивернин	RC-12	6	-0.66		
Сенеционин	RC-12	6	-0.66		
Сенецифилин	RC-12	6	-0.55		
Интегеримин	RC-12	6	-0.66		
Риделин	RC-12	6	-0.44		
Якобин	RC-12	6	-0.55		
Еруцифлорин	RC-12	6	-0.55		
<i>S. macedonicus</i> Griseb.				3.7	-0.82
7-ангелоилплатинецин	PM	3	-0.92		
9-ангелоилплатинецин	PM	3	-0.92		
7-ангелоилретронецин	RM	4	-0.76		
9-ангелоилретронецин	RM	4	-0.76		
Сарацин	PD	4	-0.77		
Неосарацин	PD	4	-0.77		
7,9-диангелоилплатинецин	PD	4	-0.88		
<i>S. doronicum</i> (L.) L.				3.8	-0.82
7-ангелоилплатинецин	PM	3	-0.92		
9-ангелоилплатинецин	PM	3	-0.92		
7-ангелоилретронецин	RM	4	-0.76		
9-ангелоилретронецин	RM	4	-0.76		
9-тиглоилплатинецин	PM	3	-0.92		
7,9-диангелоилплатинецин	PD	4	-0.88		
7-ангелоил-9-тиглоилплатинецин	PD	4	-0.88		
Сарацин	PD	4	-0.77		
Триангуларин	RD	5	-0.66		
Неосарацин	PD	4	-0.77		
Секция TEPHROSERIS					
<i>S. rapposus</i> (Reichennb.) Less.				5.5	-0.68
Процерин	M	3	-0.76		
7-ангелоилхелиотридин	HM	4	-0.76		
Неоплатифилин	PC-12	5	-0.77		
Отозенин	OC-12	7	-0.52		
Сенкиркин	OC-12	7	-0.63		
Неосенкиркин	OC-12	7	-0.63		
Секция JACOBAEA					
<i>S. subalpinus</i> Koch.				6	-0.63
Сенецивернин	RC-12	6	-0.66		
Сенеционин	RC-12	6	-0.66		
Сенецифилин	RC-12	6	-0.55		
Интегеримин	RC-12	6	-0.66		
Неоплатифилин	PC-12	6	-0.77		
Сенецифилин 12-Ас	RC-12	6	-0.50		

<i>S. panicii</i> Degen.				6	-0.57
Сенеционин	RC-12	6	-0.66		
Сенецифин	RC-12	6	-0.55		
Интегеримин	RC-12	6	-0.66		
Сенецифин 12-Ас	RC-12	6	-0.50		
Спартиоидин 12-Ас	RC-12	6	-0.50		
<i>S. jacobaea</i> L.				6	-0.61
Сенецивернин	RC-12	6	-0.66		
Сенеционин	RC-12	6	-0.66		
Сенецифин	RC-12	6	-0.55		
Интегеримин	RC-12	6	-0.66		
Сенеционин 12-Ас	RC-12	6	-0.60		
Еруцифлорин	RC-12	6	-0.55		
<i>S. aquaticus</i> Hill				5.6	-0.59
9-ангелоилхастанецин	HaM	3	-0.92		
Еруцифолин	RC-12	6	-0.44		
Сенеционин	RC-12	6	-0.66		
Сенецифин	RC-12	6	-0.55		
Спартиоидин	RC-12	6	-0.55		
Якобин	RC-12	6	-0.55		
Якозин	RC-12	6	-0.44		
<i>S. erucifolius</i> L.				6.2	-0.6
Сенеционин	RC-12	6	-0.66		
Сенецифин	RC-12	6	-0.55		
Интегеримин	RC-12	6	-0.66		
Ретрорзин	RC-12	6	-0.55		
Еруцифлорин	RC-12	6	-0.55		
Сенкиркин	OC-12	7	-0.63		
<i>S. rupestris</i> Waldst & Kit				6	-0.62
Сенецивернин	RC-12	6	-0.66		
Сенеционин	RC-12	6	-0.66		
Сенецифин	RC-12	6	-0.55		
Интегеримин	RC-12	6	-0.66		
Еруцифлорин	RC-12	6	-0.55		
<i>S. abrotanifolius</i> ssp. <i>carpathicus</i> (Herbich) Nyman				6.2	-0.58
Сенеционин	RC-12	6	-0.66		
Сенецифин	RC-12	6	-0.55		
Интегеримин	RC-12	6	-0.66		
Спартиоидин 12-Ас	RC-12	6	-0.50		
Десацетилдоронин	OC-12	7	-0.52		
Секция <i>SENECIO</i>					
<i>S. vernalis</i> Waldst&Kit				6	-0.64
Сенецивернин	RC-12	6	-0.66		
Сенеционин	RC-12	6	-0.66		

