

ОТЧЕТ ПО ПРОЕКТ ЗА НАУЧНО И КАРИЕРНО РАЗВИТИЕ
НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА „МЛАДИ УЧЕНИ И ПОСТДОКТОРАНТИ“ II ЕТАП

Тема: Химичен състав на прополис от слабо проучени райони на Мароко

Участник: ас. д-р Ралица Чимширова

/длъжност/степен, име фамилия/

Научен ръководител: проф. д-р Милена Попова

/длъжност/степен, име фамилия/

София, Февруари, 2021

Въведение (включва анотация на представения проект, цели, работна програма, предвидени дейности - до 2 стр.)

Интересът към потенциала на природните продукти и изолирани от тях съединения за лечение и превенция на редица заболявания, непрекъснато расте. Към природните продукти се причислява и прополисът, пчелен продукт с растителен произход, тъй като основната му и биологичноактивна съставка са растителни секрети, събрани от пчелите от повърхността на млади листа, пъпки и/или наранена кора. Прополисът е широко използван в народната медицина и понастоящем на световния пазар се предлагат редица продукти на негова основа. Той обаче, не може да се разглежда като един продукт, тъй като химичният му състав е различен и се определя от спецификата на флората на местата на неговото събиране от пчелите. Това е и причината научните изследвания в световен мащаб да бъдат носочени към изясняване на състава и активността на прополис от различен географски произход, което е от съществено значение за неговата терапевтична ефикасност и безопасност. Анализирането на прополис от различни райони, е предпоставка и за намирането на нови биологично активни вещества, които се съдържат в растителните секрети.

Целта на проекта е както получаване на нови резултати от научни изследвания, така и придобиване на нови знания и умения за анализ на природни продукти с оглед бъдещи разработки и кариерно развитие.

Обект на изследване в настоящия проект е прополис от южни райони на Мароко. Тези райони се характеризират с разнообразна растителност, като наблюдението върху поведението на пчелите (по данни на местни пчелари) насочва към кактусоподобни растения от род *Euphorbia*. Известно е, че растителни видове от род *Euphorbia* са източник на нектар, който пчелите събират за производството на мед, но няма научни данни те да са растителен източник на прополис, основани на химичен анализ. Видовете *Euphorbia* продуцират бял млечен сок, нар. латекс (подходящ за събиране от пчелите материал). Той е описван като продукт с разнообразна биологична активност, но има данни, че притежава дразнещо кожата действие и токсичност. Това поставя въпроса за действието, възможностите и начините на приложение на прополис от тези райони. Плануваните по проекта задачи и дейности са:

1. Екстракция на прополиса и фракциониране чрез различни екстракционни и хроматографски методи и подходи.

2. Химично профилиране на получените екстракти и фракции чрез ТСХ/ГХ-МС/ЯМР/ВЕТХ-МС.

3. Изолиране и структурно охарактеризиране на индивидуални компоненти чрез различни хроматографски (КХ с различни адсорбенти, Lobar хроматография, ПТСХ) и спектрални (ЯМР, МС, ИЧ, УВ) методи.

4. Определяне на растителния източник на пробите чрез сравнителен анализ на състава на пробите с този на растителни видове от района, съгласно литературни данни и по възможност чрез директно сравнение с растителен материал.

Резултати и обсъждане (до 10 стр.)

В рамките на настоящия проект са изследвани 5 проби прополис от Мароко (Таблица 1) от медоносната пчела *Apis mellifera*, събран през 2019 год.

Таблица 1: Географски произход на прополис от Мароко

Проба	Географски произход	
	Провинция	Регион
EMA-1	<u>Assa-Zag</u>	<u>Guelmim-Oued Noun</u>
EMA-2	<u>Sidi Ifni</u>	<u>Guelmim-Oued Noun</u>
EMA-3	<u>Aït Baâmrane</u>	<u>Guelmim-Oued Noun</u>
EMA-4	<u>Sidi Ifni</u>	<u>Guelmim-Oued Noun</u>
EMA-5	<u>Taroudant</u>	<u>Souss-Massa</u>