Сенецифиллин	RC-12	6	-0.55		
Интегеримин	RC-12	6	-0.66		
Ретрорзин	RC-12	6	-0.55		
Неоплатифиллин	PC-12	6	-0.77		
Сенкиркин	OC-12	7	-0.63		
<i>S. sylvaticus</i> L.				4	-0.78
7- ангелоилретронецин	RM	4	-0.76		
7- ангелоилплатинецин	PM	3	-0.92		
9- ангелоилплатинецин	PM	3	-0.92		
Триангуларин	RD	5	-0.66		
Неотриангуларин	RD	5	-0.66		
Сарацин	PD	4	-0.77		
Неосарацин	PD	4	-0.77		
<i>S. viscosus</i> L.				6	-0.61
Сенецивернин	RC-12	6	-0.66		
Сенеционин	RC-12	6	-0.66		
Сенецифиллин	RC-12	6	-0.55		
Интегеримин	RC-12	6	-0.66		
Ретрорзин	RC-12	6	-0.55		
Сенеционин 12-Ас	RC-12	6	-0.60		
<i>S. vulgaris</i>				6	-0.62
Сенецивернин	RC-12	6	-0.66		
Сенеционин	RC-12	6	-0.66		
Сенецифиллин	RC-12	6	-0.55		
Интегеримин	RC-12	6	-0.66		
Ретрорзин	RC-12	6	-0.55		

Така стана възможно разпределение на видовете по двата показателя (Е и Ols) и сравнението им с това по “Флора на Европа” (Таблица 10).

Таблица 10. Разпределение на видовете според “Флора на Европа” и по алкалоиден състав чрез Е и Ols

Според “Флора на Европа”	Разпределение според Е	Разпределение според Ols
<i>Секция DORIA</i>		
<i>S. nemorensis</i> ssp. <i>fuchsii</i> (C.C. Gmelin) Celak	<i>S. nemorensis</i> ssp. <i>fuchsii</i> 3.40	<i>S. nemorensis</i> ssp. <i>fuchsii</i> -0.83
<i>S. nemorensis</i> L.	<i>S. macedonicus</i> 3.71	<i>S. macedonicus</i> -0.82
<i>S. othonnae</i> Vieb.	<i>S. doronicum</i> 3.80	<i>S. doronicum</i> -0.82
<i>Секция CROCISERIS</i>		
<i>S. paludosus</i> L.	<i>S. sylvaticus</i> 4.00	<i>S. sylvaticus</i> -0.78
<i>S. macedonicus</i> Griseb.	<i>S. nemorensis</i> 5.33	<i>S. nemorensis</i> -0.73
<i>S. doronicum</i> (L.) L.	<i>S. papposus</i> 5.50	<i>S. papposus</i> -0.68
<i>Секция TEPHROSERIS</i>		
<i>S. papposus</i> (Reichenb.) Less.	<i>S. aquaticus</i> 5.60	<i>S. vernalis</i> -0.64
<i>Секция JACOBAEA</i>		
<i>S. subalpinus</i> Koch	<i>S. subalpinus</i> 6	<i>S. subalpinus</i> -0.63
<i>S. rupestris</i> Waldst&Kit	<i>S. rupestris</i> 6	<i>S. rupestris</i> -0.62
<i>S. aquaticus</i> Hill.	<i>S. vulgaris</i> 6	<i>S. vulgaris</i> -0.62
<i>S. jacobaea</i> L.	<i>S. jacobaea</i> 6	<i>S. jacobaea</i> -0.61
<i>S. erucifolius</i> L.	<i>S. viscosus</i> 6	<i>S. viscosus</i> -0.61
<i>S. pancicii</i> Degen.	<i>S. pancicii</i> 6	<i>S. erucifolius</i> -0.60
<i>S. abrotanifolius</i> L. ssp. <i>carpathicus</i> (Herbich) Nyman	<i>S. paludosus</i> 6	<i>S. aquaticus</i> -0.59
<i>Секция SENECIO</i>		
<i>S. vernalis</i> L.	<i>S. vernalis</i> 6.1	<i>S. paludosus</i> -0.58
<i>S. sylvaticus</i> L.	<i>S. abrotanifolius carpathicus</i> 6.2	<i>S. abrotanifolius carpathicus</i> -0.58
<i>S. viscosus</i> L.	<i>S. erucifolius</i> 6.2	<i>S. pancicii</i> -0.57
<i>S. vulgaris</i> L.		
	<i>S. othonnae</i> 7	<i>S. othonnae</i> -0.49

Според това подреждане видовете от секциите DORIA и CROCISERIS се характеризират с твърде различен алкалоиден състав, докато видовете от секции JACOBAEA и SENECIO, с малки изключения, се характеризират с постоянен, по отношение на типа алкалоиди, състав. Добре са очертани три основни групи, а именно тази на видовете, съдържащи моно- и диестерни пиролизидинови алкалоиди от платинецинов и ретронечинов тип със стойности на Е от 3.40 до 4 и Ols от - 0.83 до - 0.78, групата на 12-членните макроциклични пиролизидинови алкалоиди от

ретронецинов тип със стойности на E=6 и Ols от - 0.63 до - 0.59 и *S. othonnae* като самостоятелна група, съдържаща отонечинов тип ПАи със стойности 7 респ. - 0.49. Видовете между основните групи правят връзки с последните и най - често съдържат няколко типа ПАи.

Разпределението на видовете според показателите еволюционен фактор – E и степен на окисление – Ols (Таблица 10) съответства на етапите от тяхната еволюция. Видовете с по-малки стойности на тези показатели са в по-ранен етап на своята еволюция от тези с по високи стойности и заемат горната част в Таблица 10. Според това подреждане *S. nemorensis* ssp. *fucshii* е в най-ранен етап от своята еволюция и съдържа само отворено верижни моно- и диестерни ПАи. От друга страна в *S. othonnae* са идентифицирани само алкалоиди от отонечинов тип, последен етап от биосинтеза на този клас природни съединения, има най-високи стойности на двата показателя, завършва подреждането (Таблица 10) и съответно се намира в крайна фаза на своята еволюция според двата показателя. Останалите видове, разположени между вече споменатите два, са в различна фаза от еволюционното си развитие, като това се определя от доминиращо присъствие на отделни типове ПАи.

ОБОБЩЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изследван е алкалоидният състав на 13 вида и един подвид от род *Senecio* и са идентифицирани общо 36 пиरोлизидинови алкалоида. От тях 22 са изолирани и спектрално охарактеризирани.
2. За първи път е изследван алкалоидният състав на видове *S. othonnae* Bieb, *S. paludosus* L. и *S. doronicum* L, и подвид *S. nemorensis* ssp. *fuchsii* (C. C. Gmelin) Celak с български произход, от които са идентифицирани общо 22 пиролизидинови алкалоида.
3. 13 пиролизидинови алкалоида са новоописани за съответните видове.
4. 6-Ангелоилплатинецин, 7-ангелоил-9-тиглоилплатинецин и сенецивернин N-оксид са новооткрити природни съединения.
5. За първи път десацетилдоронин е изолиран и спектрално охарактеризиран.
6. Чрез ТСХ - денситометрия е определено количественото съдържание на 1,2-ненаситения макроцикличен алкалоид сенецифилин.
7. Направените сравнителни изследвания на алкалоидния състав на видове от род *Senecio* са показали различия в алкалоидния състав на видове от една и съща секция.
8. Установеният алкалоиден състав на вид *S. nemorensis* и подвид *S. nemorensis* ssp. *fuchsii* е в подкрепа на обособяването им като два отделни вида.
9. Установено е, че *S. othonnae* се отличава по алкалоиден състав от останалите видове в секция *Doria*, което дава основание за обособяване на него в отделна секция.