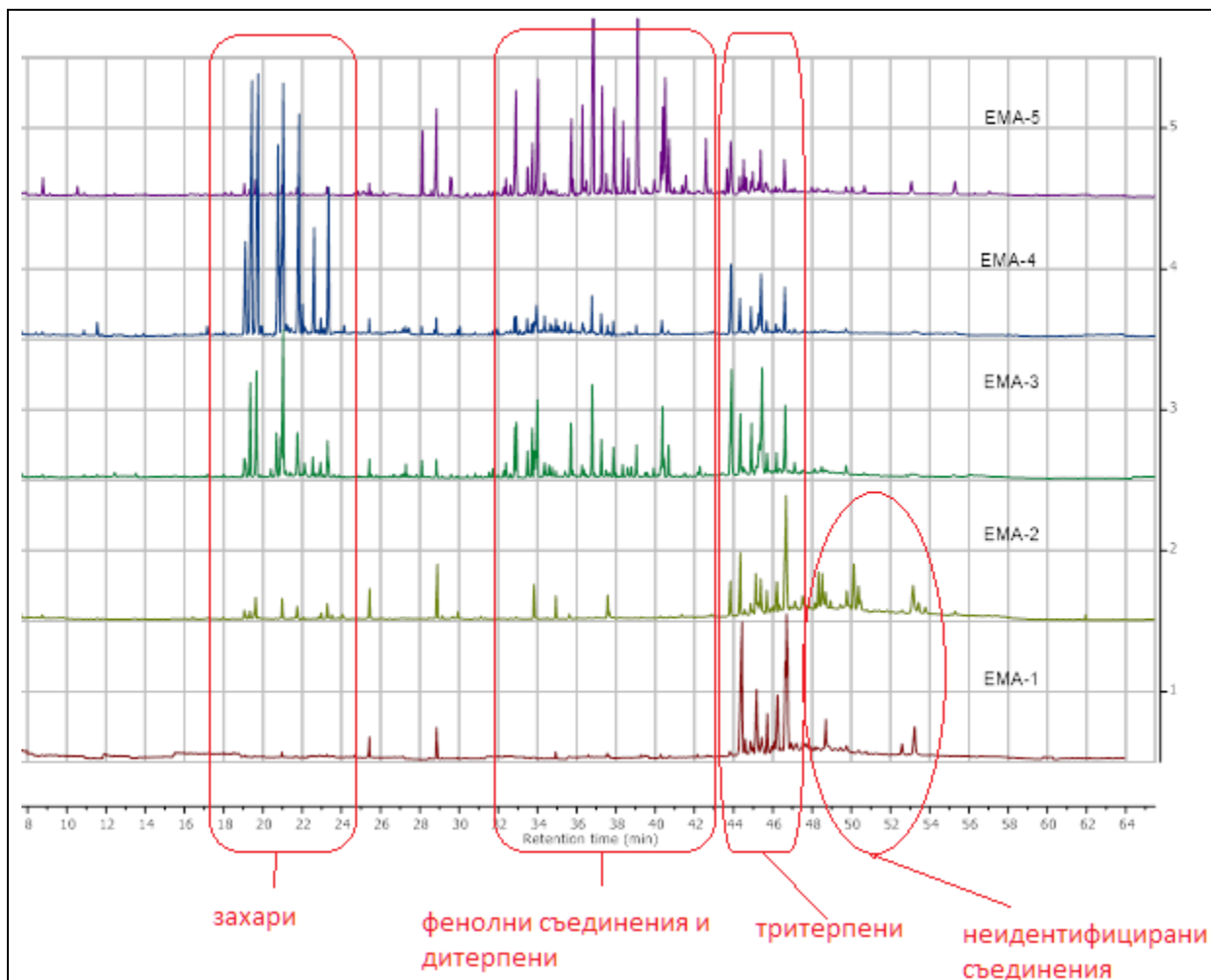


След охлаждане, прополисът (1 г) е настърган и екстрахиран със 70% етанол (1:10, w/v) за 30 мин в ултразвуково поле и след това чрез накисване за 24 часа при стайна температура. Получените екстракти са филтрувани и изпарени до сухо под вакуум.

Химичният състав на екстрактите е анализиран чрез газова-хроматография/мас спектрометрия (ГХ/МС), която е най-често използваната техника за анализ на прополис. За целта, екстрактите (5 мг) са предварително подложени на силилиране, с оглед повишаване летливостта на компонентите чрез превръщането им в триметилсилилови етери. Идентифицирани са над 60 компонента, принадлежащи към различен структурен клас (Таблица 2, Фигура 1).

Таблица 2. Химичен състав на прополис от Мароко (ГХ/МС, 70% етанолни екстракти след силилиране, % от общ йонен ток).

Групи компоненти	Проба				
	EMA-1	EMA-2	EMA-3	EMA-4	EMA-5
Фенолни киселини	-	0.1	0.6	0.2	6.4
Естери на фенолни киселини	-	-	9.8	2.4	15.3
Флавоноиди	-	-	11.8	2.9	45.5
Дитерпени	-	-	4.5	2.2	7.0
Тритерпени	68.6	34.5	27.8	10.7	8.4
Масни киселини	3.4	4.8	1.5	0.8	0.3
Захари и захарни алкохоли (моно и дизахариди)	1.0	5.2	23.9	69.4	1.9
Други (хинова киселина)	0.3	0.6	6.8	6.0	0.3
Неидентифицирани съединения	10.7	23.2	-	-	-
Общо	83.6	68.4	86.7	94.6	85.1



Фигура 1. Химичен профил на силилирани етанолни екстракти чрез ГХ/МС.

Наблюдаваните химични профили разделят пробите по отношение на техния състав, като въз основа на идентифицираните групи вторични метаболити, най-общо се очертават две групи. Едната включва пробите ЕМА-1 и ЕМА-2, отличаващи се с относително високо съдържание на тритерпени и отсъствие на флавоноиди и естери на фенолни киселини, докато последните са сред вторичните метаболити, идентифицирани в ЕМА-3, ЕМА-4 и ЕМА-5.

Измежду пробите ЕМА-3, ЕМА-4 и ЕМА-5, най-високо съдържание на флавоноиди и естери на фенолни киселини (общо 60.8 %) е отчетено в проба ЕМА-5 (Taroudant, Souss-Massa), и макар и в по-малки количества и в ЕМА-3 (Aït Baâemrane, Guelmim-Oued Noun) и ЕМА-4 (Sidi Ifni, Guelmim-Oued Noun), съответно 21.6 % и 5.3 %. Сред идентифицираните фенолни съединения са характерните за тополов тип прополис (произхождащ от видове *Populus*) съединения, а именно пиноцембрин, пинобанксин, пинобанксин 3-*O*-ацетат, хризин, пентенилови естери на кафеената киселина и фенилетилов естер на кафеената киселина. Тези компоненти са характерни за черната топола (*Populus nigra*), която е растителен източник на прополис от страни с умерен климат, и е посочвана и като един от източниците на прополис

от райони със субтропичен климат (Pорова *et al.*, 2015). Съгласно получените ГХ/МС резултати, видът *Populus nigra* е един от източниците на пробите от тази група, което потвърждава факта, че тополите са предпочетен от пчелите растителен източник. Тяхното наличие в близост до кошерите (известно е, че пчелите прелетяват до около 5 км), макар и на единични дървета, се оказва важно за пчелите при събиране на защитни секрети. Досега, тополови компоненти са намирани в прополис от северната и централната част на Мароко (Pорова *et al.*, 2015), която се характеризира със субтропичен (средиземноморски и континентален) климат. Наличието им с най-високо съдържание в проба ЕМА-5 би могло да се свърже с факта, че регионът Souss-Massa, откъдето е събрана пробата, се намира по на север, в сравнение с регионите на събиране на другите проби. Souss-Massa е в близост до хребетите Антиатлас и Високатлас (планински вериги от Атласките планини) в Мароко, където климатът е субтропичен.

Резултатите от ГХ/МС насочват и към втори растителен източник за пробите от тази група, тъй като в тях са идентифицирани и дитерпени от лабданов и тотаранов тип, сред които комунова, купресова и изокупресова киселини и тотарол. Тези компоненти са характерни за прополис от райони с умерен-субтропичен и субтропичен климат, с доказан растителен произход - *Cupressus sempervirens*. Този вид е източник на прополис от Малта (Pорова *et al.*, 2011), южни райони на Гърция и гръцки острови (Graikou *et al.*, 2016), Мароко. За прополис от Мароко, дитерпени са намерени в проби от северни и централни части на страната (Pорова *et al.*, 2015).

Тритерпенови съединения са третата група вторични метаболити, отчетени и в двете групи прополис (Таблицы 2 и 3). Част от тритерпените са охарактеризирани само на база модел на мас-спектрална фрагментация, поради липса на мас спектрални данни и/или сходни до идентични мас спектри, което може да насочи към различни компоненти, вероятните от които са отбелязани в Таблица 3. Тритерпени от циклоартанов, лупанов, амиринов и ланостанов тип като циклоартенол, циклоартанол, лупеол, 24-метилен-циклоартанол, α - и β -амирин са намирани в прополис, основно от страни с тропичен климат, но техният растителен източник е трудно да бъде определен, поради факта, че се биосинтезират от различни растителни видове. След направена литературна справка обаче, наличието им в комбинация с 4-метилстероли като 31-норланостенол и циклоеукаленол, както и идентифицираната хинова киселина насочи вниманието ни към кактусоподобни растителни видове от род *Euphorbia* (Mazoir *et al.*, 2011; Kringstad & Nordal, 1975). Това беше породено и от факта, че по данни на местните пчелари, пчелите събират секрети именно от такива видове, които са широко разпространени в районите около кошерите, откъдето са взети пробите прополис. В най-ниско относително количество, тритерпени са идентифицирани в проба ЕМА-5, събрана от регион със субтрипичен климат, докато регионите, откъдето произхождат пробите ЕМА-3 и ЕМА-4, както и ЕМА-1 и ЕМА-2, се характеризират с горещ пустинен климат (тропичен пояс), повлиян от пустинята Сахара. Основната геоморфологична формация е представена от малки планински масиви, образуващи част от Антиатласките планини, разделени от хълмисти равнини, като растителността е съставена предимно от храсти и сукуленти (главно

Euphorbia officinarum subsp. *Echinus*, *Euphorbia obtusifolia* subsp. *Regis-jubae*) (Genin *et al.*, 2017). Всички посочени до тук резултати сочат, че пробите ЕМА-3, ЕМА-4 и ЕМА-5 са с троен растителен произход – *P. nigra*, *C. sempervirens* и вероятно вид *Euphorbia*.

Втората група проби ЕМА-1 и ЕМА-2 съдържат основно тритерпени. За тези проби, част от компонентите останаха неидентифицирани, поради липса на сравнителни мас спектрални данни. Въз основа на по-горе споменатото, може да се предположи, че растителният източник е един – вид *Euphorbia*.

Таблица 3. Тритерпени и неидентифицирани компоненти (ГХ/МС, 70% етанолни екстракти след силилиране, % от общ йонен ток).

Компонент	Проба				
	ЕМА-1	ЕМА-2	ЕМА-3	ЕМА-4	ЕМА-5
Тритерпени	68.6	34.5	27.8	10.7	8.4
31-Норланостенол (31-нор-24(25)-дихидроланостерол)	0.7	2.3	6.8	2.7	2.8
Тетрацикличен тритерпенов алкохол $M^+=498$ (ланостерол/еуфол/тирокалол/обтусифолиолиол)*	18.6	4.0	3.2	1.2	0.7
31-Норланостерол	0.1	1.0	2.4	0.8	0.5
Циклоартанол	7.8	3.4	0.7	0.4	-
Тетрацикличен тритерпенов алкохол (ланостерол/еуфол/тирокалол/обтусифолиолиол)*	1.5	0.8	2.2	0.8	0.5
Тетрацикличен тритерпенов алкохол (ланостерол/еуфол/тирокалол/обтусифолиолиол)*	4.0	2.7	6.5	2.1	1.6
Циклоеукаленол	1.5	0.8	-	-	-
α -Амирин	< 0.1	2.1	1.2	0.5	0.5
Циклоартенол	8.0	2.9	0.9	0.3	0.2
β -Амирин	< 0.1	1.6	-	0.4	-
Лупеол	16.0	7.9	3.9	1.5	1.3
Амиринацетат	-	-	-	-	0.3
24-Метилен-циклоартанол	10.4	5.0	-	-	-
Неидентифицирани компоненти	10.7	23.2	-	-	-
1	4.5	2.9			
2	1.4	-			
3	4.8	-			
4	-	3.4			
5	-	3.8			
6	-	5.2			
7	-	2.7			
8	-	3.9			
9	-	1.3			

*Възможни съединения на база МС фрагментация.