Приноси

- ▶ Получени са данни за алкалоидния състав на 13 вида и един подвид от род *Senecio*. Видове *S. othonnae* Bieb, *S. paludosus* L. и *S. doronicum* L, и подвид *S. nemorensis* ssp. *fuchsii* (C. C. Gmelin) Celak с български произход са изследвани за първи път. Идентифицирани са общо 36 пирилизидинови алкалоида, от които 13 са нови за съответните видове, 3 са новооткрити природни съединения, а десацетилдоронин е изолиран и спектрално охарактеризиран за първи път.
- ▶ За първи път чрез денситометричен анализ е определено количественото съдържание на токсични пирилизидинови алкалоиди в род *Senecio*.
- ▶ Използван е нов хемотаксономичен подход за сравнително изследване на видове от род *Senecio* въз основа на алкалоидния им състав и чрез въвеждането на два нови показателя, а именно еволюционен фактор – E и степен на окисление– Ols.
- ▶ В резултат на установения алкалоиден състав е предложено ново хемотаксономично разпределение на видовете от род *Senecio*. Вид *S. nemorensis* и подвид *S. nemorensis* ssp. *fuchsii* са отделени като два отделни вида, а *S. othonnae* е обособен в отделна секция.

Списък на публикациите във връзка с дисертацията

1. V. Christov, N. Kostova, L. Evstatieva, 2005. 6 α -Angeloylplatynecine: a new alkaloid from *Senecio nemorensis* subsp. *fuchsii* (C.C. Gmelin) Celak. Nat. Prod. Research, 19 (4), 389-392.
2. N. Kostova, V. Christov, M. Cholakova, E. Nikolova, L. Evstatieva, 2006. Pyrrolizidine alkaloids from Bulgarian species of the genus *Senecio*. J. Serb. Chem. Soc., 71 (12), 1275-1280.
3. V. Christov, N. Kostova, L. Evstatieva, 2006. Alkaloid pattern and evolution stage of Bulgarian species from genus *Senecio*, Bulg. Chem. Commun., 38 (4), 277-282.
4. V. Christov, N. Kostova, D. Dimitrov, L. Evstatieva, 2007. Pyrrolizidine alkaloids from Bulgarian species of genus *Senecio*. In: Singh V. K., Govil J. N. and Arunachalam C. (eds.), Recent Progress in Medicinal Plants, Volume 17: Phytochemistry and Pharmacology III, 311-320. Studium Press LLC, USA.

Забелязани цитати:

Статия 1:

1. Y. Jiang, P. Fu, G. Lin, 2006. Hepatotoxicity of naturally occurring pyrrolizidine alkaloids. Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics, 6 (3), 187-192.
2. E. Roeder, H. Wiedenfeld, 2009. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants of Mongolia, Nepal and Tibet. Pharmazie, 64 (11), 699-716.
3. B. Mandić, D. Gođevac, V. Beškoski, M. Simić, S. Trifunović, V. Tešević, V. Vajs, S. Milosavljević, 2009. Pyrrolizidine alkaloids from seven wild-growing *Senecio* species in Serbia and Montenegro. J. Serb. Chem. Soc., 74 (1), 27-34.
4. Bao-Jun Shi, Ai-Zhen Xiong, Shan-Song Zheng, Gui-Xin Chou, Zheng-Tao Wang, 2010. Two new pyrrolizidine alkaloids from *Senecio nemorensis*. Natural Product Research, 24 (20), 1897-1901.
5. B. Mandić, D. Gođevac, L. Vujisić, S. Trifunović, V. Tesević, V. Vajs, S. Milosavljević, 2011. Semiquinol and phenol compounds from seven *Senecio* species. Chemical Papers, 65 (1), 90-92.

6. D. Langel, D. Ober, P. B. Pelsler, 2011. The evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis and diversity in the Senecioneae. *Phytochemical Reviews*, 10 (1), 3-74.
7. B. Shi, J. Shi, H. Jiang, G. Chou, Zh. Wang, 2013. A novel furanoeremophilane with an unusual oxygen bridge from *Senecio nemorensis*. *Fitoterapia*, 84, 11-14.
8. B. Mandić, M. Simić, I. Vučković, L. Vujisić, M. Novaković, S. Trifunović, S. Nikolić-Mandić, V. Tešević, V. Vajs, S. Milosavljević, 2013. Pyrrolizidine Alkaloids and Fatty Acids from the Endemic Plant Species *Rindera umbellata* and the Effect of Lindelofine-*N*-oxide on Tubulin Polymerization. *Molecules*, 18, 10694-10706.
9. B. Mandić, M. Vlajić, S. Trifunović, M. Simić, L. Vujisić, I. Vučković, M. Novaković, S. Nikolić-Mandić, V. Tešević, V. Vajs, S. Milosavljević, 2015. Optimisation of isolation procedure for pyrrolizidine alkaloids from *Rindera umbellata* Bunge. *Natural Product Research*, 29 (9), 887-890.
10. D. Singh, S. C. Sati, M. D. Sati, 2017. Chemical and potential biological perspectives of genus *Senecio* (Asteraceae). *European journal of pharmaceutical and medical research*, 4 (11), 200-222.

Статия 2:

1. B. Mandić, D. Gođevac, V. Beškoski, M. Simić, S. Trifunović, V. Tešević, V. Vajs, S. Milosavljević, 2009. Pyrrolizidine alkaloids from seven wild-growing *Senecio* species in Serbia and Montenegro. *J. Serb. Chem. Soc.*, 74 (1), 27-34.
2. B. M. Mandić, D. M. Gođevac, L. V. Vujisić, S. S. Trifunović, V. V. Tesević, V. V. Vajs, S. M. Milosavljević, 2011. Semiquinol and phenol compounds from seven *Senecio* species. *Chemical Papers*, 65 (1), 90-92.
3. D. Langel, D. Ober, P. B. Pelsler, 2011. The evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis and diversity in the Senecioneae. *Phytochemical Reviews*, 10 (1), 3-74.
4. T. Windono, U. A. Jenie, Leonardus B. S. Kardono, 2012. Isolation and Elucidation of Pyrrolizidine alkaloids from tuber of *Gynura pseudo-china* (L.) DC. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02 (05), 5-9.
5. S. Joshi, K. Shrestha, D. Bajracharya, 2013. Secondary Metabolite variation in some species of *Senecio* L. from Nepal Himalaya. *The Pharma Innovation-Journal*, 2 (1), 70-76.

6. B. Mandić, M. Simić, I. Vučković, L. Vujisić, M. Novaković, S. Trifunović, S. Nikolić-Mandić, V. Tešević, V. Vajs, S. Milosavljević, 2013. Pyrrolizidine Alkaloids and Fatty Acids from the Endemic Plant Species *Rindera umbellata* and the Effect of Lindelofine-*N*-oxide on Tubulin Polymerization. *Molecules*, 18, 10694-10706.
7. J. Robertson, K. Stevens, 2014. Pyrrolizidine alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 31, 1721-1788.
8. B. Mandić, M. Vlajić, S. Trifunović, M. Simić, L. Vujisić, I. Vučković, M. Novaković, S. Nikolić-Mandić, V. Tešević, V. Vajs, S. Milosavljević, 2015. Optimisation of isolation procedure for pyrrolizidine alkaloids from *Rindera umbellata* Bunge. *Natural Product Research*, 29 (9), 887-890.
9. S. Joshi, 2016. Pyrrolizidine alkaloids in some species of *Senecio* Linnaeus (*Senecioneae*: *Asteraceae*). *The Pharma Innovation Journal*, 5 (9), 106-109.
10. S. Katta, G. Seru, N. L. Angadi, 2017. Chemical constituents from *Senecio bombayensis*. *World J Pharm Sci*, 5 (2), 153-155.
11. M. Lindner, A. Krasinski, J. Jurczak, 2018. Facile, Stereocontrolled Synthetic Route towards Bis-functionalised Pyrrolizidines. *Synthesis*, 50 (21), 4295-4300.
12. J. Tamariz, E. Burgueño-Tapia, M. A. Vázquez, F. Delgado, 2018. Chapter One - Pyrrolizidine Alkaloids, *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Volume 80, 1-314.