Съгласно получените резултати, може да се предположи, че видове *Euphorbia* са източници на прополис. Видове *Euphorbia* са източник на прашец, събиран от пчелите за

производството на мед, но няма научни данни, те да са растителен източник на прополис, основани на химичен анализ. Известно е, че видове *Euphorbia* продуцират бял млечен сок (латекс), подходящ за събиране от пчелите материал, описван както като продукт с ценни биологични и фармакологични свойства, така и с токсично и дразнещо кожата и лигавиците действие (Hergenhahn *et al.*, 1974, 1984).

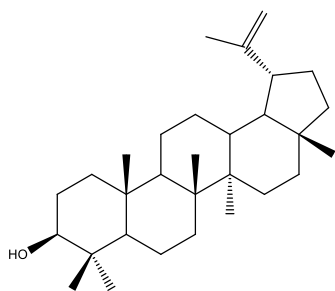
Ето защо, вниманието ни се насочи към проучване на химичния състав на тези растителни видове и детайлно охарактеризиране на прополиса. Направена е литературна справка за химичния състав на видове *Euphorbia*, с акцент върху тези, разпространени в Мароко. Данните показваха, че латексът на видовете *Euphorbia* съдържа комбинация от разнообразнообразни тритерпенови алкохоли (Ourisson, 1994) и дитерпени (Vasas & Hohmann, 2014). Сред дитерпените не са откривани такива от лабданов и тотаранов тип, намерени в споменатия по-горе вид *C. sempervirens*. Нещо повече, токсичното и дразнещо кожата действие се свързва именно с наличие на дитерпени в латекса.

За детайлно охарактеризиране беше подбрана проба ЕМА-2, съдържаща тритерпени и значително висок процент неохарактеризирани съединения. За целта, прополисът (45 г) е екстрахиран със 70% етанол по описаната по-горе процедура. Полученият етанолен екстракт, след концентриране и разреждане с вода, е подложен на последователна течна-течна екстракция с различни по полярност разтворители - петролев етер, хлороформ и етилацетат. Получените петролево-естерен и хлороформен екстракт са впоследствие фракционирани чрез вакуумно течна хроматография със силикагел. След химичното профилиране на фракциите чрез тънкослойна хроматография, сходни по състав фракции са обединени. Получени са общо 10 фракции от хлороформения и 24 фракции от петролево-естерния екстракти. Чрез последващо неколkokратно използване на колонна хроматография при нормално налягане с различни адсорбенти (силикагел, сефадекс), колонна хроматография при ниско налягане (Lobar хроматография) и препаративна тънкослойна хроматография (от сравнително неполярни фракции и от двата екстракта) са изолирани общо 17 съединения, основно от дитерпенов и тритерпенов тип. Структура на изолираните съединения е определена чрез комбинация от ЯМР експерименти (^1H -, ^{13}C -, NOE, DEPT, HSQC, HMBC, ROESY), както и чрез сравнение с литературни ЯМР данни.

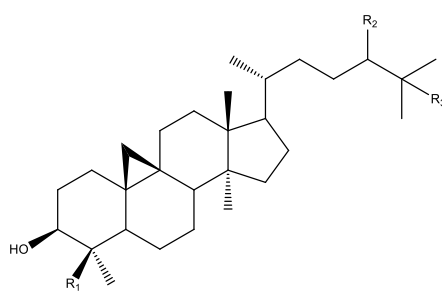
От петролево-естерния екстракт са изолирани 12 съединения: тритерпените лупеол (1), циклоартанол (2), циклоартенол (3), 24-метилден-циклоартанол (4), 25-хидроксициклоартанол (5), 31-норланостенол (31-нор-24(25)-дихидроланостерол) (6), обтусифолиол (7), циклоеукаленол (8) и макроцикличните дитерпени 2-епи-3,7,12-триацетил-8-бензоилингол (9), ингол 3,8,12-триацетил-7-фенилацетат (10), ингол 3,8,12-триацетил-7-(4-метокси)фенилацетат (11), 3,12-диацетил-7-тиглоил-8-метоксиингол (12),

От хлороформения екстракт са изолирани 8 съединения, три от които са изолирани и от петролево-естерния екстракт: дитерпените смес от 2-епи-3,7,12-триацетил-8-бензоилингол (9) и 3,7,12-триацетил-8-бензоилингол (13), ингол 3,8,12-триацетил-7-фенилацетат (10), ингол 3,8,12-триацетил-7-(4-метокси)фенилацетат (11), тритерпена 3 α -тирокал-8(24)-диен-

21-ал-26-ова киселина (**14**), кумарините 6,7-диметокси кумарин (скопарон) (**15**) и 6,7,8-триметокси кумарин (**16**), и 4-хидроксибензоена киселина (**17**) (Фигура 2).



1

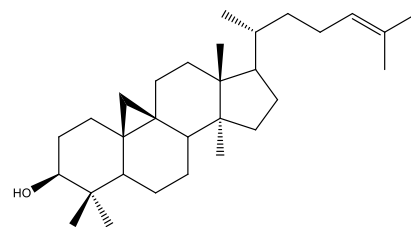


2 $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{H}$

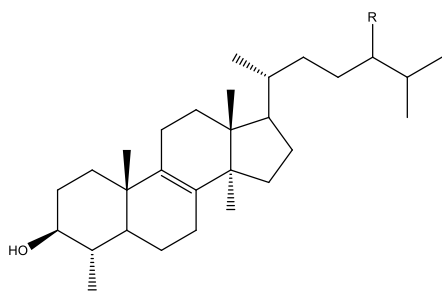
4 $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CH}_2$; $R_3 = \text{H}$

5 $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$

8 $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_2$; $R_3 = \text{H}$

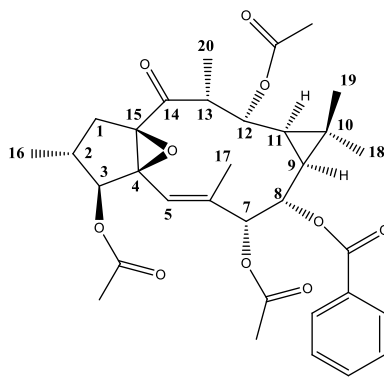


3

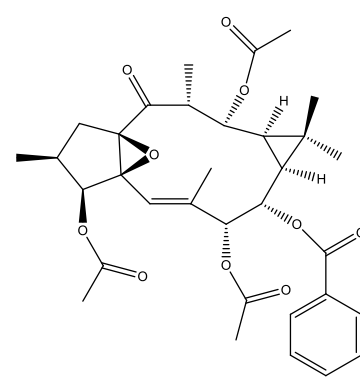


6 $R = \text{H}$

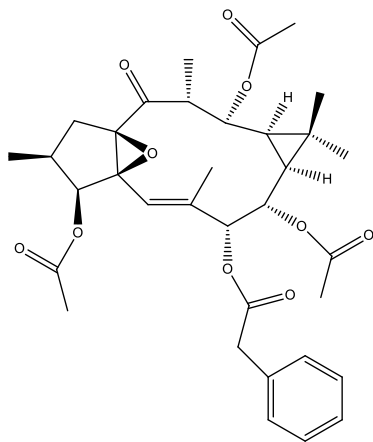
7 $R = \text{CH}_2$



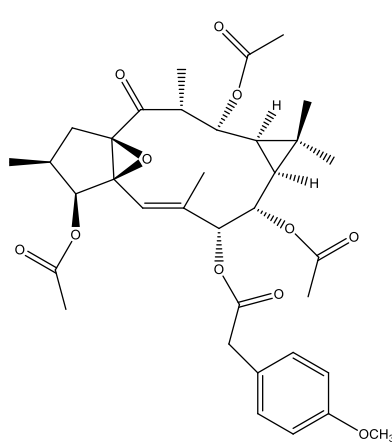
9



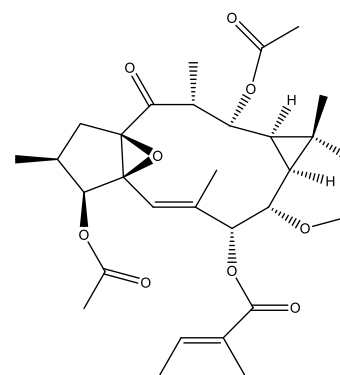
13



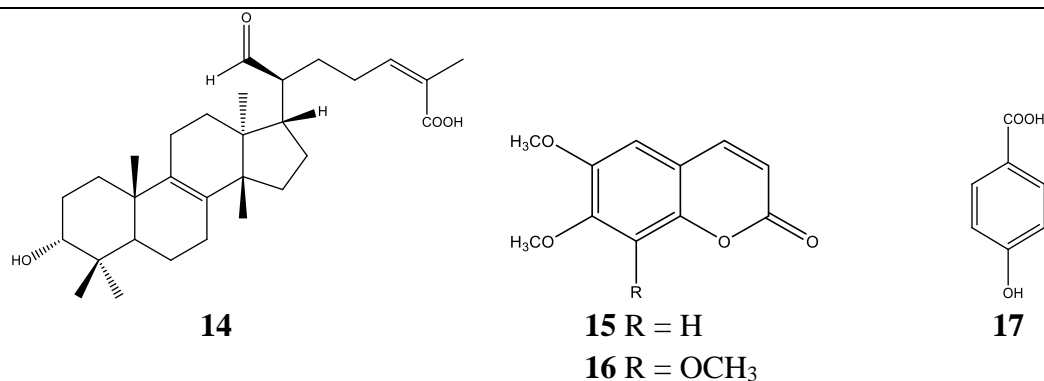
10



11



12



Фигура 2. Изолирани съединения

Сред изолираните компоненти са дитерпени от инголов тип, изолирани за първи път от прополис. Те са познати съединения, изолирани от различни видове *Euphorbia*, включително от продуцирания от тях латекс (Vasas & Hohmann, 2014), което ги доказва като растителен източник на анализирания проба. Инголовите дитерпени са производни на макроцикличните латиранови дитерпени, характеризиращи се с епоксипръстен при C-4 и C-15.



Съединението 3,7,12-триацетил-8-бензоилингол (**13**) е сред най-често изолираните дитерпени в *Euphorbiaceae*, като досега е намирано в латекса на *E. nivulia*, *E. hermentiana*, *E. kamerunica*, *E. ingens*, *E. royleana*, *E. antiquorum* (Ravikantha *et al.* 2002; Abo and Evans, 1981; Lin and Kinghorn, 1983; Connolly *et al.*, 1984; Opferkuch and Hecker, 1973; Rizk *et al.*, 1984; Yin *et al.*, 2019). След направената литературна справка, не открихме данни за изолирането му от марокански кактусоподобни видове.

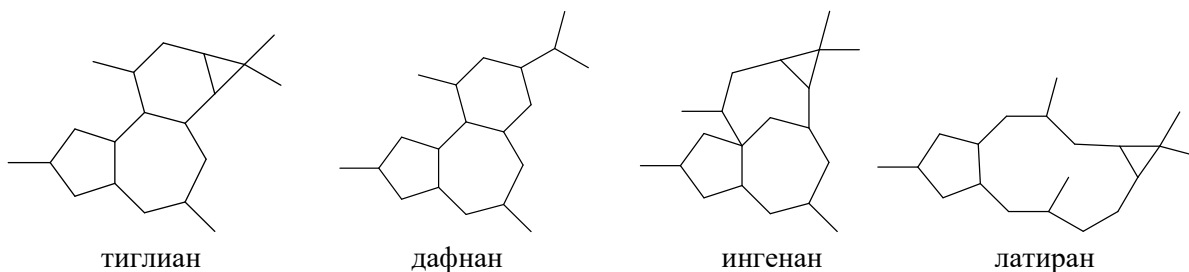
Епимерът на съединение **13**, 3-епи-3,7,12-триацетил-8-бензоилингол (**9**) е откриван в *Euphorbia canariensis* от Тенерифе (Канарски острови) (Marco *et al.*, 1997). 2-Епи и 2,3-диепи инголови производни са изолирани от различни видове *Euphorbia*, но са значително по-рядко срещани.

Дитерпените, съдържащи фенилацетилна група в инголовата молекула, са намирани в *E. resinifera* (Hergenbahn *et al.* 1974; Zhao *et al.*, 2018) и *E. officinarum*, ендемични за Мароко растителни видове. Сред тях, ингол 3,8,12-триацетил-7-(4-метокси)фенилацетат (**11**) и ингол 3,8,12-триацетил-7-фенилацетат (**10**) са били изолирани от *E. resinifera*, докато позиционните изомери ингол 7,8,12-триацетил-3-(4-метокси)фенилацетат и ингол 7,8,12-триацетил-3-фенилацетат – в *E. officinarum* (Daoubi *et al.*, 2007).

3,12-Диацетил-7-тиглоил-8-метоксиингол (**12**) е изолиран от *E. hermentiana* (Lin and Kinghorn, 1983, търговска проба), *E. acruensis* (Канарски острови, Marco *et al.*, 1998), *E. kamerunica* (Connolly *et al.*, 1984).

Всички изолирани тритерпени са откривани в латекса на видове *Euphorbia*, вкл. в проби от Мароко. От тритерпените обтусифолиол (**7**) и 31-норланостенол (**6**) са били изолирани от *E. officinarum* като основни компоненти, докато за *E. resinifera* основните компоненти са α -еуфол и α -еуфорбол (Mazoir *et al.*, 2008; Mazoir *et al.* 2011, Smaili *et al.*, 2017). Последните до момента не са изолирани от пробата, но отсъствието им не е категорично, поради наличието на компоненти с все още неясна структура, съгласно данните от ГХ/МС анализ. По отношение на намирането им в прополис, данните сочат, че докато тритерпените **1**, **2**, **3** и **4** са изолирани от прополис, главно от тропически райони, то досега 4-метилстероли са намирани само в прополис от Малайзия и Бразилия. Циклоеукаленол (**8**) е намиран в малайзийски прополис от безжилни пчели *Geniotrigona thoracica* (Nazir *et al.*, 2017), а обтусифолиол (**7**) – в бразилски прополис от безжилни (*Tetragonisca angustula*) и медоносни (*Apis mellifera*) пчели (Dos Santos Pereira *et al.*, 2003), като и в двата случая са идентифицирани чрез ГХ/МС. Тритерпените **5**, **6** и **14** се изолират за първи път от прополис, като **14** е откриван само в ексудат от стъблата на *Schinus molle* (култивиран в Саудитска Арабия) (Abdel-Sattar *et al.*, 2008).

От получените до момента данни, е трудно да се посочи конкретен вид *Euphorbia*, но сред срещащите се в Мароко видове, като най-вероятни могат да бъдат посочени *E. officinarum* subsp. *echinus* и *E. resinifera*. *E. officinarum* subsp. *echinus* (Hook.f. & Coss.) Vindt, по-известен като *E. echinus* Hook.f. & Coss., както е описан първоначално, е широко разпространен в регионите на събирането на прополиса. Съгласно наличните в литературата данни, досега в латекса на *E. officinarum* са идентифицирани само инголови дитерпени (производни на ингола латиранови дитерпени) и тритерпенови алкохоли. Химичният състав на латекса от *E. resinifera*, от друга страна, е добре проучен, като е установено, че е богат на ди- и тритерпени, като от дитерпените са изолирани макроциклични представители от дафнанов, тиглианов, ингенов и латиранов тип (производни на ингола). Трябва да се отбележи, че *E. resinifera* е най-широко разпространена в по-северната част от страната, но нейното участие като растителен източник не може да бъде отхвърлено на този етап от изследванията. Нещо повече, двата вида представляват бодливи, подобни на кактус, сочни храсти (сукулентни растения).





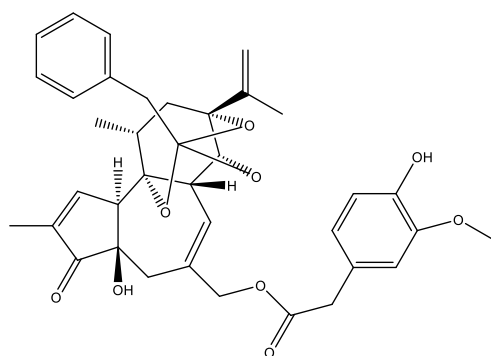
Euphorbia officinarum subsp. *echinus*



Euphorbia resinifera

За определяне на конкретния вид растителен източник на прополиса са необходими допълнителни изследвания, с оглед изясняване на структурата на тритерпеновите алкохоли чрез ГХ/МС и доизясняване на състава на пробата, особено по отношение на съдържащи се макроциклични дитерпени. Това е от значение с оглед възможностите за приложение на прополиса, тъй като, както беше подчертано, латексът от видове *Euphorbia* се отличава с разнообразна биологична активност, но също така е токсичен и има дразнещо кожата и лигавиците действие.

Видове *Euphorbia* са широко използвани в народната медицина по света като средства за лечение на нарушения на храносмилателната и дихателна системи, кожни заболявания, възпаления, наранявания и инфекции (Madeleine *et al.*, 2015). *Euphorbia officinarum* се използва в традиционната медицина за лечение на кожни и офталмологични заболявания (Daoubi *et al.*, 2007), а сухият латекс от *E. resinifera*, наречен еуфорбиум, се предлага в търговската мрежа в редица страни, за лечение на неврологични проблеми, хронична болка, туберкулоза, за облекчаване на болка в зъбите и др., като действието му се свързва предимно с наличието на дитерпени (Vasas & Hohmann, 2014). На дитерпени обаче се дължи и токсичността и дразнещото действие, като е установено, че това са предимно представители от тиглианов (форболови естери), дафнанов и ингенанов тип (Fatope *et al.*, 1996), каквито до момента не бяха изолирани. За *E. resinifera*, например, един от най-характерните за вида дитерпен е резинифератоксин (дафнанов тип), който е функционален аналог на капсаицина, активната съставка на лютите чушки. Известно е, че чистият резинифератоксин е от 500 до 1000 пъти по-лютив от капсаицина. При контакт, той има силно дразнещ ефект, последван от десенсибилизация и аналгезия, поради което се счита за мощен аналгетик. При клинични изпитвания при хиперрефлексия на пикочния мехур, диабетна невропатия и болка при онкологични състояния се посочва, че причинява по-дълготрайно облекчение с по-малко дразнене, в сравнение с капсаицина (Kissin & Szallasi, 2011).



резинифератоксин

По отношение на дитерпени от инголов тип, обаче, се съобщава, че не проявяват токсично и дразнещо кожата действие. За ингол 3,8,12-триацетил-7-фенилацетат (**10**) и ингол 3,8,12-триацетил-7-(4-метокси)фенилацетат (**11**), при изследвания върху ухото на мишка, Hergenbahn и съавтори посочват, че може да се считат за практически неактивни като дразнители (Hergenbahn *et al.*, 1974, 1984). Инголите са предизвикали значителен интерес като антинеопластични средства (Sahai *et al.*, 1981; Fatore *et al.*, 1996), а за 3,7,12-триацетил-8-бензоилингол (**13**) е установена и антиостеопорозна активност в BMM клетки (Yin *et al.*, 2019). За тритерпените обтусифолиол (**7**), циклоеукаленол (**8**) и 24-метилен-циклоартанол (**4**) е установена противовъзпалителна, цитотоксична и антитуморна активност (Kemboi *et al.*, 2020).

Литература

- Abdel-Sattar**, E.; Khaleel, A. E.; Harraz, F. M. H., (2008). Triterpene acids from the stem exudate of *Schinus molle* L., Egyptian Journal of Biomedical Sciences, 24, 68-74;
- Abo Kb** and Evans Fred J.(1981). The Composition of a Mixture of Ingol Esters from *Euphorbia kamerunica*, *Planta Medica*, 43, 392—395
- Connolly**, D.J., Fakunle, O.C., Rycroft, S.D., (1984). Five ingol esters and a 17-hydroxyingol ester from the latex of *Euphorbia kamerunica*. Assignment of esters using ^{13}C N.M.R. methods. *Tetrahedron Lett* 25, 3773—3776;
- Daoubi** M.,Marquez N.,Mazoir N.,Benharref A., Herna'ndez-Gala'n R., Mun'oz E. and Collado I. G., (2007). Isolation of new phenylacetylingol derivatives that reactivate HIV-1 latency and a novel spirotriterpenoid from *Euphorbia officinarum* latex, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 4577–4584;
- Dos Santos Pereira** A., Bicalho B., De Aquino Neto F. R., (2003). Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*; *Apidologie* 34 291–298;
- Genin** M., Alifriqui M., Fakhech A., Hafidi M., Ouahmane L., Genin D. (2017). Back to forests in pre-Saharan Morocco? When prickly pear cultivation and traditional agropastoralism reduction promote argan tree regeneration. *Silva Fennica* vol. 51, 1618, 22;
- Graikou** K., Popova M., Gortzi O., Bankova V.,Chinou I., (2016). Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type?, *LWT - Food Science and Technology*, 65, 261e267

Hergenbahn M., Kusumoto S., and Hecker E., (1984). On the Active Principles of the Spurge Family (Euphorbiaceae), Extremely Skin-Irritant and Moderately Tumor-Promoting Diterpene Esters from *Euphorbia resinifera* Berg., J Cancer Res Clin Oncol, 108:98-109;

Hergenbahn, M., Kusumoto, S. & Hecker, E., (1974). Diterpene esters from 'Euphorbium' and their irritant and cocarcinogenic activity. Experientia 30, 1438–1440;

Kemboi D., Peter X., Langat M. & Tembu J., (2020). A Review of the Ethnomedicinal Uses, Biological Activities, and Triterpenoids of *Euphorbia* Species, Molecules, 25, 4019

Kissin I. & Szallasi A., (2011). Therapeutic Targeting of TRPV1 by Resiniferatoxin, from Preclinical Studies to Clinical Trials, Current Topics in Medicinal Chemistry, 11, 2159-2170;

Kringstad R. & Nordal A., (1975). Lactone-forming acids in succulent plants, Phytochemistry, 14, 1868-1870;

Lin L.J and Kinghorn A. D., (1983), 8-methoxyingol esters from the latex of *euphorbia hermentiana*, Phytochemistry, 22, 12, 2795-2799;

Madeleine, E.; Olwen, M.; Grace, C.; Haris, S.L.; Niclas, N.; Henrik, T.; Nina, R., (2015). Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). J. Ethnopharmacol., 76, 90–101;

Marco A.J., Sanz-Cervera J. F., Alberto Yuste, (1997). Ingenane and lathyrane diterpenes from the latex of *Euphorbia canariensis*, Phytochemistry, 45, 3, 563-570;

Marco A.J., Sanz-Cervera J. F., Ropero J., Checa J. and Fraga B. M., (1998), Ingenane and lathyrane diterpenes from the latex of *Euphorbia acurensis*, Phytochemistry, 49, 4, 1095-1099;

Mazoir N., Benharref A., Bailén M., Reina M., González-Coloma A., and Martínez-Díaz R.A., (2011). Antileishmanial and Antitrypanosomal Activity of Triterpene Derivatives from Latex of Two *Euphorbia* Species, Z. Naturforsch, 66, 360 – 366;

Mazoir N., Benharref A., Bailén M., Reina M., González-Coloma A., (2008). Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species, Phytochemistry, 69(6):1328-38;

Nazir H., Shahidan W. N. S., Ibrahim H. A. and Ismail T. N. N. T., (2018). Chemical Constituents of Malaysian *Geniotrigena thoracica* Propolis, Pertanika J. Trop. Agric. Sc. 41, (3), 955 – 962;

Opferkuch, H.J., Hecker, E., (1973). Ingol- a new macrocyclic diterpene alcohol from *Euphorbia ingens*. Tetrahedron Lett., 3611–3614.

Ourisson G., (1994), J. Plant Physiol., 143, 434;

Popova M., Trusheva B., Antonova D., Cutajar S., Mifsud D., Farrugia C., Tsvetkova I., Najdenski H., Bankova V. (2011) The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. Food Chemistry, 126, 1431-1435;

Popova M., Lyoussi B., Aazzac S., Antunes D., Bankova V. and Miguel G., (2015). Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Properties and Chemical Profiles of Moroccan Propolis, Natural Product Communications, 10 (11);

Ravikantha V., Niranjan Reddy V.L., Prabhakar Rao T., Diwan P.V., Ramakrishna S., Venkateswarlu Y., (2002). Macrocyclic diterpenes from *Euphorbia nivulia*, Phytochemistry 59, 331–335;

Rizk A M, Hammouda F M, El-Missiry M M, Radwan H M and Evans F J, (1984). Macrocyclic Diterpene Esters From *Euphorbia royleana*, Phytochemistry 23, 10, 2377-2379;

Smaili A., Mazoir N., Rifai L. A., Koussa T., Makroum K., Kabil E. M., Benharref A., Faize M., (2017). Triterpene derivatives from *Euphorbia* enhance resistance against *Verticillium* wilt of tomato, Phytochemistry, 135, 169-180;

Vasas A., Hohmann J., (2014). *Euphorbia* Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008–2012), Chem. Rev., 114, 8579;

Yin Z.Y., Dai Y., Hua P., Sun Z. J., Cheng Y. F., Yuan S. H., Chen Z. Y., Gu Q., (2019). Discovery of diverse diterpenoid scaffolds from *Euphorbia antiquorum* and their activity against RANKL-induced osteoclastogenesis, Bioorganic Chemistry 92, 103292;

Zhao N. D., Ding X., Song Y., Yang D. Q., Yu H. L., Adelakun T. A., Qian W. D., Zhang Y., Di Y. T., Gao F., Hao X. J. and Li S. L., (2018). Identification of Ingol and Rhamnofolane Diterpenoids from *Euphorbia resinifera* and Their Abilities to Induce Lysosomal Biosynthesis, J. Nat. Prod., 81, 1209–1218;

Изводи/Обобщение

1. Анализирани са 5 проби прополис от южни райони на Мароко чрез ГХМС, след силилиране. Идентифицирани са над 60 вторични метаболита, принадлежащи към класовете фенолни съединения, дитерпени и тритерпени.

2. Определен е растителният източник на прополиса, като е установено, че пробите ЕМА-3, ЕМА-4 и ЕМА-5 са смесен тип прополис, произхождащ от три растителни вида *Populus nigra*, *Cupressus sempervirenes* и представител на род *Euphorbia*. За пробите ЕМА-1 и ЕМА-2 е установено, че произхождат от един растителен източник - вид *Euphorbia*.

3. Чрез различни хроматографски методи, от проба ЕМА-2, събрана от район с пустинен климат, са изолирани 17 компонента, предимно от тритерпенов и дитерпенов тип. Структурите на съединенията са определени чрез ЯМР експерименти.

4. Изолирани са 11 новоткрити за прополис съединения.

5. За първи път от прополис са изолирани макроциклични дитерпени и 4-метилстероли, комбинацията от които е характерна за кактусоподобни видове от род *Euphorbia*.

6. Изолираните досега дитерпени са производни на ингола (латиранов тип), които са описвани като практически неактивни съединения, по отношение дразнещо кожата и лигавиците действие.

7. Формулиран е нов тип прополис, произхождащ от вид *Euphorbia*, като най-вероятни са *E. officinarum* subsp. *echinus* и *E. resinifera*.

Публикации и участия на научни форуми

Дата: 03.02.2021 г.

Изготвил:

Ралица Симирова